

Nghiên cứu

Ứng dụng nền tảng trí tuệ nhân tạo trong phân tích mức độ phân mảnh DNA tinh trùng trước trữ lạnh và sau rã đông ở các trường hợp nam giới vô sinh

Đặng Thị Hồng Nhạn^{1*}, Nguyễn Văn Trung¹, Nguyễn Đắc Nguyễn^{1,2}, Lê Minh Tâm^{1,2}

¹Trung tâm Nội tiết sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế

²Bộ môn Phụ sản, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): Đặng Thị Hồng Nhạn, email: dthnhan@hueuni.edu.vn

Ngày nhận bài (Received): 13/03/2026; Ngày duyệt đăng (Accepted): 05/06/2026; Ngày xuất bản (Published): 18/06/2026

DOI:10.34071/jmp.2026.S-1.5

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng (DNA fragmentation index – DFI) là một chỉ số quan trọng phản ánh tính toàn vẹn vật chất di truyền và có thể bị ảnh hưởng bởi quá trình trữ lạnh – rã đông.

Mục tiêu: Đánh giá ảnh hưởng của quá trình trữ lạnh – rã đông lên DFI tinh trùng cũng như hiệu năng của hệ thống phân tích tinh trùng tự động tích hợp trí tuệ nhân tạo (AI).

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 30 bệnh nhân nam đến khám tại Trung tâm Nội tiết sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y – Dược Huế. Mức độ phân mảnh DNA tinh trùng trước trữ lạnh và sau rã đông được đánh giá bằng phương pháp khảo sát mức độ phân tán nhiễm sắc chất tinh trùng, phân tích bằng hệ thống LensHooke X12 PRO tích hợp AI và phương pháp thủ công dưới kính hiển vi.

Kết quả: Quá trình trữ lạnh – rã đông ghi nhận sự gia tăng có ý nghĩa thống kê chỉ số DFI; tuy nhiên mức tăng trung bình thấp ($3,15 \pm 3,01\%$). Sau rã đông, tỷ lệ tinh trùng có quầng halo lớn giảm, trong khi tỷ lệ quầng halo vừa, quầng nhỏ, không quầng và thoái hóa tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Ở các mẫu bất thường về khả năng di động và hình thái, DFI tăng rõ rệt ($p < 0,001$). Kết quả đánh giá DFI giữa phương pháp thủ công và hệ thống phân tích tự động tích hợp AI nhìn chung có sự tương đồng.

Kết luận: Quá trình trữ lạnh – rã đông có thể làm gia tăng mức độ phân mảnh DNA tinh trùng, đặc biệt ở các mẫu có chất lượng tinh trùng kém. Hệ thống phân tích tự động tích hợp AI cho kết quả tương đồng với phương pháp đánh giá thủ công, tuy nhiên có ưu điểm trong việc phân tích số lượng tinh trùng lớn hơn và giảm sai số chủ quan của người quan sát, hỗ trợ chuẩn hóa quy trình đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng trong thực hành xét nghiệm.

Từ khóa: Phân mảnh DNA tinh trùng; trữ lạnh tinh trùng; SCD; trí tuệ nhân tạo.

Application of an Artificial Intelligence-Based platform for assessing sperm DNA fragmentation before and after cryopreservation in infertile men

Dang Thi Hong Nhan^{1*}, Nguyen Van Trung¹, Nguyen Dac Nguyen^{1,2}, Le Minh Tam^{1,2}

¹Center for Reproductive Endocrinology and Infertility (HUECREI), Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital

²Department of Obstetrics and Gynecology, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Abstract

Background: The sperm DNA fragmentation index (DFI) is an important indicator reflecting the integrity of genetic material and may be affected by the cryopreservation–thawing process.

Objective: To evaluate the effect of cryopreservation–thawing on DFI as well as the performance of an artificial intelligence (AI)-integrated automated sperm analysis system.

Materials and Methods: A cross-sectional descriptive study was conducted on 30 male patients attending the Center for Reproductive Endocrinology and Infertility, Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital. Sperm DNA fragmentation before cryopreservation and after thawing was assessed using the sperm chromatin dispersion (SCD) method and analyzed by both the AI-integrated LensHooke X12 PRO system and manual microscopic evaluation.

Results: The cryopreservation-thawing process showed a statistically significant increase in the DNA fragmentation index (DFI); however, the mean increase was low ($3.15 \pm 3.01\%$). After thawing, the proportion of spermatozoa with big halo significantly decreased, whereas the proportions of medium halo, small halo, no halo, and degraded spermatozoa significantly increased ($p < 0.05$). In samples with abnormal motility and morphology, DFI increased markedly ($p < 0.001$). Overall, the DFI results obtained from manual assessment and the AI-integrated automated analysis system demonstrated good agreement.

Conclusion: Cryopreservation–thawing may increase sperm DNA fragmentation, particularly in lower-quality samples. The AI-integrated automated analysis system provided results comparable to those of manual evaluation while enabling the analysis of a larger number of spermatozoa and reducing observer-dependent bias, thereby supporting improved standardization of DFI assessment.

Keywords: *Sperm DNA fragmentation; sperm cryopreservation; sperm chromatin dispersion; artificial intelligence.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tỷ lệ vô sinh hiện nay đang có xu hướng gia tăng, trong đó vô sinh nam chiếm 40 - 50% các trường hợp vô sinh và được cho là liên quan chặt chẽ đến chất lượng tinh trùng. Bên cạnh các thông số tinh dịch đồ truyền thống, tính toàn vẹn DNA tinh trùng ngày càng được xem là một chỉ dấu quan trọng phản ánh chất lượng tinh trùng và khả năng sinh sản của nam giới [1, 2]. Nhiều nghiên cứu cho thấy, chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng (DNA fragmentation index – DFI) cao làm giảm khả năng thụ tinh, tăng nguy cơ sẩy thai và thất bại làm tổ trong các chu kỳ hỗ trợ sinh sản [3, 4, 5]. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, tổn thương DNA ở tinh trùng không chỉ ảnh hưởng đến khả năng thụ tinh tự nhiên mà còn làm giảm hiệu quả của các phương pháp hỗ trợ sinh sản.

