MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA PHÂN MẢNH DNA TINH TRÙNG VÀ CÁC CHỈ SỐ TINH DỊCH ĐỒ Ở NAM GIỚI VÔ SINH

Lê Ngọc Tuệ Nhi[1], Trương Quốc Phong[1], Nguyễn Thị Tuyết Mai[2], Lê Quý Thưởng[2], Phạm Thái Hạ[2], Đoàn Xuân Kiên[2]

[1]Bệnh viện Sản Nhi Phú Thọ, [2]Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định mối tương quan giữa chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng (DFI - DNA fragmentation index) được đo bằng phương pháp khảo sát sự phân tán nhiễm sắc chất của tinh trùng (SCD - sperm chromatin dispersion test) và các chỉ số tinh dịch đồ ở nam giới vô sinh. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang thực hiện trên 150 mẫu tinh dịch của bệnh nhân nam được lấy bằng phương pháp thủ dâm tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản và nam học - Bệnh viện Sản Nhi Phú Thọ. Đánh giá các chỉ số tinh dịch đồ theo WHO (2021) và xác định chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng bằng phương pháp SCD. **Kết quả:** Chỉ số mức độ phân mảnh DNA tinh trùng tương quan nghịch với: mật độ tinh trùng ($r = -0,405$, $p<0,001$), tỷ lệ di động ($r = - 0,30$ và $p < 0,001$), tỷ lệ sống của tinh trùng ($r = - 0,31$ và $p < 0,001$), hình dạng tinh trùng ($r = -0,456$ và $p = <0,001$). Không có sự khác biệt nào về mức độ phân mảnh DNA của tinh trùng theo: độ tuổi, thời gian kiêng xuất tinh, thể tích xuất tinh, pH. **Kết luận:** Kết quả DFI-SCD có sự tương quan nghịch với: mật độ tinh trùng, tỷ lệ tinh trùng di động, tỷ lệ sống của tinh trùng, hình dạng tinh trùng. Không tìm thấy mối tương quan giữa DFI-SCD với: độ tuổi, thời gian kiêng xuất tinh, pH.

Từ khóa: Halosperm, phân mảnh DNA tinh trùng, vô sinh nam, SCD

RELATIONSHIP BETWEEN SPERM DNA FRAGMENTATION INDEX AND CONVENTIONAL SEMEN PARAMETERS IN MALE PATIENTS WITH INFERTILITY

Nhi Le Ngoc Tue[1], Phong Truong Quoc[1], Mai Nguyen Thi Tuyet[2], Thuong Le Quy[2], Ha Pham Thai[2], Kien Đoan Xuan[2]

[1] Phutho Obstetrics & Pediatrics Hospital, [2]Hanoi University of Science and Technology

ABSTRACT

Objectives: To determine the relationship between sperm chromatin dispersion test (SCD) parameters (DNA fragmentation index - DFI) and conventional semen parameters in male patients with infertility. **Subjects and methods:** A cross-sectional descriptive study was performed on 150 semen samples of male patients by masturbation at the Center for Assisted Reproduction and Andrology - Phu Tho Obstetrics & Pediatrics Hospital. Evaluation of semen parameters according to WHO (2021) and determination of sperm DNA fragmentation index by SCD method. **Results:** A significant negative association between DFI with: Sperm density (r = -0.405, p<0.001), Sperm Mobility (r = - 0.30 và p < 0.001), Vitality (r = - 0.31 và p < 0.001), Sperm Morphology (r = -0.456 và p = <0.001). There is no difference in the degree of sperm fragmentation by age, time to abstain from ejaculation, ejaculate volume, pH. **Conclusion:** SCD Parameters had a significant negative association with: Sperm density, Mobility Sperm, Vitality, Sperm Morphology. No correlation was found between DFI-SCD with: Age, time to abstain from ejaculation, pH.

