

# Xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng và khuyến cáo trong thực hành lâm sàng

Lê Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Phương Dung

Đơn vị Hỗ trợ sinh sản (IVFMD) Phú Nhuận, Bệnh viện Mỹ Đức, Phú Nhuận

doi:10.46755/vjog.2021.3.1199

Tác giả liên hệ (Corresponding author): Lê Thị Bích Phượng, email: phuong.ltb@myduchospital.vn

Nhận bài (received): 21/7/2021 - Chấp nhận đăng (accepted): 10/9/2021

## Tóm tắt

Tinh dịch đồ là xét nghiệm đầu tay đánh giá khả năng sinh sản nam giới, nhưng xét nghiệm này không thể phản ánh chính xác những biến đổi vật chất di truyền trong nhân tinh trùng, cũng như không thể tiên lượng được kết cục điều trị trong hỗ trợ sinh sản. Tính toàn vẹn DNA tinh trùng đóng vai trò quan trọng cho sự phát triển của phôi cũng như là dấu hiệu sinh học đại diện cho một tinh trùng khỏe mạnh. Do đó, các kỹ thuật xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng ngày càng được thực hiện phổ biến. Hiện nay, một số kỹ thuật thường được sử dụng để đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng bao gồm TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), Comet (Single cell gel electrophoresis), SCD (Sperm chromatin dispersion) và SCSA (Sperm chromatin structure assay). Cho đến nay, vẫn chưa có khuyến cáo cụ thể cho chỉ định thực hiện xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng. Bài tổng quan nhằm giới thiệu về các kỹ thuật xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng cũng như tổng hợp khuyến cáo cho chỉ định thực hiện xét nghiệm này.

**Từ khóa:** Phân mảnh DNA tinh trùng, kỹ thuật xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng, chỉ định thực hiện xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng.

## Sperm DNA fragmentation testing and the recommendation in clinical practice

Le Thi Bich Phuong, Nguyen Thi Phuong Dung

IVFMD, My Duc Hospital, Phu Nuan

## Summary

Semen analysis is the test that assesses male fertility. However, this test can not accurately reflect the genetic abnormality of the sperm nucleus, and can not predict the clinical outcomes in the assisted reproductive technique. Sperm DNA integrity is essential for embryo development as well as a biomarker for healthy sperm. Therefore, sperm DNA fragmentation testing is more common in practice. Currently, several methods commonly used to measure sperm DNA fragmentation include TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), Comet (Single cell gel electrophoresis), SCD (Sperm chromatin dispersion), and SCSA (Sperm chromatin structure assay). Up to now, there is no best recommendation for performing sperm DNA fragmentation testing. This review article aims to introduce sperm DNA fragmentation testing and summarizes some clinical scenarios in which this test should be indicated.

**Keywords:** Sperm DNA fragmentation, Sperm DNA fragmentation test.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo thống kê của WHO (2004), tỉ lệ vô sinh hiếm muộn chiếm 8 - 12% dân số trong độ tuổi sinh sản. Trong đó, vô sinh do yếu tố nam giới chiếm khoảng 40 - 45% [1]. Cho đến nay, tinh dịch đồ là xét nghiệm thường quy để đánh giá sơ khởi khả năng sinh sản của nam giới. Tuy nhiên, phân tích tinh dịch đồ chỉ cho biết các thông số như mật độ, tỉ lệ di động, hình dạng tinh trùng... mà không đánh giá được những biến đổi vật chất di truyền của tinh trùng và không thể tiên lượng được kết cục điều trị khi thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm [2].

Trong những năm gần đây, tính toàn vẹn DNA tinh trùng được xem như yếu tố đóng vai trò quan trọng cho sự phát triển phôi cũng như là dấu hiệu sinh học đại diện