Hiện nay, có nhiều phương pháp được sử dụng để đánh giá mức độ phân mảnh DNA tinh trùng. Phương pháp đánh dấu phân mảnh DNA bằng các dUTP (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling - TUNEL) được sử dụng phổ biến vì khả năng phát hiện trực tiếp các phân mảnh trong DNA với độ nhạy cao, nhưng quy trình thực hiện phức tạp và đòi hỏi thời gian dài [1]. Khảo sát cấu trúc nhiễm sắc chất tinh trùng (Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA) sử dụng kỹ thuật phân tích dòng chảy tế bào (flow cytometry) để đo độ ổn định của DNA thông qua khả năng kết hợp với thuốc nhuộm, cho kết quả nhanh và chính xác nhưng yêu cầu thiết bị chuyên dụng đắt tiền [6]. Điện di tế bào đơn (Single cell gel electrophoresis - Comet), một phương pháp điện di phân tích tổn thương DNA đơn lẻ, có độ nhạy và độ chính xác cao nhưng cần kỹ thuật viên có trình độ cao để thực hiện [7]. Trung tâm Nội tiết sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế hiện đang sử dụng phương pháp khảo sát mức độ phân tán nhiễm sắc chất tinh trùng (Sperm chromatin dispersion – SCD), phương pháp này đơn giản, dễ thực hiện, chi phí thấp với

bộ kit có sẵn với đầy đủ nguyên liệu, hóa chất và quy trình, thiết bị đơn giản, tuy nhiên cách đánh giá còn mang tính chủ quan. Sự phát triển của các công nghệ mới như hệ thống tự động và trí tuệ nhân tạo (Artificial Intelligence – AI) trong phân tích tinh trùng đã mang lại hiệu quả vượt trội, nổi bật là hệ thống LensHooke. Các hệ thống tự động như LensHooke đã được đề cập như một công cụ hiệu quả trong việc giảm thiểu sai sót và tăng cường độ chính xác [8].

Trong khi đó, quá trình trữ lạnh – rã đông tinh trùng, một bước quan trọng nhằm bảo quản tinh trùng trong hỗ trợ sinh sản, cũng được nghiên cứu kỹ lưỡng. Các nghiên cứu quốc tế cho thấy, quy trình này có thể gây ra stress oxy hóa, phá vỡ cấu trúc màng tinh trùng và gia tăng mức độ phân mảnh DNA [9]. Điều này ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng tinh trùng sau rã đông, từ đó ảnh hưởng đến khả năng thụ thai và phát triển phôi [10, 11]. Một số nghiên cứu ghi nhận chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng có thể tăng khoảng 10 - 20% sau quá trình trữ lạnh, rã đông [9, 12, 13]. Các giải pháp bảo quản tiên tiến đã được phát triển nhằm giảm thiểu tác động tiêu cực này, bao gồm việc sử dụng các chất bảo vệ tinh trùng và các kỹ thuật trữ lạnh nhanh như vitrification [14]. Nghiên cứu của tác giả Lê Minh Tâm và cộng sự năm 2019 cho thấy có sự gia tăng đáng kể DFI sau khi rã đông, cho thấy quá trình trữ lạnh có thể làm giảm tính toàn vẹn của DNA tinh trùng [15]. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy quá trình trữ lạnh làm giảm khả năng di động tổng thể và di động tiến tới của tinh trùng, đồng thời tăng DFI, ảnh hưởng đến khả năng sinh sản [2]. Trong khi đó, nghiên cứu của Sugihara và cộng sự lại cho thấy không có mối liên hệ đáng kể giữa DFI sau quá trình trữ lạnh – rã đông và tỷ lệ mang thai hoặc sinh sống [16].

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về vô sinh nam và chất lượng tinh trùng đã có những bước tiến đáng

kể trong thời gian qua. Các nghiên cứu tập trung vào việc đánh giá chỉ số tinh dịch đồ, ảnh hưởng của môi trường sống, lối sống và bệnh lý đến chất lượng tinh trùng, cũng như tối ưu hóa quy trình trữ lạnh – rã đông tinh trùng để nâng cao tỷ lệ bảo tồn chất lượng sau rã đông. Tuy nhiên, các phương pháp được sử dụng để đánh giá sự phân mảnh DNA tinh trùng tại Việt Nam hiện nay chủ yếu vẫn là SCSA hoặc SCD với sự đánh giá kết quả thủ công, phụ thuộc nhiều vào kinh nghiệm người đọc và có thể ảnh hưởng đến tính khách quan, độ lặp lại của kết quả.

Trong bối cảnh sự phát triển nhanh chóng của công nghệ và nhu cầu chuẩn hóa quy trình hỗ trợ sinh sản, việc ứng dụng các hệ thống phân tích tự động tích hợp trí tuệ nhân tạo như LensHooke trong đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng được xem là một hướng tiếp cận tiềm năng. Điều này hứa hẹn sẽ góp phần nâng cao hiệu quả chẩn đoán và điều trị vô sinh nam.

Xuất phát từ thực tế đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu “Ứng dụng nền tảng trí tuệ nhân tạo trong phân tích mức độ phân mảnh DNA tinh trùng trước trữ lạnh và sau rã đông ở các trường hợp nam giới vô sinh” nhằm khảo sát sự thay đổi mức độ phân mảnh DNA tinh trùng sau quá trình trữ lạnh – rã đông, đồng thời bước đầu đánh giá khả năng ứng dụng của hệ thống phân tích tích hợp trí tuệ nhân tạo trong thực hành hỗ trợ sinh sản.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 30 bệnh nhân nam đến khám và điều trị tại Trung tâm Nội tiết sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế từ tháng 10 năm 2025 đến tháng 03 năm 2026. Tiêu chuẩn nhận vào nghiên cứu bao gồm các trường hợp có mật độ tinh trùng ≥ 5 triệu tinh trùng/ml và có đầy đủ các thông tin hành chính bao gồm năm sinh, loại vô sinh và thời gian vô sinh. Tiêu chuẩn loại trừ bao gồm các trường hợp thiếu tinh nặng hoặc vô tinh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu thực hiện theo phương pháp mô tả cắt ngang. Cỡ mẫu nghiên cứu được chọn theo phương pháp lấy mẫu thuận tiện. Các thông tin hành chính như tuổi, nguyên nhân và thời gian vô sinh; kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ, kết quả đánh giá mức độ phân mảnh DNA trước trữ lạnh và sau rã đông được thu thập đầy đủ.

2.2.1. Xét nghiệm tinh dịch đồ

Mẫu tinh dịch được thu nhận bằng phương pháp thủ dâm tại cơ sở y tế sau thời gian kiêng xuất tinh từ 2 - 7 ngày. Sau khi ly giải, mẫu sẽ được đánh giá các thông số đại thể bao gồm thể tích tinh dịch, độ nhớt, pH tinh dịch.

