

Nghiên cứu chất lượng phôi nang thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng sau trữ lạnh bằng thủy tinh hoá

Nguyễn Thị Thái Thanh^{1*}, Nguyễn Văn Trung¹, Võ Văn Chính², Lê Minh Tâm^{1,3}

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

² Bệnh viện Bình An Quảng Nam

³ Bộ môn Phụ sản, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

doi: 10.46755/vjog.2023.2.1590

Tác giả liên hệ (Corresponding author): Nguyễn Thị Thái Thanh, email: nttthanh.huecrei@bv.huemed-univ.edu.vn

Nhận bài (received): 20/4/2023 - Chấp nhận đăng (accepted): 20/5/2023.

Tóm tắt

Mục tiêu: Kỹ thuật trữ lạnh tinh trùng phát triển đã mở ra cơ hội có con rất là cao đối với các trường hợp vô sinh nam. Trong các phương pháp trữ lạnh, thủy tinh hóa đang là một kỹ thuật được nghiên cứu nhiều và dần được áp dụng rộng rãi. Mặc dù thủy tinh hóa tinh trùng có nhiều ưu điểm nhưng việc ứng dụng thủy tinh hóa tinh trùng trong thụ tinh ống nghiệm vẫn chưa thể thay thế cho phương pháp trữ lạnh truyền thống. Do đó, chúng tôi tiến hành đề tài “Nghiên cứu chất lượng phôi nang thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng sau trữ lạnh bằng thủy tinh hoá” nhằm đánh giá hiệu quả của thủy tinh hóa so với đông lạnh nhanh trong kết quả nuôi cấy phôi thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON).

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu chất lượng phôi nang sau khi ICSI trên trứng chị em trong 18 chu kỳ thực hiện điều trị TTTON tại Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế từ tháng 04 năm 2022 đến tháng 04 năm 2023 với tinh trùng được trữ lạnh theo hai phương pháp: đông lạnh nhanh thông thường (nhóm 1) và thủy tinh hóa (nhóm 2).

Kết quả: Nhóm sử dụng tinh trùng đông lạnh nhanh thông thường có tỷ lệ thụ tinh cao hơn nhóm sử dụng tinh trùng thủy tinh hóa ($60,67 \pm 21,24\%$ so với $56,52 \pm 24,27\%$) với $p > 0,05$. Tuy nhiên, nhóm sử dụng tinh trùng thủy tinh hóa lại có tỷ lệ tạo phôi nang và tỷ lệ tạo phôi nang tốt cao hơn nhóm sử dụng tinh trùng đông lạnh nhanh thông thường (lần lượt là $78,97 \pm 26,13\%$ so với $72,27 \pm 29,75\%$ và $60,85 \pm 34,19\%$ so với $55,93 \pm 37,34$, $p > 0,05$).

Kết luận: Chất lượng phôi nang thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng sau trữ lạnh bằng thủy tinh hóa có khuynh hướng tốt hơn nhóm sử dụng tinh trùng trữ lạnh bằng đông lạnh nhanh thông thường. Tuy nhiên, vẫn còn cần nhiều nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn nữa để khẳng định ưu điểm và tính an toàn của thủy tinh hóa so với đông lạnh thông thường trong điều trị TTTON.

Từ khóa: phôi nang, thụ tinh trong ống nghiệm, tinh trùng, trữ lạnh, thủy tinh hóa.

Quality of blastocysts fertilized in vitro with vitrified - warmed sperms

Nguyen Thi Thai Thanh^{1*}, Nguyen Van Trung¹, Vo Van Chinh², Le Minh Tam^{1,3}

¹ Center for Reproductive Endocrinology and Infertility, Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital, Vietnam

² Binh An Quang Nam Hospital

³ Obstetrics and Gynecology Department, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Abstract

Objectives: The developed sperm cryopreservation technique has opened up a very high chance of having a baby for male infertility cases. Among the cryopreservation methods, vitrification is a widely studied and gradually applied technique. Although sperm vitrification has many advantages, the application of sperm vitrification in IVF is still not a substitute for traditional freezing. Therefore, we performed the study on “Evaluation of blastocyst quality in in vitro fertilization using vitrified-warmed sperm” to assess the effect of vitrification compared with rapid freezing in IVF outcomes.

Materials and Methods: Studying the quality of blastocysts after ICSI on sibling eggs in 18 cycles of IVF treatment at the Center of Reproductive Endocrinology and Infertility, Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital from April 2022 to April 2023 with cryopreserved sperm by two methods: conventional rapid freezing (group 1) and vitrification (group 2).