Key words: Halosperm, Sperm DNA fragmentation, infertile men, Sperm chromatin dispersion test.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vô sinh là một vấn đề sức khỏe sinh sản cấp thiết và đang có xu hướng gia tăng trong xã hội hiện nay. Theo ghi nhận của y văn thế giới, tỷ lệ vô sinh nam khoảng 30-40%, và cách đây hơn thập kỷ, tỷ lệ nam giới điều trị hiếm muộn có liên quan đến tinh trùng bất thường chiếm 77,3 % [1].

Các trường hợp dị tật của tinh trùng tồn tại trong 30-50% các trường hợp vô sinh ở nam giới [2]. Những bất thường về các chỉ số tinh dịch đồ sẽ ảnh hưởng lên quá trình có thai tự nhiên. Tuy nhiên các tổn thương liên quan đến DNA tinh trùng (chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng-DFI) có thể là một trong những nguyên nhân dẫn đến thất bại trong điều trị vô sinh. Các nghiên cứu khác nhau đã chỉ ra rằng ở nam giới vô sinh có mức độ phân mảnh của DNA tinh trùng cao hơn so với nhóm sinh sản bình thường [3].

Hiện nay có nhiều kỹ thuật được sử dụng để đánh giá mức độ phân mảnh DNA tinh trùng: Sử dụng chất nhuộm acridine orange (AO), khảo sát cấu trúc chromatin tinh trùng (Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA), sử dụng chất nhuộm aniline blue (AB), sử dụng chất nhuộm toluidine blue (TB), đánh dấu phân mảnh DNA bằng các dUTP (Terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling - TUNEL), điện di tế bào đơn (COMET), khảo sát mức độ phân tán nhiễm sắc chất của tinh trùng (Sperm Chromatin Dispersion - SCD). Phương pháp SCD là một trong những phương pháp phổ biến với trang thiết bị và kỹ thuật đơn giản, chi phí thấp, và là phương pháp tiềm năng hỗ trợ cho chẩn đoán và điều trị của các cặp vợ chồng hiếm muộn. Vì vậy, mục tiêu nghiên cứu của chúng tôi tiến hành đánh giá có hay không mối tương quan giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng với các chỉ số tinh dịch đồ nhằm nâng cao chất lượng trong điều trị vô sinh.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu tinh dịch của 150 bệnh nhân nam được lấy bằng phương pháp thủ dâm tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản và nam học - Bệnh viện Sản Nhi tỉnh Phú Thọ từ tháng 3/2021 đến 3/2022.

Tiêu chuẩn loại trừ: Loại bỏ các mẫu tinh dịch có thể tích <1ml hoặc các mẫu không có hoặc rất ít tinh trùng (Azoospermia).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

2.2.1. Phương pháp thu nhận mẫu tinh dịch từ bệnh nhân

Mẫu tinh dịch sau khi được thu nhận bằng phương pháp thủ dâm sẽ được đánh giá các chỉ số tinh dịch đồ theo chuẩn WHO (2021) [4]. Mẫu được lưu trữ tại phòng lưu Lab IVF- Trung tâm Hỗ trợ sinh sản và nam học - Bệnh viện Sản Nhi tỉnh Phú Thọ.

Tiêu chuẩn đánh giá tinh dịch đồ theo WHO (2021)

- Thể tích tinh dịch: ≥ 1,4ml.
- pH ≥ 7,2.
- Mật độ tinh trùng: ≥ 16.10^6/ml.
- Tổng số tinh trùng: ≥ 39.10^6/lần xuất tinh.
- Độ di động của tinh trùng (PR+NP) ≥ 40%
  + Di động tiến tới (PR - *Progressive)* ≥ 30%
  + Di động không tiến tới (NP - *Non-progressive)*
- Hình dạng bình thường ≥ 4%.
- Tỉ lệ sống: ≥ 54%.