Khả năng di động của tinh trùng được quan sát bằng kính hiển vi Primo Star (Zeiss, Jena, Đức) để phân loại độ di động thành 4 loại dựa trên vận tốc và mô hình chuyển động: tinh trùng tiến tới nhanh, tinh trùng tiến tới chậm, tinh trùng di động tại chỗ, tinh trùng bất động.

Khả năng sống của tinh trùng được đánh giá dựa trên tính toàn vẹn của màng tế bào sau khi nhuộm với thuốc nhuộm Eosin, tinh trùng có màng nguyên vẹn không bắt màu được xem là còn sống, trong khi tinh trùng bắt màu hồng/đỏ được xem là chết hoặc tổn thương màng. Mỗi lam đánh giá 200 tinh trùng ở độ phóng đại $\times 400$.

Mật độ tinh trùng được pha loãng với dung dịch đếm mật độ và đánh giá bằng buồng đếm Neubauer cải tiến.

Hình thái tinh trùng được đánh giá bằng phương pháp nhuộm Giemsa và quan sát dưới kính hiển vi Primo Star ở độ phóng đại $\times 1000$, phân tích các thành phần gồm đầu, vùng acrosome, cổ, đoạn giữa, đuôi và giọt bào tương. Ít nhất 200 tinh trùng được đếm để xác định tỷ lệ bình thường và bất thường. Tỷ lệ tinh trùng bình thường $< 4\%$ được xem là bất thường hình thái.

Hai chuyên viên phôi học sẽ tiến hành đánh giá kết quả độc lập dựa trên hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới WHO 2021, kết quả cuối cùng được tính trung bình cộng giữa hai lần đếm [17].

2.2.2. Trữ lạnh và rã đông tinh trùng

- Quy trình trữ lạnh tinh trùng: Mẫu tinh dịch sau khi ly giải sẽ được pha loãng với môi trường Ferticult Flushing (FertiPro, Bỉ) theo tỷ lệ 1:1 và ly tâm ở 300 - 400g trong 10 phút. Sau khi loại bỏ phần dịch nổi phía trên, 0,5 ml cặn lắng sẽ được cân bằng với môi trường bảo quản lạnh SpermFreeze (Vitrolife®, Thụy Điển) theo tỷ lệ 1:1 bằng cách nhỏ từng giọt môi trường vào ống trữ mẫu có tinh dịch trong vòng 10 phút. Cho 10 μ l mẫu tinh dịch đã xử lý vào các straw trữ lạnh tinh trùng đã ghi họ tên bệnh nhân. Sau đó, cho các straw vào ống trữ mẫu và nhúng vào nitơ lỏng. Gắn ống trữ mẫu và cryocane để và bảo quản trong bình chứa nitơ lỏng ở nhiệt độ -196°C .

- Quy trình rã đông tinh trùng: Sau 14 ngày, straw chứa tinh trùng được lấy ra khỏi bình nitơ lỏng và chuyển vào môi trường nitơ lỏng. Sau đó,

nhúng vào ống 1,5 ml chứa môi trường Ferticult Flushing (Bỉ) đã làm ấm ở 37°C trong 30 giây để rã đông. Straw được lắc nhẹ khi mẫu ngập hoàn toàn trong dung dịch. Mẫu sau đó được đánh giá chất lượng và thực hiện xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng.

2.2.3. Xét nghiệm đánh giá mức độ phân mảnh DNA tinh trùng

Mức độ phân mảnh DNA tinh trùng được đánh giá bằng phương pháp khảo sát mức độ phân tán chất nhuộm sắc tinh trùng (Sperm Chromatin Dispersion - SCD). Tại Trung tâm Nội tiết sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y – Dược Huế (HueCREI), chúng tôi sử dụng kit R10 Plus (LensHooke, Đài

Loan). Sau khi thực hiện các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất, các tinh trùng có DNA nguyên vẹn sẽ tạo thành quầng halo lớn hoặc trung bình, trong khi tinh trùng có DNA bị tổn thương sẽ tạo quầng halo nhỏ hoặc không có halo. Tiêu chí phân loại: (1): tinh trùng có quầng halo lớn: Kích thước quầng halo \geq đường kính ngang của nhân; (2): tinh trùng có quầng halo trung bình: $1/3$ đường kính ngang của nhân $<$ kích thước quầng halo $<$ đường kính ngang của nhân; (3): tinh trùng có quầng halo nhỏ: Kích thước quầng halo $\leq 1/3$ đường kính ngang của nhân; (4): tinh trùng không có quầng halo; (5): tinh trùng thoái hóa: tinh trùng có nhân bắt màu kém, không đều. Chỉ số DFI được tính theo công thức:

$$DFI (\%) = \frac{\text{Tinh trùng có quầng halo nhỏ} + \text{tinh trùng không có quầng halo} + \text{tinh trùng thoái hóa}}{\text{Tổng số tinh trùng phân tích}} \times 100$$

Theo khuyến nghị của nhà sản xuất và các nghiên cứu trước đây, ngưỡng phân biệt phân mảnh tinh trùng thông qua chỉ số DFI như sau: DFI $\leq 15\%$ được đánh giá là bình thường, DFI trong khoảng $15\% < DFI \leq 30\%$ được đánh giá là phân mảnh trung bình và DFI $> 30\%$ được đánh giá là phân mảnh nặng.

Kết quả được đánh giá và phân tích bằng hai phương pháp:

- Phương pháp phân tích tự động tích hợp trí tuệ nhân tạo: Phân tích bằng hệ thống phân tích tinh trùng tự động X12 PRO (LensHooke, Đài Loan), sử dụng nền tảng trí tuệ nhân tạo để nhận diện tinh trùng, phân loại quầng halo và tính toán tự động chỉ số DFI. Bên cạnh thuật toán nền tảng của nhà sản xuất, hệ thống còn được hiệu chỉnh và tối ưu hóa dựa trên dữ liệu thực tế tại phòng xét nghiệm của đơn vị nghiên cứu nhằm nâng cao khả năng nhận diện và giảm sai số trong quá trình phân tích. Trong giai đoạn đầu triển khai, một số trường hợp nhận diện chưa chính xác như nhận diện nhầm các đối tượng không phải tinh trùng hoặc phân loại chưa phù hợp sẽ được rà soát và hiệu chỉnh bởi chuyên gia trên 10 năm kinh nghiệm trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản, từ đó giúp hệ thống dần hoàn thiện và nâng cao độ chính xác theo thời gian. Quá trình hiệu chỉnh liên tục này giúp hệ thống từng bước hoàn thiện độ chính xác và tính ổn định trong phân tích. Đồng thời, việc xây dựng cơ sở dữ liệu đặc thù tại đơn vị góp phần cải thiện hiệu năng của hệ thống AI, hướng đến chuẩn hóa và tự động hóa quy trình đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng trong thực hành xét nghiệm.