cho một tinh trùng khỏe mạnh [3]. Phân mảnh DNA tinh trùng (SDF - Sperm DNA fragmentation) là sự tổn thương cấu trúc di truyền của tinh trùng, đặc trưng bởi sự đứt gãy mạch đôi hoặc mạch đơn DNA [4]. SDF có liên quan đến nhiều yếu tố gây bệnh như giãn tĩnh mạch thừng tinh, lối sống, tiếp xúc với môi trường độc hại, lão hoá và nhiễm trùng [5]. Ở cấp độ tế bào, những yếu tố này có thể thúc đẩy phá vỡ DNA tinh trùng thông qua các cơ chế như thiếu hụt trưởng thành nhiễm sắc chất tinh trùng, apoptosis và mất cân bằng oxy hoá [6]. Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy SDF là yếu tố bất lợi cho cả sinh sản tự nhiên và hỗ trợ sinh sản. Các nghiên cứu tập trung đánh giá ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng lên kết quả điều trị IUI/IVF/ICSI ngày càng nhiều

hơn. Tính toàn vẹn DNA tinh trùng nên được đánh giá để biết rõ thêm về chất lượng tinh trùng, giúp bác sĩ tư vấn hướng điều trị thích hợp cũng như dự đoán được khả năng điều trị thành công cho bệnh nhân vô sinh, hiếm muộn.

## 2. KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM PHÂN MẢNH DNA TINH TRÙNG

Xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng được dùng để đo lường những đứt gãy trong DNA của tinh trùng. Một số kỹ thuật thường được sử dụng bao gồm: đánh dấu đứt gãy DNA bằng dUTP (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling - TUNEL); điện di tế bào đơn (Single cell gel electrophoresis - Comet); khảo sát mức độ phân tán nhiễm sắc chất tinh trùng (Sperm chromatin dispersion - SCD) và khảo sát cấu trúc nhiễm sắc chất tinh trùng (Sperm chromatin structure assay - SCSA) [7].

TUNEL là phương pháp đánh giá SDF trực tiếp thông qua dUTP (deoxyuridine triphosphate) gắn lên mạch đơn và mạch đôi của DNA đứt gãy bằng terminal deoxynucleotidyl transferase. SDF được định lượng bằng máy đếm dòng chảy tế bào và phân tích định tính bằng tín hiệu phát huỳnh quang hoặc kính hiển vi quang học. Xét nghiệm này có thể thực hiện trên một lượng nhỏ tinh trùng trong tinh dịch và tinh trùng thu nhận từ tinh hoàn. TUNEL có những ưu điểm về độ nhạy và chi phí, nhưng hạn chế về thời gian, ngưỡng giá trị cũng như không thể đánh giá những tế bào tinh trùng chưa trưởng thành [8].

Comet là xét nghiệm định tính phân mảnh DNA mạch đôi và mạch đơn dựa trên điện di. Hình ảnh DNA phân mảnh có hình dạng như sao chổi với phần đầu là những DNA nguyên vẹn và phần đuôi là những DNA sai hỏng. Lượng DNA sai hỏng càng cao thì phần đuôi điện di hình sao chổi càng sáng và dài. Đã có nhiều báo cáo về giá trị lâm sàng của kỹ thuật này trong việc đánh giá khả năng sinh sản của nam giới [9]. Tuy nhiên, đây là kỹ thuật chưa có quy trình chuẩn hoá cũng như không phân biệt được DNA sai hỏng do nguyên nhân ngoại sinh hay do thao tác xét nghiệm [10].

SCD là kỹ thuật xét nghiệm dựa trên đặc điểm của quầng halo tạo thành từ protein nhân tinh trùng bị loại bỏ sau khi bị biến tính bằng acid. DNA tinh trùng sai hỏng nghiêm trọng sẽ cho quầng halo rất nhỏ hoặc không tạo thành quầng halo, trong khi tinh trùng với DNA ít sai hỏng hơn sẽ phân tán DNA vòng và hình thành quầng halo kích thước lớn. Phương pháp này đơn giản, dễ thực hiện, chi phí thấp với bộ kit Halosperm có sẵn nhưng cách đánh giá còn mang tính chủ quan [7].