Results: Group 1 had a higher fertilization rate than group 2 ($60.67 \pm 21.24\%$ versus $56.52 \pm 24.27\%$) with $p > 0.05$. However, the group using vitrified-warmed sperm had better blastocyst formation rate and good blastocyst rate than the other ($78.97 \pm 26.13\%$ compared to with $72.27 \pm 29.75\%$ and $60.85 \pm 34.19\%$ compared to 55.93 ± 37.34 , respectively, $p > 0.05$).

Conclusions: *The quality of blastocysts in the group using vitrified-warmed sperm tended to be better than the group using conventional rapid freezing sperm. However, more studies with larger sample sizes are still needed to confirm the advantages and safety of vitrification.*

Keywords: *blastocyst, in vitro fertilization, sperm, cryopreservation, vitrification.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự phát triển của kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON hoặc *In vitro* Fertilization - IVF) và đặc biệt là kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (Intracytoplasmic Sperm Injection - ICSI) đã góp phần rất lớn trong sự thành công của lĩnh vực hỗ trợ sinh sản (HTSS), cũng như tạo hy vọng cho các cặp vợ chồng vô sinh. Đặc biệt, đối với nam giới vô sinh, chỉ cần một số lượng ít tinh trùng vẫn có cơ hội có con của chính mình.

Tinh trùng là yếu tố quan trọng trong quá trình thụ tinh, nó mang một nửa thông tin di truyền từ người bố. Do đó, sử dụng nguồn tinh trùng chất lượng tốt là nhân tố thiết yếu cho sự thành công của kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm. Những bệnh nhân nam giới có số lượng tinh trùng ít thường được chỉ định trữ lạnh tinh trùng trước khi bắt đầu quy trình kích thích buồng trứng ở người vợ, nhằm đảm bảo được số lượng tinh trùng đủ để thực hiện ICSI. Hiện nay, có hai phương pháp trữ lạnh tinh trùng được sử dụng phổ biến là đông lạnh nhanh (đông lạnh thông thường) và thủy tinh hóa. Đông lạnh thông thường được xem là phương pháp truyền thống, đã được thực hiện để trữ lạnh tinh trùng người trong nhiều năm. Trong khi đó, thủy tinh hóa là kỹ thuật mới nhưng đang phát triển nhanh chóng và dần trở thành phương pháp thay thế phương pháp đông lạnh truyền thống.

Phương pháp đông lạnh thông thường với các chất chống đông (Cryoprotectant Agents - CPA) có thể gây ra các tổn thương vật lý do sự hình thành tinh thể băng nội và ngoại bào, cũng như tổn thương hóa học do stress thẩm thấu. Ngược lại, thủy tinh hóa dựa vào tốc độ làm lạnh cực nhanh để ngăn chặn sự hình thành các tinh thể đá trong hệ thống sinh học, sẽ tạo ra các dạng giống thủy tinh (glass-like). Phương pháp này được sử dụng phổ biến hơn cho noãn và phôi, nhưng với tinh trùng vẫn còn nhiều thách thức. Nhưng thủy tinh hóa tinh trùng có nhiều lợi thế vì nó chỉ sử dụng các chất chống đông có tính thẩm nên an toàn với tinh trùng. Do đó, sau khi rã đông, thu được tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới cao với độ phân mảnh DNA thấp và bảo vệ được tính toàn vẹn của màng tế bào [1], nhờ vậy có thể sử dụng kỹ thuật này trong các quy trình TTTON [2,3].

Một nghiên cứu tổng quan có hệ thống trên 2428 bài báo và 13 thử nghiệm ngẫu nhiên đối chứng đã được thực hiện năm 2019. Kết quả cho thấy thủy tinh hóa tốt hơn đông lạnh thông thường về độ di động sau rã đông, bao gồm tổng số di động và di động tiến tới, mặc dù hiệu quả của thủy tinh hóa có sự khác nhau bởi vì quy trình thực hiện và chất lượng mẫu của các nghiên cứu khác nhau [4]. Các nghiên cứu tương tự cũng được

công bố trên thế giới [5,6]. Tuy nhiên, còn có khá ít dữ liệu về việc sử dụng thủy tinh hóa như là phương pháp trữ lạnh tinh trùng thường quy [7].