- Phương pháp thủ công: Quan sát dưới kính hiển vi quang học với vật kính 1000x, phân loại tinh trùng theo kích thước quầng halo và tính toán chỉ số DFI theo công thức kể trên. Số lượng tinh trùng được đánh giá theo khuyến nghị của nhà sản xuất là 300 tinh trùng.

Đánh giá chất lượng tinh trùng được thực hiện độc lập bởi hai chuyên viên phôi học có trên 5 năm kinh nghiệm. Sai lệch chấp nhận được giữa hai người $< 10\%$; trong trường hợp sai lệch vượt quá ngưỡng này, mẫu sẽ được đánh giá lại và thống nhất kết quả trước khi đưa vào phân tích thống kê.

2.2.4. Phân tích thống kê

Số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm thống kê (SPSS) (IBM Corp., Armonk, NY, USA) phiên bản 26.0. Các biến phân loại được thể hiện bằng số trường hợp và tỷ lệ phần trăm, biến liên tục phân phối chuẩn được thể hiện bằng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn.

Phân phối chuẩn của các biến liên tục được kiểm định bằng phép kiểm Shapiro–Wilk. Đối với các phép so sánh trước trữ lạnh và sau rã đông, phép kiểm t-test bắt cặp được sử dụng cho các biến có phân phối chuẩn; trường hợp dữ liệu không tuân theo phân phối chuẩn, phép kiểm Wilcoxon signed-rank được áp dụng. Sự tương đồng giữa kết quả đánh giá bằng hệ thống tự động tích hợp AI và phương pháp thủ công được phân tích bằng hệ số tương quan và đánh giá mức độ phù hợp giữa hai phương pháp. Giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

2.2.5. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này đã được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học, Trường Đại học Y – Dược, Đại học Huế thông qua và cho phép thực hiện, theo giấy chấp thuận số H2025/715 ngày 10 tháng 12 năm 2025.

3. KẾT QUẢ

Bảng 1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu (n=30)

Đặc điểm	Trung bình ± độ lệch chuẩn
Tuổi	35,87 ± 4,99
≥ 40 tuổi [n (%)]	6 (20%)
< 40 tuổi [n (%)]	24 (80%)
Loại vô sinh	
Nguyên phát [n (%)]	22 (66,67%)
Thứ phát [n (%)]	8 (33,33%)
Thời gian vô sinh (năm)	2,19 ± 1,13
> 3 năm [n (%)]	5 (16,67%)
≤ 3 năm [n (%)]	25 (83,33%)
Hút thuốc	
Có [n (%)]	8 (26,67%)
Không [n (%)]	22 (73,33%)

Từ tháng 10/2025 đến tháng 03/2026, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu trên 30 bệnh nhân nam giới đến điều trị tại trung tâm. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu được chỉ ra ở bảng 1. Trong đó, độ tuổi trung bình là 35,87 ± 4,99. Vô sinh nguyên phát chiếm 66,67%. Thời gian vô sinh trung bình là 2,19 ± 1,13 năm. Tỷ lệ hút thuốc chiếm 26,67%.

Bảng 2. Đặc điểm các thông số tinh trùng (n = 30)

Đặc điểm	Trung bình ± độ lệch chuẩn	Min – Max
pH	7,77 ± 0,44	6,0 - 8,35
Thời gian kiêng quan hệ (ngày)	4,03 ± 1,03	3 - 7
Thể tích (ml)	2,88 ± 1,26	1 - 5,5
Mật độ (x10 ⁶ /ml)	31,53 ± 14,33	5 - 65
Di động tiến tới (PR, %)	21,83 ± 10,05	4 - 36
Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	82,13 ± 4,37	71 - 88
Hình thái bình thường (%)	2,80 ± 1,51	1 - 7
ORP	1,06 ± 0,79	0,35 - 3,99

Đặc điểm các thông số tinh dịch của 30 mẫu nghiên cứu được trình bày ở Bảng 2. Giá trị pH tinh dịch trung bình là 7,77 ± 0,44 với thời gian kiêng quan hệ trung bình 4,03 ± 1,03 ngày. Thể tích tinh dịch trung bình đạt 2,88 ± 1,26 ml. Mật độ tinh trùng trung bình là 31,53 ± 14,33 × 10⁶/ml. Tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới trung bình là 21,83 ± 10,05%, thấp hơn ngưỡng tham chiếu của WHO 2021. Tỷ lệ tinh trùng sống trung bình đạt 82,13 ± 4,37%, trong khi tỷ lệ tinh trùng có hình thái bình thường trung bình là 2,80 ± 1,51%. Chỉ số ORP trung bình là 1,06 ± 0,79, dao động từ 0,35 đến 3,99.

Bảng 3. So sánh kết quả đánh giá mức độ phân mảnh DNA tinh trùng giữa hệ thống phân tích tự động (AI) và phương pháp thủ công

Phương pháp	Phân tích tự động	p_1	Thủ công	p_2	Giá trị p
DFI trước trữ lạnh	17,87 ± 10,50		17,32 ± 8,20		0,454
DFI sau rã đông	21,02 ± 10,83	< 0,001	20,31 ± 8,99	< 0,001	0,153
Δ DFI (sau rã đông – trước trữ lạnh)	3,15 ± 3,01		2,99 ± 2,85		0,327
Tổng số tinh trùng phân tích	1945 ± 639,25		300		< 0,001
DFI ≤ 15 (n = 12)					
DFI trước trữ lạnh	8,59 ± 4,63		10,58 ± 5,64		0,004
DFI sau rã đông	11,93 ± 6,02		12,90 ± 6,24		0,158
15 < DFI ≤ 30 (n = 13)					
DFI trước trữ lạnh	19,04 ± 3,31		18,33 ± 2,94		0,193
DFI sau rã đông	23,44 ± 5,59		22,13 ± 4,83		0,104
DFI > 30 (n = 5)					
DFI trước trữ lạnh	36,50 ± 3,30		30,86 ± 2,13		0,003
DFI sau rã đông	37,73 ± 6,45		33,40 ± 4,31		0,109