Kỹ thuật SCSA thực hiện dựa trên sự phát huỳnh quang khác nhau của đoạn DNA bị đứt gãy và đoạn DNA nguyên vẹn với chất nhuộm Acridine orange (AO) và được đo bằng máy đếm dòng chảy tế bào [9]. AO có khả năng phát màu khác nhau khi bám lên mạch đôi hay mạch đơn DNA. AO bám vào DNA mạch đôi sẽ phát huỳnh quang màu xanh lá cây trong khi AO bám vào mạch đơn sẽ phát huỳnh quang màu đỏ [11]. Đây là kỹ thuật đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng duy nhất có quy trình chuẩn hóa và ngưỡng giá trị tham khảo. SCSA cho phép tính toán chỉ

số phân mảnh DNA của trùng một cách chính xác và sử dụng ngưỡng giá trị tham khảo để chỉ định kỹ thuật điều trị phù hợp cho bệnh nhân. Phác đồ điều trị hỗ trợ sinh sản dựa trên SDF được đo bằng kỹ thuật SCSA có thể được thực hiện như sau, nếu  $SDF < 25\%$ , chỉ định bệnh nhân thực hiện IUI hoặc IVF, và chỉ định bệnh nhân thực hiện ICSI khi  $SDF \geq 25\%$  [11].

## 3. CHỈ ĐỊNH XÉT NGHIỆM PHÂN MẢNH DNA TINH TRÙNG

Tính toàn vẹn DNA tinh trùng đóng vai trò quan trọng trong sự thụ tinh, phát triển phôi và thai. Do đó, xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng ngày càng được chỉ định phổ biến trên những bệnh nhân vô sinh, hiếm muộn có mong muốn thực hiện hỗ trợ sinh sản. Vậy câu hỏi được đặt ra là những trường hợp nào nên được chỉ định thực hiện xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng để xác định nguyên nhân vô sinh cũng như xây dựng phác đồ điều trị hiệu quả.

### 3.1. Trường hợp bơm tinh trùng vào buồng tử cung (IUI- Intrauterine insemination)

Ở những bệnh nhân vô sinh không rõ nguyên nhân, tỉ lệ thai IUI giảm khi giá trị SDF đo bằng kỹ thuật SCD cao hơn 20% [12]. Theo Bungum và cộng sự (2007), chỉ số SDF lớn hơn 30% đo bằng kỹ thuật SCSA được xem là yếu tố dự báo việc giảm tỉ lệ thai và tỉ lệ trẻ sinh sống [13]. Khả năng mang thai thành công bằng IUI cũng giảm từ 7 - 8,7 lần trong dân số vô sinh nói chung khi chỉ số phân mảnh DNA đo bằng kỹ thuật SCSA lớn hơn 30% [14]. Phân tích gộp trên 10 bài báo của Chen Q (2019) cho thấy phân mảnh DNA tinh trùng cao có mối tương quan đáng kể với tỉ lệ thai thấp (RR 0,34; 95% CI 0,22 - 0,52) và giảm tỉ lệ trẻ sinh sống sau IUI (RR 0,14; 95% CI 0,04 - 0,56) [15]. Xét nghiệm SDF có thể có giá trị đối với tất cả các trường hợp được chỉ định thực hiện IUI. SDF tăng cao là yếu tố tiên lượng xấu cho kết quả IUI. Do đó trong những trường hợp này, có thể xem xét không thực hiện IUI để hạn chế lãng phí thời gian và chi phí điều trị cho bệnh nhân mà cân nhắc chỉ định ICSI từ đầu.

### 3.2. Trường hợp thụ tinh trong ống nghiệm (IVF/ICSI)

Mặc dù vẫn còn gây nhiều tranh cãi, nhưng hầu hết các phân tích tổng hợp đều cho rằng có mối tương quan giữa SDF và kết quả điều trị IVF/ ICSI. Phân tích gộp bao gồm 11 nghiên cứu trên 1805 cặp vợ chồng thực hiện IVF cho thấy có mối tương quan giữa phân mảnh DNA và tỉ lệ thai (OR 1,70; 95% CI 1,30 - 2,23) [16]. Oleszczuk và cộng sự (2016) đã báo cáo rằng tỉ lệ phôi tốt sau IVF giảm đáng kể khi chỉ số SDF từ 20-30%, khi chỉ số này lớn hơn 40% thì tỉ lệ phôi tốt còn rất thấp, bên cạnh đó, tỉ lệ sẩy thai tự phát tăng cao khi chỉ số SDF > 40% và tỉ lệ trẻ sinh sống giảm đáng kể khi SDF > 20% [17]. Simon và cộng sự (2017) cho thấy SDF tăng cao làm giảm tỉ lệ thai lâm sàng sau IVF (OR 1,15; 95% CI 1,05 - 1,27) và ICSI (OR 0,89; 95% CI 0,80 - 0,99) [18]. Phân tích tổng hợp trên 23 nghiên cứu IVF/ICSI chỉ ra rằng tỉ lệ thai lâm sàng (RR 1,57; 95% CI 1,18 - 2,09) và tỉ lệ sẩy thai (RR 0,85; 95% CI 0,75 - 0,96) bị ảnh hưởng tiêu cực bởi SDF cao, tuy nhiên tỉ lệ sinh sống không bị ảnh hưởng [19].