Một số nghiên cứu cho thấy các thông số động học của sự phát triển phôi giai đoạn sớm không bị ảnh hưởng bởi quy trình trữ lạnh [8,9]. Hơn nữa, không có bằng chứng nào về sự bất thường nhiễm sắc thể của con cái từ TTTON sử dụng tinh trùng trữ lạnh [10]. Những ca có trẻ sinh sống đạt được với tinh trùng trữ lạnh khi sử dụng để ICSI [11] và bơm tinh trùng vào buồng tử cung (Intrauterine Insemination - IUI) đã được báo cáo [12]. Hiện nay, vẫn chưa có nghiên cứu nào về hiệu quả thủy tinh hóa tinh trùng trong thụ tinh ống nghiệm được công bố tại Việt Nam. Việc áp dụng thủy tinh hóa tinh trùng trong TTTON vẫn đang là một thách thức và đòi hỏi nhiều nghiên cứu hơn nữa để khẳng định tính tối ưu của thủy tinh hóa trong bảo quản lạnh tinh trùng.

Xuất phát từ những vấn đề trên, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: *"Nghiên cứu chất lượng phôi nang thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng sau trữ lạnh bằng thủy tinh hoá"*.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chúng tôi thực hiện nghiên cứu trên noãn chị em với 18 chu kỳ thực hiện điều trị TTTON tại Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế từ tháng 04 năm 2022 đến tháng 04 năm 2023 với tinh trùng thiếu tinh nặng hoặc trích ly từ phẫu thuật được trữ lạnh theo hai phương pháp: đông lạnh nhanh thông thường (**nhóm 1**) và thủy tinh hóa (**nhóm 2**). Chu kỳ chọc hút trứng phải có số noãn thu được trên 5 để có thể thực hiện nghiên cứu trên noãn chị em.

Nghiên cứu này loại trừ những phụ nữ lớn hơn 45 tuổi, trường hợp xin noãn, số noãn thu nhận được ít hơn 5.

2.2. Quy trình nghiên cứu

Lựa chọn mẫu tinh trùng trữ lạnh

Mẫu tinh dịch của người chồng được đánh giá chất lượng ban đầu theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới 2021. Theo đó, các trường hợp có chất lượng mẫu tinh dịch thiếu tinh nặng sẽ được tiến hành trữ lạnh theo hai phương pháp: đông lạnh nhanh thông thường và thủy tinh hóa. Ngoài ra, các trường hợp vô tinh sau khi phẫu thuật có tinh trùng cũng sẽ được trữ lạnh lại theo hai phương pháp trên.

Quy trình trữ lạnh tinh trùng bằng phương pháp đông lạnh nhanh thông thường

Đầu tiên, làm ấm môi trường SpermFreeze Solution™ (Vitrolife, Thụy Điển) ở nhiệt độ phòng trong khoảng 30

phút trước khi trữ lạnh. Mẫu tinh dịch hoặc mẫu từ phẫu thuật được ly tâm ở tốc độ 300 g trong vòng 10 phút. Tiến hành đông lạnh nhanh thông thường theo quy trình đã được công bố trước đây của chúng tôi vào năm 2019 [13].

Quy trình trữ lạnh tinh trùng bằng phương pháp thủy tinh hóa

Tiến hành rửa đơn giản mẫu tinh dịch hoặc mẫu từ phẫu thuật. Dịch thu hồi được trộn với môi trường có chứa chất chống đông SpermFreeze Solution™ (Vitrolife, Thụy Điển) với tỷ lệ 1:1. Sử dụng ống vi mao quản an toàn sinh học với đường kính trong khoảng 150 µm hút một lượng 5 µl mẫu tinh trùng đã chuẩn bị và trộn với 5 µl môi trường SpermFreeze. Tiếp theo, nhúng ống vi mao quản chứa mẫu và môi trường trong ni-tơ lỏng -196°C. Ống vi quản sau đó được cho vào tube chứa để tiến hành lưu trữ trong thùng ni-tơ lỏng.

Quy trình rã đông tinh trùng

Mẫu sau quá trình bảo quản lạnh sẽ được rã đông và tiến hành xử lý theo phương pháp ly tâm theo thang nồng độ. Rã đông mẫu tinh trùng đông lạnh nhanh thông thường bằng cách nhúng ngay tube chứa mẫu vào nước ấm ổn định ở 37°C trong 5 phút hoặc cho đến khi mẫu hóa lỏng hoàn toàn. Tiến hành rửa đơn thuần với 1 ml môi trường Ferticult™ Flushing (Fertipro, Bỉ) và ly tâm 300 g trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi và để lại 0,3 ml dung dịch và cặn lắng để sử dụng cho ICSI. Đối với mẫu tinh trùng thủy tinh hóa, quy trình rã đông được tiến hành bằng cách nhúng ống vi mao quản vào môi trường Ferticult™ Flushing đã làm ấm. Sau đó có thể sử dụng trực tiếp mẫu để ICSI.