p_1 : so sánh DFI trước và sau rã đông sử dụng hệ thống phân tích tự động có tích hợp AI

p_2 : so sánh DFI trước và sau rã đông sử dụng phương pháp thủ công

p: so sánh DFI giữa 2 phương pháp

Cả hai phương pháp đánh giá đều cho kết quả chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng sau rã đông cao hơn có ý nghĩa thống kê so với trước trữ lạnh ($p < 0,001$). Mức thay đổi DFI (Δ DFI) trung bình khi sử dụng hệ thống phân tích tự động có tích hợp AI là 3,15 ± 3,01 so với phương pháp thủ công là 2,99 ± 2,85. Tổng số tinh trùng phân tích được khi sử dụng LensHooke và phương pháp thủ công lần lượt là 1945 ± 639,25 và 300. Khi so sánh giữa hai phương pháp đánh giá (sử dụng hệ thống LensHooke và phương pháp đánh giá thủ công), kết quả cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai phương pháp đối với DFI

trước trữ lạnh, sau rã đông cũng như Δ DFI ($p > 0,05$).

Chúng tôi cũng đã tiến hành phân nhóm DFI theo ý nghĩa lâm sàng thường được sử dụng trong đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng, kết quả cho thấy sự khác biệt giữa hai phương pháp được ghi nhận ở nhóm DFI ≤ 15 và DFI > 30 trước trữ lạnh. Cụ thể, ở nhóm DFI ≤ 15, phương pháp thủ công cho kết quả cao hơn so với hệ thống phân tích tự động (10,58 ± 5,64 so với 8,59 ± 4,63; $p = 0,004$), trong khi ở nhóm DFI > 30, phương pháp thủ công lại cho giá trị thấp hơn so với hệ thống phân tích tự động (30,86 ± 2,13 so với 36,50 ± 3,30; $p = 0,003$).

Bảng 4. Đánh giá sự thay đổi mức độ phân mảnh DNA tinh trùng sau quá trình trữ lạnh – rã đông đánh giá bởi hệ thống phân tích tự động

Chỉ số	Trước trữ lạnh	Sau rã đông	Mức thay đổi	Giá trị p
DFI (%)	17,87 ± 10,50	21,02 ± 10,83	3,15 ± 3,01	< 0,001
Quầng halo lớn (%)	28,40 ± 14,86	17,45 ± 15,39	-10,95 ± 9,81	< 0,001
Quầng halo trung bình (%)	53,83 ± 13,88	61,66 ± 12,70	7,82 ± 10,06	< 0,001
Quầng halo nhỏ (%)	7,01 ± 4,10	8,27 ± 4,00	1,26 ± 2,13	0,003
Không có quầng halo (%)	10,01 ± 6,90	11,44 ± 7,00	1,42 ± 1,91	< 0,001
Thoái hóa (%)	0,74 ± 0,57	1,17 ± 0,97	0,43 ± 0,63	0,001
Tổng số tinh trùng phân tích	1945,07 ± 639,25	1677,30 ± 684,36	-267,77 ± 921,12	0,122

Kết quả ở bảng 4 cho thấy chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng (DFI) tăng có ý nghĩa thống kê sau quá trình trữ lạnh – rã đông ($21,02 \pm 10,83$ so với $17,87 \pm 10,50$; $p < 0,001$). Phân tích phân bố các nhóm tinh trùng theo kích thước quần halo cho thấy có sự thay đổi đáng kể sau quá trình trữ lạnh – rã đông. Cụ thể, tỷ lệ tinh trùng có quần halo lớn giảm từ $28,40 \pm 14,86\%$ xuống $17,45 \pm 15,39\%$, trong khi tỷ lệ halo trung bình tăng từ $53,83\%$ lên $61,66\%$; quần halo nhỏ tăng từ $7,01\%$ lên $8,27\%$; và tinh trùng không có quần halo tăng từ $10,01\%$ lên $11,44\%$ ($p < 0,05$).

Bảng 5. Phân tích các yếu tố liên quan đến sự thay đổi DFI

Yếu tố	DFI (%)		Giá trị p
	Trước trữ lạnh	Sau rã đông	
Di động			
Bình thường (PR $\geq 30\%$)	$17,05 \pm 9,80$	$18,81 \pm 9,04$	0,149
Bất thường (PR $< 30\%$)	$18,13 \pm 11,06$	$22,42 \pm 11,65$	$< 0,001$
Mật độ			
Bình thường (≥ 16 triệu/ml)	$17,74 \pm 11,14$	$20,92 \pm 11,32$	0,071
Bất thường (< 16 triệu/ml)	$17,98 \pm 5,58$	$23,19 \pm 7,71$	0,032
Tỷ lệ tinh trùng sống			
Bình thường (Tỷ lệ sống $\geq 58\%$)	$16,81 \pm 9,88$	$20,00 \pm 9,94$	0,063
Bất thường (Tỷ lệ sống $< 58\%$)	$31,22 \pm 12,23$	$38,23 \pm 10,68$	0,161
Hình thái			
Bình thường (Tỷ lệ bình thường $\geq 4\%$)	$11,49 \pm 9,60$	$13,16 \pm 9,93$	0,076
Bất thường (Tỷ lệ bình thường $< 4\%$)	$20,91 \pm 9,67$	$25,25 \pm 8,99$	$< 0,001$

Phân tích mối liên quan giữa các thông số tinh dịch đồ và mức độ phân mảnh DNA tinh trùng cho thấy một số yếu tố có liên quan đáng kể với DFI sau rã đông. Các mẫu được phân nhóm dựa trên giá trị bình thường và bất thường của từng thông số theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO 2021), bao gồm: tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới (PR $\geq 30\%$), mật độ tinh trùng (≥ 16 triệu/ml), tỷ lệ tinh trùng sống ($\geq 58\%$) và tỷ lệ tinh trùng có hình thái bình thường ($\geq 4\%$). Kết quả cho thấy ở nhóm tinh trùng có độ di động bình thường và hình thái tinh trùng bình thường, sự thay đổi DFI trước trữ lạnh và sau rã đông không có ý nghĩa thống kê ($18,81 \pm 9,04$ so với $17,05 \pm 9,80$, $p = 0,149$ và $13,16 \pm 9,93$ so với $11,49 \pm 9,60$, $p = 0,076$). Ngược lại, ở các nhóm có độ di động bất thường hoặc hình thái bất thường, DFI sau rã đông tăng có ý nghĩa thống kê ($22,42 \pm 11,65$ so với $18,13 \pm 11,06$, $p < 0,001$ và $25,25 \pm 8,99$ so với $20,91 \pm 9,67$, $p < 0,001$). Ngoài ra, nhóm có mật độ tinh trùng thấp (< 16 triệu/ml) cũng ghi nhận xu hướng DFI sau rã đông cao hơn so với nhóm có mật độ bình thường.