Phương pháp khảo sát mức độ phân tán chất nhiễm sắc của tinh trùng (SCD)

- Pha loãng mẫu tinh dịch với PBS đến nồng độ khoảng 5-10x10^6TT/ml trước khi làm xét nghiệm.
- Hóa lỏng thạch agarose bằng nước nóng ở nhiệt độ 90-100^0C hoặc quay lò vi sóng.
- Chuyển ống thạch qua nhiệt độ 37^0C/5 phút
- Hút 25µl tinh dịch cho vào ống thạch và trộn đều.
- Nhỏ 10-15µl hỗn hợp trên lên mỗi giếng của slide, nhẹ nhàng đậy lamen lên trên và để slide trong tủ lạnh nhiệt độ 4^0C/5 phút
- Nhẹ nhàng tháo lamen ra và ngâm slide vào hỗn hợp acid đã pha loãng trong 7 phút
- Ngâm Slide trong dung dịch Lysis 25 phút

- Ngâm slide trong khay nước cất/5 phút
- Lần lượt ngâm slide trong khay cồn 70, 90, 100^0 mỗi nồng độ cồn/2 phút
- Để lam khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng và tiến hành nhuộm
- Phân tích kết quả dưới kính hiển vi quang học và nhận định kết quả tinh trùng có:
  + 1): Quầng sáng halo rộng
  + (2): Quầng sáng halo trung bình
  + (3): Quầng sáng halo nhỏ
  + (4): Không có quầng sáng halo
  + (5): Tinh trùng thoái hóa nhân
  + (1) (2): Tinh trùng không bị phân mảnh DNA
  + (3) (4) (5): Tinh trùng bị phân mảnh DNA

$$\% \text{ tinh trùng bị phân mảnh DNA} = \frac{\text{Số tinh trùng bị phân mảnh}}{\text{Tổng số tinh trùng quan sát được}} \times 100$$

2.2.2. Các biến số trong nghiên cứu

Các biến số trong nghiên cứu gồm: độ tuổi, thời gian kiêng xuất tinh, pH, mật độ tinh trùng, độ di động, tỷ lệ sống, hình dạng tinh trùng và chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng.

2.2.3. Phân tích số liệu

Dữ liệu thu được sẽ được xử lý bằng phần mềm SPSS.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Đặc điểm nhóm tuổi và các chỉ số tinh dịch đồ của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm về tuổi và các chỉ số tinh dịch đồ của 150 bệnh nhân đến khám và điều trị tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản và nam học - Bệnh viện Sản Nhi tỉnh Phú Thọ trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm tinh dịch đồ của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm	Trung bình±độ lệch chuẩn	Giới hạn
Độ tuổi	34,83 ± 7,03	17 - 58
Thời gian kiêng xuất tinh (ngày)	3,57 ± 1,84	1 - 12
Độ pH	7,38 ± 0,16	7.0 - 7,69
Mật độ tinh trùng *(10^6 tinh trùng/ml)*	44,70 ± 26,36	1 - 175
Di động (PR+NP) (%)	48,63 ± 14,98	0 - 83
Tỉ lệ sống *(%)*	52,38 ± 14,95	0 - 85
Hình dạng tinh trùng *(%)*	3,26 ± 11,53	1 - 8,4

Theo số liệu bảng 1, độ tuổi trung bình đến khám vô sinh là 34,83 tuổi. Các chỉ số tinh dịch đồ bao gồm thời gian kiêng xuất tinh từ 1 - 12 ngày, tinh dịch chủ yếu có chỉ số pH ≥ 7,2, tỷ lệ sống trung bình là 52,38% nhưng có sự dao động từ 0-85%, điều này chỉ ra rằng chất lượng tinh trùng kém có trong một nhóm bệnh nhân.

3.2. Mối liên hệ giữa độ tuổi với mức độ phân mảnh DNA tinh trùng

Để đánh giá mối liên hệ giữa độ tuổi của bệnh nhân với DFI tinh trùng trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chia độ tuổi của bệnh nhân thành hai nhóm tuổi của bệnh nhân ≤ 35 tuổi và > 35 tuổi với mức độ phân mảnh DNA tinh trùng được thể hiện dưới bảng 2 như sau:

Bảng 2. Mối liên hệ giữa độ tuổi với DFI tinh trùng

Tuổi	Số lượng	DFI (%)	P-Value
≤ 35 tuổi	83 (55,33%)	24,51 ± 17,30	0,221
> 35 tuổi	67 (44,67%)	28,36 ± 21,00	

Theo số liệu thống kê trong bảng 2, không khác biệt có ý nghĩa thống kê (p=0,221) giữa DFI tinh trùng với độ tuổi của bệnh nhân ≤ 35 tuổi và > 35 tuổi. Điều này cũng chỉ ra rằng, ở bất cứ độ tuổi nào DNA của tinh trùng vẫn có thể bị phân mảnh. Một kết quả tương tự cũng đã được Salah Elbashir chỉ ra trước đó với p = 0,076 [5].