Chu kỳ kích thích noãn và chọc hút noãn

Người phụ nữ được thích thích buồng trứng với phác đồ antagonist sử dụng hormone giải phóng gonadotropin (gonadotropin-releasing hormone - GnRH) và hormone kích thích nang noãn tái tổ hợp (recombinant follicle-stimulating hormone - rFSH). Noãn được chọc hút dưới hướng dẫn của siêu âm đường âm đạo tại 35-36 giờ sau khi tiêm hCG (human chorionic gonadotropin - hCG).

Quy trình tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (Intracytoplasmic sperm injection - ICSI) và nuôi cấy phôi

Phức hợp noãn - tế bào cumulus - tế bào corona sau khi được tìm thấy trong dịch nang sẽ được rửa và nuôi cấy trong 2 giờ với môi trường G-IVF PLUS (Vitrolife®, Västra Frölunda, Thụy Điển) ở 37°C và trong điều kiện

không khí 5% O₂, 6% CO₂. Noãn sau đó được tách ra khỏi khối phức hợp bằng cách sử dụng enzyme Hyase 80IU (Vitrolife®, Västra Frölunda, Thụy Điển) và nuôi cấy trong môi trường G-IVF PLUS trong 1 giờ trước khi ICSI. Kỹ thuật ICSI được thực hiện theo quy trình tiêu chuẩn. Trong mỗi chu kỳ TTTON, số noãn thu nhận được sẽ được chia đôi để phân thành hai nhóm: nhóm 1 bao gồm các noãn trưởng thành được ICSI với tinh trùng đông lạnh nhanh thông thường và nhóm 2 bao gồm các noãn trưởng thành được ICSI với tinh trùng thủy tinh hóa.

Sau khi ICSI, noãn được nuôi cấy giọt đơn trong môi trường G-TL (Vitrolife®, Västra Frölunda, Thụy Điển) có phủ dầu Ovoil (Vitrolife®, Västra Frölunda, Thụy Điển) ở 37°C với 5% O₂, 6% CO₂. Phôi được nuôi cấy 5 ngày đến giai đoạn phôi nang ở tủ nuôi cấy benchtop (IVFtech, Birkerød®, Đan Mạch).

Quy trình đánh giá sự thụ tinh và phôi nang

Quy trình đánh giá được thực hiện theo hệ thống của Gardner và đồng thuận Istanbul [14,15]. Đánh giá thụ tinh thường được thực hiện tại 16 - 18 giờ sau ICSI. Quy trình đánh giá phôi nang được thực hiện vào thời điểm 154-156 giờ sau khi tiêm hCG hoặc 112 - 124 giờ sau thụ tinh. Việc đánh giá được thực hiện nhờ quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi điện tử (độ phóng đại x 200 lần) bởi hai chuyên viên phôi học có kinh nghiệm. Dựa vào thông tin đánh giá từng yếu tố, hình thái phôi nang tốt được xác định là loại có khoang phôi nang chứa đầy dịch, khối tế bào nụ phôi nén chặt, các tế bào nuôi gồm nhiều tế bào dính chặt nhau.

2.3. Thu nhận và xử lý số liệu

Các đặc điểm chung của bệnh nhân được ghi nhận trong chu kỳ điều trị TTTON. Kết quả nuôi cấy phôi được ghi nhận bao gồm số noãn trưởng thành, tỷ lệ thụ tinh (bằng số hợp tử thụ tinh bình thường trên số noãn trưởng thành), tỷ lệ tạo phôi nang (bằng số phôi nang tạo được trên số phôi hình thành), chất lượng phôi nang được thể hiện thông qua tỷ lệ phôi nang tốt (bằng số phôi nang tốt trên số phôi hình thành). Các số liệu được phân tích và xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, Mỹ). Các biến liên tục được biểu diễn bằng số trung bình và độ lệch chuẩn (trung bình ± SD) và giá trị tối thiểu - tối đa, các biến tỷ lệ được thể hiện bằng n và %. Các biến liên tục được so sánh bằng t-test. Các số liệu được làm tròn đến 2 chữ số thập phân và được coi là có sự khác biệt thống kê khi giá trị p < 0,05.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Bảng 1. Đặc điểm chung của bệnh nhân (n=18)