4. BÀN LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện trên

30 bệnh nhân nam đến khám và điều trị tại Trung tâm Nội tiết sinh sản và vô sinh, với độ tuổi trung bình $35,87 \pm 4,99$; tỷ lệ vô sinh nguyên phát chiếm $66,67\%$ và thời gian vô sinh trung bình $2,19 \pm 1,13$ năm; các thông số tinh dịch ban đầu ghi nhận có sự biến thiên khá rộng, phản ánh sự đa dạng về chất lượng tinh trùng giữa các bệnh nhân, phù hợp với thực tế lâm sàng của nhóm nam giới vô sinh.

Kết quả nghiên cứu cho thấy mức độ phân mảnh DNA tinh trùng tăng có ý nghĩa thống kê sau quá trình trữ lạnh – rã đông, với giá trị trung bình tăng từ $17,87 \pm 10,50\%$ lên $21,02 \pm 10,83\%$ ($p < 0,001$). Điều này cho thấy quá trình trữ lạnh – rã đông có thể gây ảnh hưởng bất lợi đến tính toàn vẹn DNA tinh trùng. Theo một số giả thuyết được đề cập trong y văn, hiện tượng này có thể liên quan đến việc gia tăng stress oxy hóa và hình thành các gốc tự do (ROS), từ đó dẫn đến tổn thương màng tế bào, ty thể và cấu trúc chromatin của tinh trùng [2, 9, 15]. Bên cạnh đó, sự thay đổi áp suất thẩm thấu và sự hình thành tinh thể băng trong quá trình trữ lạnh cũng có thể ảnh hưởng đến cấu trúc nhân tinh trùng, góp phần làm tăng mức độ phân mảnh DNA tinh trùng sau rã đông [18, 19]. Tuy nhiên, mức tăng DFI trung bình trong nghiên cứu này tương đối thấp ($\Delta DFI: 3,15 \pm$

3,01%). Khi so sánh với một số nghiên cứu trước đây, mức tăng này thấp hơn đáng kể. Chẳng hạn, nghiên cứu của Björndahl L. và cộng sự sử dụng phương pháp khảo sát mức độ phân tán chất nhiễm sắc tinh trùng (Sperm Chromatin Dispersion - SCD) trên 380 mẫu tinh dịch ghi nhận DFI tăng từ 20,71% trước trữ lạnh lên 29,10% sau rã đông, tương ứng mức tăng khoảng 8,4%, phản ánh DNA tinh trùng bị tổn thương đáng kể [13]. Tương tự, nghiên cứu của Al Bijou và cộng sự vào năm 2025 cũng cho thấy mức tăng DFI rõ rệt, từ 46,3% lên 60,0% ($\Delta DFI = 13,7\%$) sau quá trình trữ lạnh – rã đông [9]. Điều này cho thấy quy trình trữ lạnh đang được áp dụng tại trung tâm có thể bảo tồn tương đối tốt tính toàn vẹn DNA tinh trùng và góp phần hạn chế các tổn thương DNA trong quá trình trữ lạnh - rã đông.

Khi phân tích chi tiết các nhóm tinh trùng theo kích thước quầng halo trong phương pháp SCD, chúng tôi nhận thấy có sự thay đổi rõ rệt về phân bố các nhóm halo sau quá trình trữ lạnh - rã đông. Tỷ lệ tinh trùng có quầng halo lớn giảm đáng kể, trong khi tỷ lệ tinh trùng có quầng halo trung bình, halo nhỏ, không có halo và thoái hóa tăng lên sau rã đông. Theo nguyên lý của phương pháp SCD, tinh trùng có quầng halo lớn thường tương ứng với các tế bào có DNA nguyên vẹn và cấu trúc chromatin ổn định nhất, do sự giãn nở mạnh của DNA sau khi loại bỏ protein nhân. Ngược lại, khi DNA bị đứt gãy hoặc cấu trúc chromatin bị rối loạn, khả năng phân tán DNA sẽ giảm, dẫn đến sự xuất hiện của các halo nhỏ hơn hoặc không có halo [1, 20]. Do đó, việc giảm tỷ lệ halo lớn trong nghiên cứu này có thể phản ánh những thay đổi sớm của cấu trúc chromatin tinh trùng dưới tác động của quá trình trữ lạnh - rã đông, trong khi sự gia tăng halo trung bình có thể đại diện cho nhóm tinh trùng chịu ảnh hưởng nhẹ nhưng chưa xuất hiện đứt gãy DNA rõ rệt. Kết quả này phù hợp với sự gia tăng của chỉ số DFI quan sát được, đồng thời cung cấp cái nhìn chi tiết hơn về sự thay đổi cấu trúc chromatin ở mức độ tế bào đơn lẻ. Kết quả nghiên cứu ở bảng 5 cho thấy, ở nhóm có độ di động tinh trùng bình thường ($PR \geq 30\%$) và hình thái tinh trùng bình thường ($\geq 4\%$) [17], sự thay đổi DFI trước trữ lạnh và sau rã đông không có ý nghĩa thống kê. Ngược lại, ở các nhóm có di động giảm hoặc hình thái bất thường, DFI sau rã đông tăng có ý nghĩa thống kê. Điều này cho thấy tinh trùng có chất lượng tốt có khả năng duy trì ổn định cấu trúc DNA tốt hơn trong điều kiện stress của quá trình trữ lạnh. Cơ chế có thể liên quan đến chức năng ty thể và khả năng chống lại stress oxy hóa của tinh trùng.

Các tinh trùng có độ di động kém thường liên quan đến rối loạn chức năng ty thể và giảm khả năng khử ROS, khiến chúng dễ bị tổn thương DNA hơn khi trải qua các quy trình xử lý như trữ lạnh tinh trùng [21, 22, 23]. Bên cạnh đó, các bất thường về hình thái tinh trùng thường đi kèm với rối loạn trong quá trình đóng gói chromatin và thay thế protamine trong giai đoạn sinh tinh, làm cho DNA tinh trùng kém ổn định và dễ bị phân mảnh hơn [1, 7]. Ngoài ra, nhóm có mật độ tinh trùng thấp (< 16 triệu/ml) cũng ghi nhận mức DFI sau rã đông cao hơn so với nhóm có mật độ bình thường, mặc dù khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê nhưng phần nào có thể phản ánh tình trạng rối loạn sinh tinh hoặc stress oxy hóa tại tinh hoàn ở các trường hợp thiếu tinh [2].