3.3. Mối liên hệ giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng với thời gian kiêng xuất tinh

Theo khuyến cáo của WHO, 2021 thì thời gian kiêng xuất tinh đối với các trường hợp khi đến khám và điều trị vô sinh sẽ nằm trong khoảng từ 2 đến 7 ngày. Ngiên cứu của chúng tôi về mối liên hệ giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và thời gian kiêng xuất tinh được chia thành 3 nhóm thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Mối liên hệ giữa mức độ DFI tinh trùng với thời gian kiêng xuất tinh

Thời gian kiêng xuất tinh	Số lượng	DFI (%)	P-Value
< 2 ngày	19 (12,67)	27,10 ± 22,00	0,192
2-7 ngày	127 (84,67%)	25,57±18,19	
> 7 ngày	4 (2,66%)	43,07 ± 29,42	

Từ kết quả bảng 3 cho thấy không có sự khác biệt giữa thời gian kiêng xuất tinh và mức độ phân mảnh DNA tinh trùng với giá trị p = 0,192. Kết quả tương tự cũng được chỉ ra trong nghiên cứu của Sergerie M. và cộng sự (2005 [6].

3.4. Mối liên hệ giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng với độ pH của tinh dịch

Giá trị pH của tinh dịch được xác định sau khi bệnh nhân xuất tinh từ 30 phút đến 1 giờ sẽ đo bằng máy đo pH và ghi nhận giá trị pH. Ở trạng thái bình thường, dịch túi tinh mang tính kiềm với pH từ 7,2 - 8. Bảng 4 thể hiện mối liên hệ giữa pH và DFI tinh trùng.

Bảng 4. Mối liên hệ giữa DFI tinh trùng với độ pH của tinh dịch

pH	Số lượng	DFI (%)	P-Value
< 7,2	24 (16%)	27,43 ± 22,02	0,738
≥ 7,2	126 (84%)	26,00 ± 18,54	

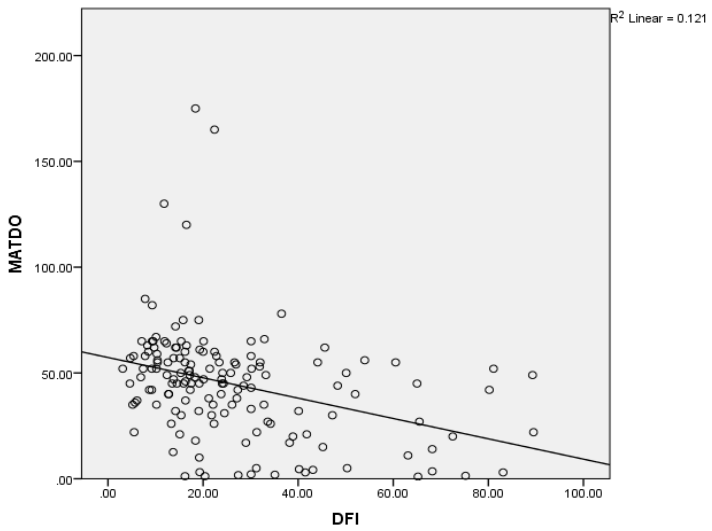
Số liệu ở bảng 4 chỉ ra rằng sự không có sự khác biệt giữa độ pH và DFI tinh trùng với giá trị p = 0,738. Kết quả trong nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Lê Minh Tâm và cộng sự (2019) [7].

