

## CHẤT LƯỢNG TINH TRÙNG SAU BẢO QUẢN LẠNH SÂU Ở NHỮNG MẪU NHƯỢC TINH ĐÃ ĐƯỢC LỌC RỬA

Nguyễn Khang Sơn\*; Phạm Thị Thu Thủy\*\*

### TÓM TẮT

Đánh giá chất lượng tinh trùng của 30 mẫu tinh dịch nhược tinh theo tiêu chuẩn của WHO (1999) (tỷ lệ tinh trùng di động a+b dưới 50%) sau bảo quản lạnh (BQL) được lọc rửa, bảo quản lạnh sâu trong 1, 10, 30 ngày. Sử dụng các chỉ tiêu nghiên cứu để đánh giá và so sánh chất lượng tinh trùng trước và sau lọc rửa; trước và sau bảo quản lạnh giữa các nhóm nghiên cứu. Kết quả: việc lọc rửa đã cải thiện chất lượng tinh trùng rõ rệt ở những mẫu nhược tinh. Tuy nhiên, chất lượng tinh trùng sau BQL sâu giảm rõ rệt ở những mẫu nhược tinh được lọc rửa trước bảo quản. Thời gian BQL càng dài, chất lượng tinh trùng càng giảm.

\* Từ khoá: Lọc rửa tinh trùng; Bảo quản lạnh tinh trùng; Nhược tinh.

## QUALITATIVE ASSESSMENT OF WASHED HUMAN-CRYOPRESERVED ASTHENOSPERMIC SPERM

### SUMMARY

*Evaluate the quality of sperm after which washed asthenospermic human sperm cryopreserved in 30 asthenospermic semen samples according to the standard of WHO (1999) (motility a+b under 50%). Each sample washed spermatozoa. All samples were cryopreserved in 1, 10 and 30 days. Evaluating and comparing the quality of sperm before and after which is washed, pre-cryopreservation and post-cryopreservation between the groups. Results: The quality of sperm after washing was more significantly improved than before washing. Post-cryopreservation, the quality of sperm was significantly reduced time by time. The qualitative sperm post-cryopreservation was significantly reduced in washed asthenospermic semen sample. The quality of sperm washed reduced time by time.*

\* Key words: Sperm washing; Sperm cryopreservation; Asthenospermia.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc bảo quản lạnh đối với các mẫu tinh dịch nhược tinh (tinh trùng di động kém) trước khi thực hiện kỹ thuật thụ tinh nhân tạo hoặc thụ tinh trong ống nghiệm vô cùng cần thiết. Sự thành công của việc BQL tinh trùng được quyết định bởi chất lượng tinh trùng (TT) sau bảo quản phải đảm bảo cho

việc thụ tinh và cho ra đời những em bé hoàn toàn bình thường. Tuy nhiên, quá trình trữ lạnh TT trong nitơ lỏng luôn tiềm ẩn nguy cơ lây nhiễm chéo các vi sinh vật (như HCV, HIV...), do đó đặt ra nhu cầu phải lọc rửa TT trước bảo quản lạnh. Tuy nhiên, những mẫu TT đã được lọc rửa trước khi BQL, chất lượng TT sau bảo quản có thay đổi nhiều so với trước bảo quản hay không,

\* Trường Đại học Y Hà Nội

\*\* Trường Đại học Y Hải Phòng

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Đình Tảo  
PGS. TS. Quân Hoàng Lâm

đặc biệt với những mẫu nhược tinh?. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu: *Đánh giá chất lượng TT sau BQL sâu ở những mẫu tinh dịch nhược tinh đã được lọc rửa trước bảo quản.*

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng nghiên cứu.

30 mẫu tinh dịch người có kết quả tinh dịch đồ nhược tinh theo tiêu chuẩn của WHO 1999 (tỷ lệ tinh trùng di động a+b dưới 50%). Các mẫu được lọc rửa và BQL sâu theo quy trình của Labo Bảo quản mô, Trường Đại học Y Hà Nội.

### 2. Phương pháp nghiên cứu.

Nghiên cứu can thiệp, đánh giá trước và sau can thiệp.

Số liệu được xử lý theo phần mềm SPSS 16.0, kiểm định bằng t-test.

Nghiên cứu thực hiện tại Labo Bảo quản mô, Trường Đại học Y Hà Nội từ tháng 2 - 2011 đến 10 - 2011.