Một điểm đáng chú ý của nghiên cứu là việc so sánh kết quả đánh giá DFI giữa hệ thống phân tích tự động tích hợp trí tuệ nhân tạo (Artificial Intelligence – AI) và phương pháp đánh giá thủ công. Kết quả cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai phương pháp đối với DFI trước trữ lạnh, sau rã đông cũng như mức thay đổi DFI (ΔDFI). Điều này cho thấy hệ thống phân tích tự động có độ tương đồng cao với phương pháp đánh giá truyền thống.

Tuy nhiên, khi phân tích theo từng nhóm DFI, giá trị DFI trước trữ lạnh ở nhóm có $DFI \leq 15\%$ (bình thường) và nhóm có $DFI > 30\%$ (phân mảnh nặng) khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm đánh giá bằng hệ thống phân tích tự động tích hợp AI và nhóm đánh giá bằng phương pháp thủ công. Sự chênh lệch này có thể liên quan đến số lượng tinh trùng được phân tích cũng như đặc điểm phân bố không đồng đều của các nhóm quầng halo trong tiêu bản, trong khi với phương pháp thủ công, chuyên viên phôi học thường sử dụng vật kính 100X, dẫn đến vi trường hẹp và độ sâu trường ảnh giảm. Ngược lại, hệ thống phân tích kỹ thuật số sử dụng vật kính 60X kết hợp với phóng đại số và màn hình hiển thị kích thước lớn, giúp mở rộng vi trường quan sát và tăng độ sâu hình ảnh, tổng số tinh trùng được đánh giá lớn hơn. Trong nghiên cứu của chúng tôi, mỗi vi trường có thể ghi nhận trung bình khoảng 81 tinh trùng, với tổng số tinh trùng được nhận diện và phân tích lên đến khoảng 4000 tinh trùng, góp phần nâng cao độ tin cậy của kết quả phân tích. Việc phân tích số lượng lớn tế bào tinh trùng cũng được xem là một yếu tố quan trọng giúp tăng độ chính xác của các xét nghiệm đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng [1, 6]. Do đó, việc ứng dụng các hệ thống phân tích tự động có thể góp phần chuẩn hóa việc đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng trong thực hành lâm sàng.

Bên cạnh đó, trong quá trình phân tích, các kết quả nhận diện của hệ thống AI được kiểm tra và hiệu chỉnh bởi chuyên viên phôi học nhiều năm kinh nghiệm, nhằm phân biệt chính xác quầng halo cũng như loại bỏ các cấu trúc không phải tinh trùng như cận thuốc nhuộm, bạch cầu hoặc các tế bào khác. Quá trình hiệu chỉnh này giúp tối ưu hóa khả năng nhận diện của hệ thống và cải thiện độ chính xác của thuật toán trong việc phân loại quầng halo. Nhờ đó, hệ thống có thể dần đạt được mức độ nhận diện ổn định và chính xác hơn [8, 24]. Một hạn chế thường được đề cập của phương pháp đánh giá thủ công là nguy cơ chịu ảnh hưởng bởi yếu tố chủ quan của người đọc. Việc phân loại kích thước quầng halo chủ yếu dựa trên quan sát trực tiếp và kinh nghiệm của chuyên viên phôi học, do đó có thể dẫn đến sự khác biệt giữa các người đọc hoặc giữa các lần đánh giá khác nhau. Ngược lại, hệ thống phân tích tự động dựa trên trí tuệ nhân tạo sử dụng các tiêu chí nhận diện và phân loại hình ảnh được chuẩn hóa, giúp giảm sự phụ thuộc vào yếu tố chủ quan và cải thiện tính nhất quán của kết quả.

Dựa trên kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy rằng các trường hợp tinh trùng yếu, mật độ thấp hoặc hình thái bất thường vẫn có thể được trữ lạnh để dự phòng, tuy nhiên nên ưu tiên sử dụng mẫu tinh trùng tươi khi điều kiện cho phép. Trong các tình huống bắt buộc như người chồng không có mặt vào ngày chọc hút noãn, chuẩn bị điều trị xạ trị hoặc các chỉ định lâm sàng khác, tinh trùng trữ lạnh – rã đông vẫn có thể được sử dụng hiệu quả. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy các tinh trùng có chất lượng tốt ít bị ảnh hưởng hơn bởi quá trình trữ lạnh – rã đông. Bên cạnh đó, quy trình xử lý tinh trùng trước khi thực hiện các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản góp phần chọn lọc các tinh trùng có chất lượng tốt, do đó giúp duy trì tương đối ổn định chất lượng mẫu sau rã đông.

DFI được xem là một chỉ dấu phản ánh tính toàn vẹn di truyền của tinh trùng và có thể ảnh hưởng đến kết quả của các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản như IVF hoặc ICSI [3, 4]. Nghiên cứu này có ưu điểm là ứng dụng hệ thống phân tích tự động tích hợp trí tuệ nhân tạo trong đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng, cho phép phân tích số lượng tinh trùng lớn hơn và giảm sai số chủ quan so với phương pháp đọc thủ công. Đồng thời, việc so sánh trực tiếp giữa hai phương pháp giúp bước đầu đánh giá tính tương đồng của hệ thống AI trong thực hành xét nghiệm.

Tuy nhiên, nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế như cỡ mẫu còn nhỏ, đơn trung tâm. Nghiên cứu

cũng chưa phân tích sâu mối liên quan giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng với các kết cục lâm sàng trong hỗ trợ sinh sản như tỷ lệ thụ tinh, chất lượng phôi hay tỷ lệ thai lâm sàng. Trong tương lai, các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn, đa trung tâm và có dữ liệu lâm sàng hỗ trợ sinh sản sẽ giúp làm rõ hơn giá trị ứng dụng của phương pháp này.