3.5. Mối liên hệ giữa mức độ phân mảnh DNA với mật độ tinh trùng

Theo WHO, 2021, giới hạn tối thiểu của mật độ tinh trùng trong một lần xuất tinh là 16.10^6 (TT/ml). Vì vậy, để đánh giá mối liên hệ giữa DFI tinh trùng, chúng tôi chia mật độ tinh trùng thành hai nhóm và mối liên hệ này được thể hiện như trong bảng 5.

Bảng 5. Mối liên hệ giữa DFI tinh trùng với mật độ tinh trùng

Mật độ tinh trùng (TT/ml)	**Số lượng**	**DFI (%)**	**P-Value**
$< 16.10^6$	19 (12,67%)	43,46 ± 21,78	<0,001
$\geq 16.10^6$	131 (87,33%)	23,73 ± 17,36	



Hình 1. Biểu đồ thể hiện mối tương quan giữa DFI tinh trùng với mật độ tinh trùng

Kết quả ở bảng 1 cho thấy giữa hai nhóm mật độ và DFI tinh trùng có mối liên hệ với ý nghĩa thống kê được xác định giá trị p <0,001 và có mối tương quan nghịch với hệ số tương quan r = -0,405, p<0,001 (Hình 1).

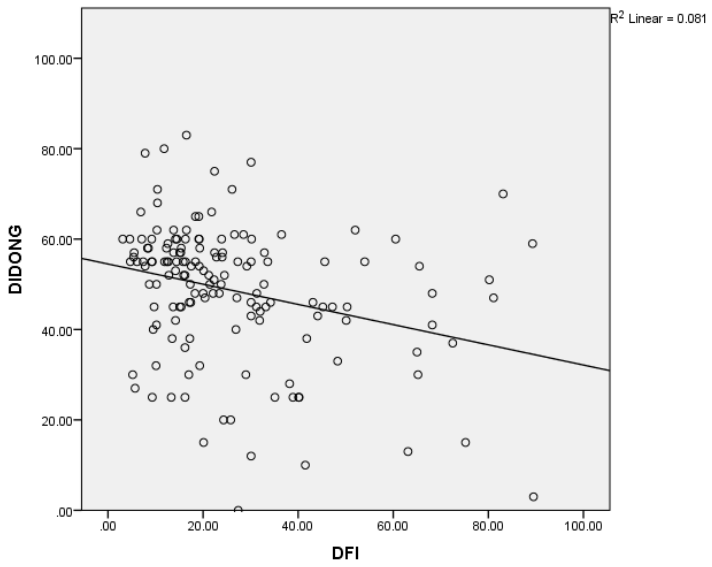
Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp nghiên cứu của Lê Minh Tâm và cộng sự (2019) [7].

3.6. Mối liên hệ giữa mức độ phân mảnh DNA với độ di động của tinh trùng

Độ di động của tinh trùng được đánh giá theo WHO, 2021. Để đánh giá mối liên hệ giữa độ di động của tinh trùng với DFI tinh trùng, độ di động của tinh trùng được chia thành 2 nhóm, thể hiện ở bảng 5, hình 2.

Bảng 5. Mối liên hệ giữa DFI tinh trùng với độ di động của tinh trùng

Di động	Số lượng	DFI (%)	P-Value
PR+NP ≥ 40%	124 (82,67%)	24,38 ± 17,39	0,009
PR+NP < 40%	26 (17,33%)	35,06 ± 24,09	



Hình 2. Biểu đồ thể hiện mối liên hệ giữa DFI tinh trùng với độ di động của tinh trùng

Chỉ số di động được phân tích bao gồm chỉ số tinh trùng di động tiến tới (PR) và chỉ số di động không tiến tới (NP). Độ di động tối thiểu của một người nam bình thường là 40% cho cả PR và NP.