Mặc dù tác động bất lợi của SDF lên chu kỳ IVF/ICSI chưa được báo cáo rõ ràng, nhưng ngày càng có nhiều bằng chứng chỉ ra rằng tỉ lệ sinh sống giảm ở những bệnh nhân thực hiện IVF/ICSI có chỉ số SDF cao vượt ngưỡng khi đo bằng kỹ thuật Comet [20]. Xét nghiệm SDF có thể có giá trị đối với các cặp vợ chồng thất bại IVF/ICSI không rõ nguyên nhân cũng như những cặp vợ chồng lần đầu tiên điều trị. Những thông tin từ kết quả phân tích có thể hữu ích cho việc tư vấn về kết quả thai sau điều trị. Trong những trường hợp SDF quá cao, ICSI sử dụng tinh trùng thu nhận từ tinh hoàn được đề xuất như một phương pháp điều trị hữu ích [21,22].

### 3.3. Vô sinh chưa rõ nguyên nhân

Khoảng 10 - 30% các cặp đôi vô sinh có kết quả khám sức khỏe và xét nghiệm đánh giá khả năng sinh sản bình thường [23]. Trong số những nam giới vô sinh không rõ nguyên nhân, tỉ lệ SDF tăng cao ở khoảng 20% nam giới [24]. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu đã cho thấy có khoảng 40 - 50% nam giới có chỉ số tinh dịch đồ bình thường nhưng chỉ số SDF cao vượt ngưỡng [25,26]. Hầu hết các nghiên cứu đều cho rằng tỉ lệ SDF thấp tương quan thuận với khả năng có thai tự nhiên [27-29]. Việc đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng ở những bệnh nhân vô sinh không rõ nguyên nhân giúp xác định được nguyên nhân gây vô sinh. Phát hiện được những sai hỏng trong cấu trúc chất nhiễm sắc của bệnh nhân giúp bác sĩ có cái nhìn khái quát hơn để đưa ra phác đồ điều trị phù hợp [30].

### 3.4. Sẩy thai liên tiếp

Bằng chứng hiện tại chỉ ra rằng SDF có tương quan thuận với sẩy thai liên tiếp, không phụ thuộc vào yếu tố nữ giới. Nghiên cứu tổng quan hệ thống và phân tích gộp của McQueen (2019) báo cáo nam giới có vợ sẩy thai liên tiếp trước đó có chỉ số SDF cao hơn đáng kể so với nhóm chứng (MD (mean difference) 10,7; 95% CI 5,82 - 15,58) [31]. Trong một nghiên cứu khác, Zhao và cộng sự (2014) cho thấy tỉ lệ sẩy thai sớm tăng gấp 2,16 lần khi mẫu tinh trùng có phân mảnh DNA cao được sử dụng cho IVF và ICSI (95% CI 1,54 - 3,03). Nghiên cứu tổng quan của Rilcheva (2016) cũng chỉ ra mối liên quan giữa SDF cao với tăng nguy cơ sẩy thai sau IVF và ICSI (OR 2,48; 95% CI 1,52 - 4,04) [14].