5. KẾT LUẬN

Quá trình trữ lạnh – rã đông tinh trùng làm tăng có ý nghĩa thống kê chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng (DFI). Tuy nhiên, mức tăng Δ DFI trung bình tương đối thấp, cho thấy quy trình trữ lạnh đang áp dụng có thể bảo tồn tương đối tốt tính toàn vẹn DNA tinh trùng. Phân tích theo kích thước quầng halo ghi nhận tỷ lệ tinh trùng có quầng halo lớn giảm có ý nghĩa thống kê sau rã đông, gợi ý khả năng xuất hiện tổn thương DNA ở một số tinh trùng, mặc dù mức độ phân mảnh chưa rõ rệt. Đồng thời, các mẫu có tinh trùng với độ di động và hình thái bình thường cho thấy mức thay đổi DFI thấp hơn, cho thấy nhóm tinh trùng có chất lượng tốt ít bị ảnh hưởng hơn bởi quá trình trữ lạnh – rã đông. Kết quả so sánh giữa phương pháp đánh giá thủ công và hệ thống phân tích tự động ứng dụng trí tuệ nhân tạo (AI) cho thấy sự tương đồng về giá trị DFI tổng thể. Tuy nhiên, ở nhóm $DFI \leq 15\%$ và $DFI > 30\%$ ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai phương pháp, có thể liên quan đến số lượng tinh trùng được phân tích trong mỗi lần đánh giá. Việc ứng dụng hệ thống phân tích tinh trùng tự động dựa trên trí tuệ nhân tạo có thể giúp chuẩn hóa quy trình đánh giá, tăng số lượng tinh trùng được phân tích và giảm sự phụ thuộc vào yếu tố chủ quan của người đọc, từ đó góp phần nâng cao độ chính xác và tính tái lập của xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng trong thực hành lâm sàng.

6. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi Đề tài cấp Trường Đại học Y – Dược, Đại học Huế, mã số: 15BV/25 và Nhóm nghiên cứu tiêu biểu “Y học sinh sản” của Đại học Huế, mã số NCTB.DHH.2025.07.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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. *Animal Reproduction Science*. 2016;169:56-75.
2. Li MW, Lloyd KCK. DNA fragmentation index (DFI) as a measure of sperm quality and fertility in mice. *Scientific Reports*. 2020;10(1):3833.

3. Li F, Duan X, Li M, Ma X. Sperm DNA fragmentation index affect pregnancy outcomes and offspring safety in assisted reproductive technology. *Scientific Reports*. 2024;14(1):1035.
4. Asgari F, Shafiee MN, Nazari L, Chehrizi M, Mohseni Meybodi A, Aleyasin A, et al. Risk of embryo aneuploidy is affected by the increase in sperm DNA damage in recurrent implantation failure patients under ICSI-CGH array cycles. *Human Fertility*. 2022;25(5):1003-11.
5. Gat I, Tang K, Quach K, Kuznyetsov V, Antes R, Filice M, et al. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with blastocyst aneuploidy or morphological grading. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179002.
6. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in Cell Science*. 2000;22(2-3):169-89.
7. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, 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(9):e44679.
8. Agarwal A, Selvam MKP, Ambar RF. Validation of LensHooke® X1 PRO and computer-assisted semen analyzer compared with laboratory-based manual semen analysis. *World Journal of Men's Health*. 2021;39(3):580-9.
9. Al Bijou AA, Eltaeb MA, Elghnudi AS, Alsharif AM, Ben Aissa R, Alshareea EA, et al. Cryopreservation increases sperm DNA fragmentation in normozoospermic Libyan men: the role of oxidative stress and the protective effect of melatonin. *Libyan Journal of Medicine*. 2025;20(1):2569151.
10. Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*. 2003;24(4):621-8.
11. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iulius GN, Zieschang JA, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*. 2009;24(9):2061-70.
12. Song SH, Kim KS, Yoon TK, Lee WS, Park HJ, Kim SY, et al. Semen quality and sperm DNA fragmentation in cancer patients undergoing sperm cryopreservation. *Investigative and Clinical Urology*. 2023;64(5):521-9.
13. Rochdi C, El Mhammedi MA, Boulbaroud S, Louanjli N, Walschaerts M, Chakib A, et al. Evaluation of sperm DNA fragmentation using Halosperm technique after the freezing-thawing process in men: a study on the validation of the SCD protocol. *Journal of Reproduction & Infertility*. 2024;25(1):45-52.
14. Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, Montag M, Dessole S, Nawroth F, et al. Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*. 2005;10(3):350-4.
15. Le MT, Nguyen TAT, Nguyen TTT, Nguyen VT, Nguyen DH, Nguyen HQ, et al. Does conventional freezing affect sperm DNA fragmentation? *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 2019;46(2):67-75.
16. Sugihara A, Ombelet W, Bosmans E, Cox A, Tournaye H, Verheyen G, et al. Sperm DNA fragmentation after cryopreservation and sperm selection has no implications for clinical pregnancies and live births after intrauterine insemination with donor sperm. *Journal of Personalized Medicine*. 2023;13(12):1668.
17. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. Geneva: WHO; 2021. Available from: World Health Organization
18. Khaledi S, Towhidi A, Movahedin M, Nikkhah M, Halvaei I. Evaluation of the effect of lecithin and nanolecithin in repairing membrane damage, maintaining membrane integrity, and improving human sperm function in the freezing-thawing process. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2024;41(11):2871-83.
19. Tamburrino L, Marchiani S, Minetti F, Forti G, Baldi E, Muratori M, et al. Semen cryopreservation and storage in liquid nitrogen: impact on chromatin compaction. *Andrology*. 2025;13(7):e13806.
20. Zini A, Agarwal A. A clinician's guide to sperm DNA and chromatin damage. Cham: Springer; 2018.
21. Zhang L, Li Y, Wang H, Zhao X, Liu J, Chen Y, et al. Damage to mitochondria during the cryopreservation, causing ROS leakage, leading to oxidative stress and decreased quality of ram sperm. *Reproduction in Domestic Animals*. 2024;59(10):e14737.
22. Zhang B, Shangguan A, Li J, Zhou L, Luo Y, Li D, et al. Freeze-thawing impairs the motility, plasma membrane integrity and mitochondria function of boar spermatozoa through generating excessive ROS. *BMC Veterinary Research*. 2021;17(1):97.
23. Gonzalez M, Prashar T, Connaughton H, Barry M, Robker R, Rose R. Restoring sperm quality post-cryopreservation using mitochondrial-targeted compounds. *Antioxidants*. 2022;11(9):1808.
24. Liu K, Chen Y, Wang X, Zhao M, Wu S, An R. Detection of sperm DNA damage in male infertility patients and evaluation of Levocarnitine efficacy using sperm chromatin diffusion (SCD) and AI-DFI methods: a cross-sectional study. *European Journal of Medical Research*. 2025;30(1):141.