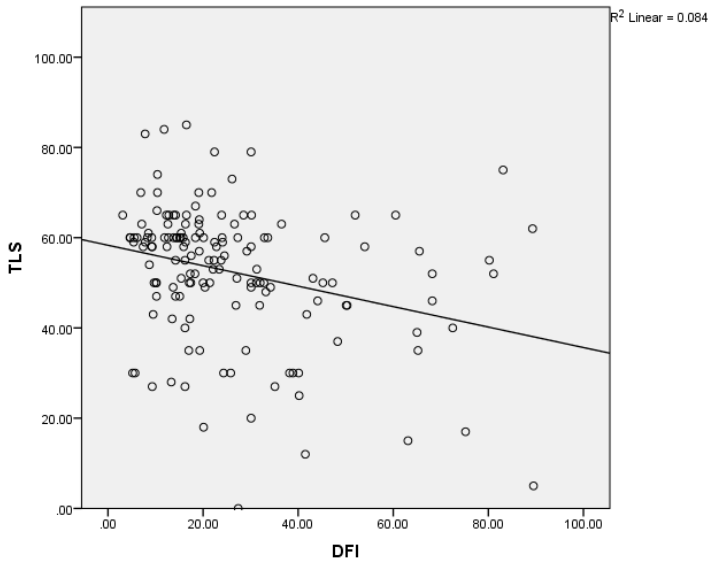
Kết quả ở bảng 5 cho thấy mối liên hệ giữa hai nhóm về độ di động tinh trùng với DFI tinh trùng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị p = 0,009 và có một mối tương quan nghịch được chỉ ra với hệ số tương quan r = - 0,30 và p < 0,001 (Hình 2). Nghiên cứu đồng kết quả với Sivanarayana và cộng sự (2014) [8], Lê Minh Tâm và cộng sự (2019) [7], Dương thị Nhàn và cộng sự (2020) [9].

3.7. Mối liên hệ giữa mức độ phân mảnh DNA với tỷ lệ sống của tinh trùng

Dựa theo WHO, 2021, để đánh giá mối liên hệ giữa DFI tinh trùng và tỷ lệ sống của tinh trùng. Tỷ lệ sống của tinh trùng được chia thành hai nhóm: nhóm tinh trùng có tỷ lệ sống (TLS) < 54% và nhóm tinh trùng có TLS > 54%. Dữ liệu được thống kê trong bảng 6, hình 3.

Bảng 6. Mối liên hệ giữa DFI tinh trùng với tỷ lệ sống của tinh trùng

Tỉ lệ sống (TLS)	Số lượng	DFI (%)	P-Value
TLS <54%	71 (47,33%)	31,42 ± 19,47	0,001
TLS ≥ 54%	79 (52,67%)	21,56 ± 17,54	



Hình 3. Biểu đồ thể hiện mối tương quan giữa DFI tinh trùng với tỷ lệ sống của tinh trùng

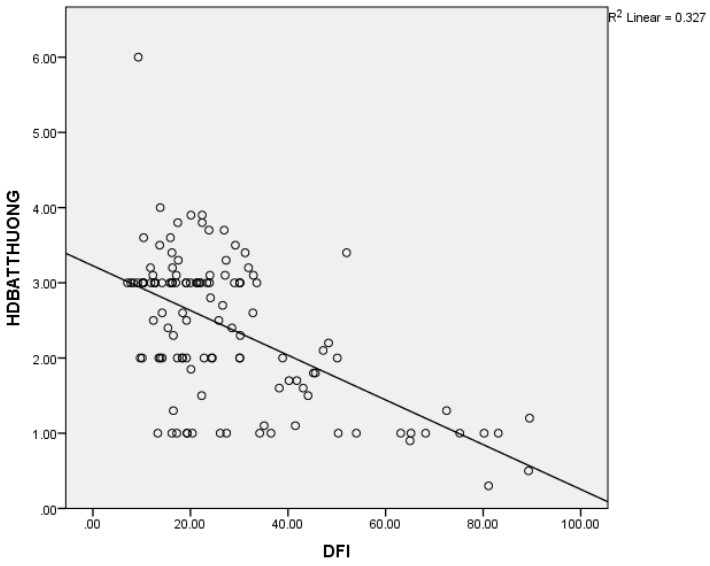
Trong bảng 6 và hình 3 cho thấy giữa hai nhóm tỷ lệ sống <54% có mức độ phân mảnh DNA tinh trùng cao hơn so với nhóm tỷ lệ sống ≥ 54%. Thống kê này có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p = 0,001 và một mối tương quan nghịch cũng được chỉ ra giữa DFI và tỷ lệ sống của tinh trùng với hệ số tương quan r = -0,31 và p < 0,001. Kết quả nghiên cứu phù hợp với Salah Elbashira và cộng sự (2018) [4], Dương Thị Nhàn (2020) [9].