Cho đến nay, các cơ chế gây sẩy thai liên tiếp bởi phân mảnh DNA tinh trùng vẫn chưa được hiểu rõ. Tan và cộng sự (2019) cho rằng noãn không thể sửa chữa sai hỏng của DNA tinh trùng có thể góp phần vào sự phát triển kém của phôi nang, thất bại làm tổ hoặc sẩy thai [32]. Một cơ chế khác được đề xuất là do mất cân bằng oxy hoá. Trong trường hợp này, những thay đổi trong di truyền hoặc thượng di truyền trong hợp tử và phôi đang phát triển dẫn đến tăng SDF cảm ứng oxy hoá từ đó gây sẩy thai [33]. Ngoài ra, tổn thương DNA liên quan đến đứt gãy DNA mạch đôi (dsDNA) bám ở những vùng đặc trưng của chất nền có liên quan đến nguy cơ sẩy thai cao. Garolla và cộng sự (2015) cho thấy dsDNA góp phần tăng nguy cơ thất bại làm tổ cho bệnh nhân [34].

### 3.5. Đông lạnh tinh trùng

Đông lạnh tinh trùng là biện pháp bảo tồn khả năng

sinh sản của nam giới mắc ung thư trước khi thực hiện hoá trị, xạ trị. Bên cạnh đó, kỹ thuật đông lạnh tinh trùng còn hỗ trợ cho những trường hợp chồng không có mặt vào ngày vợ thực hiện IUI, chọc hút hay trữ mẫu dự phòng cho những trường hợp nam giới có rất ít tinh trùng trong tinh dịch [35]. Mẫu tinh dịch được đông lạnh bằng phương pháp đông lạnh chậm hoặc thủy tinh hoá. Nhiều nghiên cứu đã báo cáo rằng quá trình đông lạnh tinh trùng có thể gây hại lên chất lượng tinh dịch vì có thể tăng sản xuất ROS dẫn đến stress oxy hóa quá mức [30]. Cho đến nay, tác động của phương pháp trữ lên chỉ số SDF vẫn còn gây nhiều tranh cãi. Nhưng một số nghiên cứu đã báo cáo rằng, đông lạnh tinh trùng bằng phương pháp thủy tinh hoá cũng như bổ sung các chất kháng oxy hóa vào môi trường đông lạnh giúp giảm SDF do stress oxy hóa gây ra và cải thiện khả năng di động sau rã đông [36].

Xét nghiệm SDF trước khi đông lạnh mẫu cho điều trị hoặc cho ngân hàng tinh trùng giúp bổ sung thêm thông tin về chất lượng tinh trùng cho bệnh nhân. Thông tin này có thể giúp lựa chọn phương pháp đông lạnh tối ưu cũng như giúp lựa chọn kỹ thuật điều trị phù hợp [30].

### 3.6. Giãn tĩnh mạch thừng tinh

Giãn tĩnh mạch thừng tinh được xem là một trong những nguyên nhân chủ yếu gây vô sinh nam. Nam giới giãn tĩnh mạch thừng tinh thường có dấu hiệu stress oxy hóa và chỉ số SDF tăng cao [37]. Roque và cộng sự (2018) đã báo cáo rằng sự khác biệt trung bình giữa chỉ số SDF trước và sau điều trị giãn tĩnh mạch thừng tinh là 8,3% (95% CI 10,3 - 6,4%) [38]. Chỉ số SDF tăng cao được báo cáo ở tất cả các cấp độ giãn tĩnh mạch thừng tinh, chủ yếu ở cấp độ 2 và 3 [39]. Nhiều nghiên cứu khuyến cáo rằng, bác sĩ lâm sàng nên cân nhắc tư vấn và chỉ định xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng cho nam giới trước và sau khi điều trị giãn tĩnh mạch thừng tinh [30]. Theo Cho và cộng sự (2017), xét nghiệm SDF có giá trị hữu ích cho những trường hợp giãn tĩnh mạch thừng tinh cấp thấp (cấp 1) có các chỉ số tinh dịch đồ bình thường và giãn tĩnh mạch thừng tinh trung bình (cấp 2, 3) có các chỉ số tinh dịch đồ bình thường [40].

Sau điều trị giãn tĩnh mạch thừng tinh, cần thực hiện thêm xét nghiệm SDF để kiểm tra hiệu quả điều trị cũng như hướng dẫn xử trí thêm nếu SDF của bệnh nhân vẫn còn cao [41].