### 3. Kỹ thuật và chỉ tiêu nghiên cứu.

*\* Xét nghiệm tinh dịch:*

Đánh giá mẫu tinh dịch một số chỉ số theo tiêu chuẩn WHO (1999) [7].

- Xác định độ ly giải, độ quánh, màu sắc, thể tích, độ pH của tinh dịch.

- Đánh giá mật độ TT (triệu TT/ml) và tỷ lệ di động (% loại a, b, c, d).

- Đánh giá hình thái vi thể TT.

*\* Kỹ thuật chuẩn bị TT:*

Lọc rửa mỗi mẫu tinh dịch (1,5 ml) theo phương pháp thang nồng độ; sử dụng Sil

select để lọc và Ferticult để rửa TT theo qui trình thường quy [1, 3].

*\* Bảo quản lạnh TT:*

Môi trường BQL: Sperm Freeze (Ferti-Pro, Bỉ); tỷ lệ: 0,7 ml/1 ml tinh dịch

Chia mỗi mẫu tinh dịch thành 3 phần đều nhau để BQL trong nitơ lỏng. Các mẫu được rã đông ở 3 thời điểm: 1 ngày, 10 ngày và 30 ngày.

Hạ nhiệt mẫu ở cổ bình nitơ lỏng, theo kinh nghiệm của Labo Bảo quản mô, Trường Đại học Y Hà Nội [1].

*\* Các biến số nghiên cứu:*

- Các chỉ số xét nghiệm tinh dịch đồ.

- Chỉ số CSF (chỉ số sống lạnh - cryosurvival factor) TT di động = (% TT di động sau BQL: % TT di động trước BQL) × 100%.

- Chỉ số CSF TT di động tiến tới = (% TT di động tiến tới sau BQL: % TT di động tiến tới trước BQL) × 100%.

- Tỷ lệ TT có hình thái vi thể bình thường.

So sánh các chỉ số trước và sau bảo quản.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 1. Chất lượng mẫu TT sau lọc rửa.

Hình ảnh vi thể của mẫu TT sau lọc rửa cho thấy việc lọc rửa đã loại bỏ được phần lớn tế bào tròn, mảnh vỡ tế bào và tinh tương. Các chỉ số về chất lượng TT sau lọc rửa cũng có sự cải thiện rõ rệt.

**Bảng 1:** So sánh một số chỉ số về chất lượng TT trước và sau lọc rửa.

THỜI ĐIỂM CHỈ SỐ CHẤT LƯỢNG TT	TRƯỚC RỬA ( $\bar{X} \pm SD$ )	SAU RỬA ( $\bar{X} \pm SD$ )	p
Mật độ (triệu/ml)	73,63 ± 37,07	32,47 ± 26,37	< 0,001
Di động (%)	49,10 ± 8,14	86,37 ± 9,83	< 0,001
Di động tiến tới (a+b) (%)	36,90 ± 7,80	68,83 ± 13,03	< 0,001
Tỷ lệ TT hình thái bình thường (%)	11,07 ± 4,40	18,80 ± 6,63	< 0,001

Mật độ TT sau lọc rửa giảm nhiều so với trước lọc rửa. Các chỉ số khác sau lọc rửa đều tăng có ý nghĩa thống kê so với trước lọc rửa.

**2. Ảnh hưởng của BQL sâu đối với các mẫu nhược tinh đã được lọc rửa.**

*\* Khả năng di động của TT sau BQL ở những mẫu nhược tinh đã được lọc rửa:*

**Bảng 2:** So sánh tỷ lệ (%) TT di động và TT di động tiến tới trước và sau BQL 1 ngày, 10 ngày, 30 ngày.

THỜI ĐIỂM NGHIÊN CỨU CÁC CHỈ SỐ		TRƯỚC BQL	SAU BQL		
			1 ngày	10 ngày	30 ngày
TT di động (%)	( $\bar{X} \pm SD$ )	86,37 ± 9,83	24,2 ± 13,90	17,8 ± 11,25	12,7 ± 9,23
	p (so với trước BQL)	-	< 0,001	< 0,001	< 0,001
TT di động tiến tới (%)	( $\bar{X} \pm SD$ )	68,8 ± 13,03	11,67 ± 9,77	8,50 ± 7,24	5,53 ± 4,23
	p (so với trước BQL)	-	< 0,001	< 0,001	< 0,001