3.8. Mối liên hệ giữa mức độ phân mảnh DNA với hình dạng của tinh trùng

Mối liên hệ giữa DFI tinh trùng với hình dạng của tinh trùng (HD) được thể hiện trong bảng 7, hình 4 và được chia thành hai nhóm: nhóm tinh trùng có hình dạng bất thường (HD < 4) và nhóm tinh trùng có hình dạng bình thường (HD ≥ 4).

Bảng 7. Mối liên hệ giữa DFI tinh trùng với hình dạng của tinh trùng

Hình dạng tinh trùng (HD)	**Số lượng**	**DFI (%)**	**P-Value**
Bình thường (HD ≥ 4)	29 (19,33%)	18,21 ± 18,73	0,011
Bất thường (HD < 4)	121 (80,67%)	28,15 ± 18,72	



Hình 4. Biểu đồ thể hiện mối tương quan giữa DFI tinh trùng với hình dạng của tinh trùng

Theo dữ liệu thống kê trong bảng trên, chúng tôi đã tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p=0,011) khi đánh giá mối liên hệ giữa DFI với hình dạng tinh trùng (HD) đã chỉ ra có mối tương quan nghịch với hệ số tương quan r = -0,456 và p = <0,001.

Kết quả này cũng phù hợp với Daris B. và cộng sự (2010), những tinh trùng có bất thường ở đầu, đặc biệt là đầu có hình dạng bất định, được báo cáo là có liên quan đến khả năng DNA bị phân mảnh cao [10].

4. KẾT LUẬN

Không có mối liên hệ giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng với các đặc điểm về độ tuổi, thời gian kiêng xuất tinh. Tuy nhiên có sự tương quan nghịch giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng với: mật độ tinh trùng, tỷ lệ di động, tỷ lệ sống của tinh trùng, hình dạng tinh trùng. Dựa vào kết quả này, việc ứng dụng xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng trên lâm sàng là rất cần thiết để góp phần tiên lượng, điều trị bệnh nhân vô sinh nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC, Ko E, Ramasamy R, Zini A. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. Transl Androl Urol. 2016; 5(6):935-950.
2. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. Fertil Steril. 2003 Oct; 80(4):895-902.
3. Alvarez JG. DNA fragmentation in human spermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility. Minerva Ginecol, 2003 Jun; 55(3):233-9.
4. World Health Organization, Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 2021.
5. Elbashir S, Magdi Y, Rashed A, AhmedIbrahim M, Edris Y, Abdelaziz AM. Relationship between sperm progressive motility and DNA integrity in fertile and infertile men. Middle East Fertility Society Journal. 2018; 23(3):195-1978
6. Sergerie M, Laforest G, Boulanger K, Bissonnette F, Blea G. Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labelling assay. Human Reproduction. 2005; 20(7):1921-1927.
7. Lê Minh Tâm, Trần Thị Như Quỳnh, Lê Đình Dương, Cao Ngọc Thành. Một số yếu tố liên quan phân mảnh DNA tinh trùng. Tạp chí Phụ sản. 2019; 17(1):54-61.
8. Sivanarayana T, Krishna CR, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K, Sudhakar G, Raju GAR. Sperm DNA fragmentation assay by sperm chromatin dispersion (SCD): correlation between DNA fragmentation and outcome ofintracytoplasmic sperm injection. Reproductive medicine and biology. 2014; 13(2): 87-94.
9. Dương Thị Nhàn. Đánh giá mối liên hệ giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và các chỉ số tinh dịch đồ ở nam giới vô sinh đến khám và điều trị tại Bệnh viện A thái Nguyên. Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Thái Nguyên. 2020; 8(225):105-111.
10. Daris B, Goropevsek A, Hojnik N, Vlaisavljević V. Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. Archives of gynecology and obstetrics. 2010; 281(2):363-367.