### 3.7. Trường hợp có tiếp xúc với các yếu tố nguy cơ gây vô sinh

Nhiều nghiên cứu đã báo cáo rằng có mối tương quan giữa các chất độc trong không khí ô nhiễm (nitric oxide, sulphur oxide, ozon), chất độc trong môi trường làm việc (hydrocacbon thơm đa vòng, bức xạ ion, chì,...) với việc tăng SDF [42-44]. Hoá trị, xạ trị cũng báo cáo rằng có khả năng thúc đẩy đứt gãy mạch đôi hoặc mạch đơn của DNA [45]. Các yếu tố lối sống như hút thuốc lá, rượu bia, sử dụng chất gây nghiện, béo phì cũng có tác động bất lợi lên tính toàn vẹn nhiễm sắc thể tinh trùng [30].

Đối với những bệnh nhân có tiếp xúc với yếu tố nguy cơ, việc xác định chỉ số SDF giúp xác định được nguyên nhân gây vô sinh hoặc xây dựng chương trình cải thiện sức khỏe sinh sản thông qua thay đổi lối sống.

#### 4. KẾT LUẬN

Các xét nghiệm đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng ngày càng được nghiên cứu nhiều hơn, giúp cung cấp thêm thông tin hữu ích để tiên lượng về khả năng sinh sản của nam giới. Với quy trình chi tiết và ngưỡng giá trị tham khảo cụ thể, kỹ thuật SCSA đang được xem là “tiêu chuẩn vàng” trong đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng. Theo khuyến cáo hiện nay, những bệnh nhân chuẩn bị thực hiện hỗ trợ sinh sản bằng kỹ thuật IUI, IVF/ICSI; vô sinh chưa rõ nguyên nhân hoặc có tiền căn sảy thai liên tiếp nên thực hiện xét nghiệm đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng, nhằm cung cấp thêm thông tin để bác sĩ chỉ định kỹ thuật điều trị phù hợp. Đối với nam giới có nhu cầu đông lạnh tinh trùng để bảo tồn khả năng sinh sản hoặc điều trị hiếm muộn, xét nghiệm SDF trước khi đông lạnh giúp lựa chọn phương pháp đông lạnh tinh trùng phù hợp cũng như cung cấp thêm thông tin để lựa chọn kỹ thuật hỗ trợ sinh sản sau này. Ở những bệnh nhân giãn tĩnh mạch thừng tinh, chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng nên được đánh giá trước và sau khi phẫu thuật nhằm kiểm tra hiệu quả điều trị cũng như hướng dẫn xử trí thêm trong trường hợp SDF vẫn còn cao. Nam giới có tiếp xúc với các yếu tố nguy cơ gây vô sinh cần kiểm tra chỉ số SDF trước và sau khi thực hiện thay đổi lối sống hoặc điều trị bằng liệu pháp, để xác định hiệu quả của quá trình thay đổi hoặc chuyển đổi liệu pháp điều trị để cải thiện chỉ số SDF.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Brugh VM 3rd, Lipshultz LI. Male factor infertility: evaluation and management. *Med Clin North Am* 2004;88:367–85. doi:10.1016/S0025-7125(03)00150-0.
- [2]. Brazil C. Practical semen analysis: from A to Z. *Asian J Androl* 2010;12:14–20. doi:10.1038/aja.2008.51.
- [3]. Krawetz SA. Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet* 2005;6:633–42. doi:10.1038/nrg1654.
- [4]. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Amengual MJ, Prada E, Cortes P, et al. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One* 2012;7:e44679. doi:10.1371/journal.pone.0044679.
- [5]. Agarwal A, Hamada A, Esteves SC. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. *Nat Rev Urol* 2012;9:678–90. doi:10.1038/nrurol.2012.197.