*\* Biến đổi về hình thái vi thể TT sau BQL:*

**Bảng 3:** So sánh tỷ lệ (%) TT có hình thái vi thể bình thường trước và sau BQL 1 ngày, 10 ngày, 30 ngày.

THỜI ĐIỂM NGHIÊN CỨU		TỶ LỆ (%) TT CÓ HÌNH THÁI BÌNH THƯỜNG ( $\bar{X} \pm SD$ )	p (với trước BQL)
Trước BQL		18,80 ± 6,63	-
Sau BQL	1 ngày	11,87 ± 4,85	< 0,001
	10 ngày	9,50 ± 4,08	< 0,001
	30 ngày	7,47 ± 3,71	< 0,001

Tỷ lệ TT di động, TT di động tiến tới và TT có hình thái bình thường sau bảo quản ở tất cả các khoảng thời gian bảo quản đều giảm có ý nghĩa thống kê so với trước bảo quản. Các tỷ lệ này có giá trị trung bình thấp nhất sau bảo quản 30 ngày và cao nhất sau bảo quản 1 ngày.

### 3. Ảnh hưởng của thời gian BQL đến chất lượng các mẫu nhược tinh đã được lọc rửa.

Bảng 4: So sánh chỉ số chất lượng TT (%) sau thời gian BQL 1 ngày, 10 ngày, 30 ngày.

THỜI GIAN BQL CÁC CHỈ SỐ	1 NGÀY ( $\bar{X} \pm SD$ ) (I)	10 NGÀY ( $\bar{X} \pm SD$ ) (II)	30 NGÀY ( $\bar{X} \pm SD$ ) (III)	p
CSF di động (%)	24,20 $\pm$ 13,9	17,80 $\pm$ 11,25	12,77 $\pm$ 9,23	$p_{I/II} < 0,01$ $p_{I/III} < 0,001$ $p_{II/III} < 0,001$
CSF di động tiến tới (%)	11,67 $\pm$ 9,77	8,50 $\pm$ 7,24	5,80 $\pm$ 5,53	$p_{I/II} < 0,01$ $p_{I,III} < 0,001$ $p_{II/III} < 0,001$
Tỷ lệ TT có hình thái bình thường (%)	11,87 $\pm$ 4,85	9,50 $\pm$ 4,08	7,47 $\pm$ 3,71	$p_{I/II} < 0,01$ $p_{I/III} < 0,001$ $p_{II/III} < 0,001$

Ở những mẫu nhược tinh đã lọc rửa, sau bảo quản lạnh từ 1 - 30 ngày, các chỉ số chất lượng CFS di động, CFS di động tiến tới và tỷ lệ TT có hình thái bình thường giảm dần theo thời gian bảo quản.

## BÀN LUẬN

### 1. Kỹ thuật lọc rửa và đông lạnh TT.

Việc lọc rửa TT trước BQL giúp làm giảm thiểu nguy cơ tạp nhiễm và lây chéo trong quá trình trữ lạnh [3, 4, 8]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật lọc rửa TT bằng thang nồng độ, là phương pháp có hiệu quả đối với các mẫu TT bất thường. Việc lọc rửa TT đã giúp loại bỏ phần lớn các mảnh vỡ tế bào, tinh tương và nhiều TT bất thường. Do đó, sau lọc rửa, mật độ TT giảm, trong khi tỷ lệ TT di động và TT hình thái bình thường tăng lên đáng kể (bảng 1). Kết quả này phù hợp với nhận định của nhiều tác giả [1, 2, 3].

Môi trường Sperm Freeze sử dụng là môi trường BQL, đang được sử dụng rộng rãi ở các trung tâm hỗ trợ sinh sản, vì hiệu quả và tính tiện lợi của nó [1, 4].

Phương pháp hạ nhiệt độ theo kinh nghiệm, từ cổ bình nitơ lỏng có sử dụng đầu dò cảm nhiệt là quy trình rất đơn giản, rẻ tiền, có thể áp dụng ở mọi tuyến y tế mà vẫn bảo đảm tốc độ hạ nhiệt theo ý muốn.

### 2. Khả năng di động của TT sau BQL.

Trong nghiên cứu này, ở cả 3 khoảng thời gian bảo quản, tỷ lệ di động và tỷ lệ di động tiến tới của TT đều thấp hơn rõ rệt so với trước bảo quản (bảng 2, 3, 4). Kết quả này phù hợp với báo cáo của nhiều tác giả [1, 5, 8].