- [6]. Esteves SC, Prudencio C, Seol B, Verza S, Knodler C, Agarwal A. Comparison of sperm retrieval and reproductive outcome in azoospermic men with testicular failure and obstructive azoospermia treated for infertility. *Asian J Androl* 2014;16:602–6. doi:10.4103/1008-682X.126015.
- [7]. Zini A, Agarwal A. *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*. 2018. doi:10.1007/978-3-319-71815-6.
- [8]. Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci* 2016;169:56–75. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.01.017.
- [9]. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod* 2014;29:2402–12. doi:10.1093/humrep/deu228.
- [10]. Fernandez-encinas A, Jose M. Double Stranded Sperm DNA Breaks , Measured by Comet Assay , Are Associated with Unexplained Recurrent Miscarriage in Couples without a Female Factor 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0044679.
- [11]. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci* 2000;22:169–89.
- [12]. Vandekerckhove FWRC, De Croo I, Gerris J, Vandenberghe E, De Sutter P. Sperm Chromatin Dispersion Test before Sperm Preparation Is Predictive of Clinical Pregnancy in Cases of Unexplained Infertility Treated with Intrauterine Insemination and Induction with Clomiphene Citrate. *Front Med* 2016;3:63. doi:10.3389/fmed.2016.00063.
- [13]. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22:174–9.
- [14]. Rilcheva VS, Ayvazova NP, Ilieva LO, Ivanova SP, Konova EI. Sperm DNA Integrity Test and Assisted Reproductive Technology (Art) Outcome. *J Biomed Clin Res* 2016;9:21–9. doi:10.1515/jbcr-2016-0003.
- [15]. Chen Q, Zhao J-Y, Xue X, Zhu G-X. The association between sperm DNA fragmentation and reproductive outcomes following intrauterine insemination, a meta analysis. *Reprod Toxicol* 2019;86:50–5. doi:10.1016/j.reprotox.2019.03.004.
- [16]. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008;89:823–31. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.04.055.
- [17]. Oleszczuk K, Giwercman A, Bungum M. Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome. *Andrology* 2016;4:290–6. doi:10.1111/andr.12153.
- [18]. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl* 2017;19:80–90. doi:10.4103/1008-682X.182822.
- [19]. Deng C, Li T, Xie Y, Guo Y, Yang Q, Liang X, et al. Sperm DNA fragmentation index influences assisted reproductive technology outcome: A systematic review and meta-analysis combined with a retrospective cohort study. *Andrologia* 2019;51:e13263. doi:https://doi.org/10.1111/and.13263.
- [20]. Nicopoullos J, Vicens-Morton A, Lewis SEM, Lee K, Larsen P, Ramsay J, et al. Novel use of COMET parameters of sperm DNA damage may increase its utility to diagnose male infertility and predict live births following both IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2019;34:1915–23. doi:10.1093/humrep/dez151.
- [21]. Pabuccu EG, Caglar GS, Tangal S, Haliloglu AH, Pa-