Do tác động của quá trình đông lạnh, khả năng di động của TT giảm là đương nhiên. Tuy nhiên, mong muốn của các tác giả là có được tỷ lệ TT di động cao nhất có thể sau BQL. Hiệp hội Ngân

hàng Mô Hoa Kỳ đã đưa ra tiêu chuẩn đánh giá sự thành công của việc BQL sâu TT người bình thường là: chỉ số CFS di động của TT đạt  $\geq 50\%$  [6]. Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện trên những mẫu nhược tinh đã lọc rửa, cho thấy, sau bảo quản, chỉ số CSF di động và chỉ số CSF di động tiến tới đều giảm rất nhiều ( $p < 0,001$ ) và đều chưa đạt đến 50% (bảng 2, 3, 4).

Chúng tôi còn thấy giảm tỷ lệ di động TT bảo quản theo thời gian ở mẫu đã lọc rửa. Thời gian bảo quản càng dài, chất lượng TT càng giảm. Ở cả 3 khoảng thời gian bảo quản, tỷ lệ di động của TT đều giảm đi có ý nghĩa thống kê. Theo kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả tiến hành trên mẫu TT bình thường: thời gian bảo quản lạnh không ảnh hưởng đáng kể lên tỷ lệ TT di động [2, 8]. Nghiên cứu của Nguyễn Phương Thảo Tiên (2007) thấy, tỷ lệ TT di động sau bảo quản 1 ngày và 2 ngày không có sự khác biệt rõ rệt; chỉ sau bảo quản 30 ngày, tỷ lệ di động của TT mới giảm đi có ý nghĩa thống kê [1]. Kết quả các tác giả khác với nghiên cứu của chúng tôi có thể do đối tượng nghiên cứu này là những mẫu nhược tinh, sức bền TT kém, nên khả năng chịu lạnh của TT cũng giảm đi. Tuy nhiên, để có kết luận chính xác, cần có nghiên cứu tiếp theo với cỡ mẫu lớn hơn.

### 3. Biến đổi hình thái vi thể của TT sau BQL.

Nghiên cứu về sự biến đổi hình thái TT sau BQL, Esteves (2007), Nguyễn Phương Thảo Tiên (2007) cho biết: sau BQL, tỷ lệ TT có hình thái vi thể bình thường giảm đi có ý nghĩa thống kê so với trước BQL [1, 5]. Kết quả của chúng

tôi tương tự: sau thời gian BQL 1 ngày, tỷ lệ TT hình thái bình thường đã giảm đi 37% so với trước BQL (bảng 3). Hình thái vi thể bất thường của TT sau BQL trong nghiên cứu này chủ yếu là bất thường về đầu, cổ và một tỷ lệ nhỏ bất thường phối hợp.

### KẾT LUẬN

Chất lượng TT sau BQL sâu ở những mẫu tinh dịch nhược tinh đã lọc rửa giảm có ý nghĩa thống kê so với trước BQL. Thời gian BQL càng dài ngày, chất lượng TT càng giảm.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Phương Thảo Tiên. Đánh giá chất lượng TT sau BQL sâu ở những mẫu TT người đã được lọc rửa. Luận văn Thạc sỹ Y học. Trường Đại học Y Hà Nội. 2007.
2. Chen Y, Liu RZ. Cryopreservation of spermatozoa. Human Reproduction. 2007, 13 (8), pp.734-738.
3. Counsel M, Bellinge R, Burton P. Vitality of oligozoospermic semen samples is improved by both swim-up and density gradient centrifugation before cryopreservation. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2004, 21 (5), pp.137-142.
4. Donnelly Eilish T, Mc Clure N, Lewis Sheena E.M. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. Fertility and Sterility. 2001, 76 (5), pp.892- 900.
5. Esteves S.C, Spaine D.M, Cedenho A.P. Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreservation by the liquid nitrogen vapor method. Braz J Med Biol Res. 2007, 40 (7), pp.985-992.

6. *Sherman J.K.* Cryopreservation of human semen. CRC Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility. 1999, pp.229-258.

7. *World Health Organisation.* WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interation. Fourth edition. Cambridge University Press. 1999, 34.

8. *Yogev L, Kleiman SE, Shabtai E.* Long-term cryostorage of sperm in a human sperm bank does not damage progressive motility concentration. Human Reproduction. 2010, 25 (5), pp.1027-1030.