- buccu R. Testicular versus ejaculated spermatozoa in ICSI cycles of normozoospermic men with high sperm DNA fragmentation and previous ART failures. *Andrologia* 2017;49:e12609. doi:https://doi.org/10.1111/and.12609.
- [22]. Herrero MB, Lusignan MF, Son W-Y, Sabbah M, Buckett W, Chan P. ICSI outcomes using testicular spermatozoa in non-azoospermic couples with recurrent ICSI failure and no previous live births. *Andrology* 2019;7:281–7. doi:https://doi.org/10.1111/andr.12591.
- [23]. Hamada A, Esteves SC, Nizza M, Agarwal A. Unexplained male infertility: Diagnosis and management. *Int Braz J Urol* 2012;38:576–94. doi:10.1590/S1677-55382012000500002.
- [24]. Gill K, Jakubik J, Rosiak-Gill A, Kups M, Lukaszuk M, Kurpisz M, et al. Utility and Predictive Value of Human Standard Semen Parameters and Sperm DNA Dispersion for Fertility Potential. *Int J Environ Res Public Heal* 2019;16. doi:10.3390/ijerph16112004.
- [25]. Simon L, Carrell DT. Sperm DNA damage measured by comet assay. *Methods Mol Biol* 2013;927:137–46. doi:10.1007/978-1-62703-038-0\_13.
- [26]. Homa ST, Vassiliou AM, Stone J, Killeen AP, Dawkins A, Xie J, et al. A Comparison Between Two Assays for Measuring Seminal Oxidative Stress and their Relationship with Sperm DNA Fragmentation and Semen Parameters. *Genes (Basel)* 2019;10. doi:10.3390/genes10030236.
- [27]. Santi D, Spaggiari G, Simoni M. Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management - meta-analyses. *Reprod Biomed Online* 2018;37:315–26. doi:10.1016/j.rbmo.2018.06.023.
- [28]. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000;73:43–50.
- [29]. Zini A. Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Syst Biol Reprod Med* 2011;57:78–85. doi:10.3109/19396368.2010.515704.
- [30]. Esteves SC, Zini A, Coward RM, Evenson DP, Gosálvez J, Lewis SEM, et al. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia* 2021;53:1–41. doi:10.1111/and.13874.
- [31]. Mcqueen DB, Zhang J, Ph D, Robins JC. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* n.d. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.03.003.
- [32]. Tan J, Taskin O, Albert A, Bedaiwy MA. Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2019;38:951–60. doi:10.1016/j.rbmo.2018.12.029.
- [33]. Venkatesh S, Thilagavathi J, Kumar K, Deka D, Talwar P, Dada R. Cytogenetic, Y chromosome microdeletion, sperm chromatin and oxidative stress analysis in male partners of couples experiencing recurrent spontaneous abortions. *Arch Gynecol Obstet* 2011;284:1577–84. doi:10.1007/s00404-011-1990-y.
- [34]. Garolla A, Cosci I, Bertoldo A, Sartini B, Boudjema E, Foresta C. DNA double strand breaks in human spermatozoa can be predictive for assisted reproductive outcome. *Reprod Biomed Online* 2015;31:100–7. doi:10.1016/j.rbmo.2015.03.009.
- [35]. Organization WH. Examination and processing of human semen. *World Health* 2010;Edition, F:286. doi:10.1038/aja.2008.57.
- [36]. O'Neill HC, Nikoloska M, Ho H, Doshi A, Maalouf W. Improved cryopreservation of spermatozoa using vitrification: comparison of cryoprotectants and a novel device for long-term storage. *J Assist Reprod Genet* 2019;36:1713–20. doi:10.1007/s10815-019-01505-x.
- [37]. Esteves SC, Chan P. A systematic review of recent clinical practice guidelines and best practice statements for the evaluation of the infertile male. *Int Urol Nephrol* 2015;47:1441–56. doi:10.1007/s11255-015-1059-0.
- [38]. Roque M, Bedoschi G, Esteves SC. Effect of varicocele repair on sperm DNA fragmentation: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2018;110:e162. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.07.481.
- [39]. Abdelbaki SA, Sabry JH, Al-Adl AM, Sabry HH. The impact of coexisting sperm DNA fragmentation and seminal oxidative stress on the outcome of varicocelelectomy in infertile patients: A prospective controlled study. *Arab J Urol* 2017;15:131–9. doi:10.1016/j.aju.2017.03.002.
- [40]. Cho C-L, Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: concise practice recommendations. *Transl Androl Urol* Vol 6, Suppl 4 (September 2017) *Transl Androl Urol (Sperm DNA Fragm* 2017.
- [41]. Marij S, C. RJ, F. WM, L.M. VJ, F.A. WR, R. DG. Decreased Sperm DNA Fragmentation After Surgical Varicocelelectomy is Associated With Increased Pregnancy Rate. *J Urol* 2010;183:270–4. doi:10.1016/j.juro.2009.08.161.
- [42]. Wallach EE, Sakkas D, Ph D, Alvarez JG, Ph D. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;93:1027–36. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.10.046.
- [43]. Lafuente R, García-Blázquez N, Jacquemin B, Checa MA. Outdoor air pollution and sperm quality. *Fertil Steril* 2016;106:880–96. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.08.022.
- [44]. Gandhi J, Hernandez RJ, Chen A, Smith NL, Sheynkin YR, Joshi G, et al. Impaired hypothalamic-pituitary-testicular axis activity, spermatogenesis, and sperm function promote infertility in males with lead poisoning. *Zygote* 2017;25:103–10. doi:DOI: 10.1017/S0967199417000028.
- [45]. Bujan L, Walschaerts M, Brugnon F, Daudin M, Berthaut I, Auger J, et al. Impact of lymphoma treatments on spermatogenesis and sperm deoxyribonucleic acid: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertil Steril* 2014;102:667-674.e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.06.008.