Đặc điểm	
Tuổi người vợ trung bình	31,67 ± 3,11 (24 - 37)
Tuổi người chồng trung bình	35,39 ± 3,96 (29 - 44)
Loại vô sinh	
Nguyên phát	15 (83,3)
Thứ phát	3 (16,7)

Nguyên nhân vô sinh	
Do chồng	8 (44,44%)
Do chồng + Hội chứng buồng trứng đa nang	6 (33,33%)
Do chồng + Giảm dự trữ buồng trứng	2 (11,11%)
Do chồng + Lạc nội mạc tử cung	1 (5,56%)
Do chồng + Nguyên nhân khác	1 (5,56%)

Các biến liên tục được biểu diễn bằng số trung bình và độ lệch chuẩn (trung bình \pm SD) và giá trị đối thiếu - tối đa, các biến tỷ lệ được thể hiện bằng n và %.

Từ tháng 04/2022 đến tháng 04/2023, chúng tôi tiến hành nghiên cứu trên noãn chị em ở 18 chu kỳ điều trị TTTON với tinh trùng được trữ lạnh bằng cả 2 phương pháp (đông lạnh nhanh thông thường và thủy tinh hóa). Đặc điểm chung của bệnh nhân được ghi nhận ở Bảng 1. Tuổi trung bình của người vợ khá thấp, đạt $31,67 \pm 3,11$, trong khi đó, tuổi trung bình người chồng xấp xỉ 35 tuổi. Tỷ lệ vô sinh nguyên phát chiếm đa số (83,3%). Nguyên nhân vô sinh không chỉ xuất phát từ người chồng mà còn do các nguyên nhân khác, trong đó hội chứng buồng trứng đa nang chiếm tỷ lệ cao nhất (33,33%).

Bảng 2. Kết quả nuôi cấy phôi (n = 18)

Thông số nuôi cấy phôi	
Số noãn thu nhận trung bình	$13,39 \pm 4,26$ (6 - 24)
Số noãn trưởng thành trung bình	$10,78 \pm 3,62$ (5 - 19)
Tỷ lệ thụ tinh (%)	$58,82 \pm 18,03$
Tỷ lệ tạo phôi nang (%)	$74,31 \pm 19,06$
Tỷ lệ tạo phôi nang tốt (%)	$56,6 \pm 24,73$

Các biến liên tục được biểu diễn bằng số trung bình và độ lệch chuẩn (trung bình \pm SD).

Bảng 2 thể hiện kết quả nuôi cấy phôi của 18 chu kỳ điều trị TTTON sử dụng tinh trùng trữ lạnh. Số noãn thu nhận trung bình đạt $13,39 \pm 4,26$ với lần chọc hút có số noãn thấp nhất là 6 và cao nhất là 24. Số noãn trưởng thành đạt được là $10,78 \pm 3,62$. Trong nghiên cứu này, chúng tôi ghi nhận được tỷ lệ thụ tinh đạt $58,82 \pm 18,03\%$. Tỷ lệ tạo phôi nang ngày 5 và phôi nang tốt rất cao (lần lượt là $74,31 \pm 19,06\%$ và $56,6 \pm 24,73\%$).

Bảng 3. So sánh kết quả nuôi cấy phôi thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng sau trữ lạnh bằng đông lạnh nhanh thông thường (nhóm 1) và thủy tinh hoá (nhóm 2) (n = 18)

	Nhóm 1	Nhóm 2	Giá trị P
Số noãn trưởng thành trung bình	$5,22 \pm 1,77$	$5,5 \pm 1,98$	0,399
Tỷ lệ thụ tinh (%)	$60,67 \pm 21,24$	$56,52 \pm 24,27$	0,534
Tỷ lệ tạo phôi nang (%)	$72,27 \pm 29,75$	$78,97 \pm 26,13$	0,493
Tỷ lệ tạo phôi nang tốt (%)	$55,93 \pm 37,34$	$60,85 \pm 34,19$	0,687

Các biến liên tục được biểu diễn bằng số trung bình và độ lệch chuẩn (trung bình \pm SD).

Khi so sánh kết quả nuôi cấy phôi TTTON với tinh trùng trữ lạnh bằng hai phương pháp khác nhau trên noãn chị em, chúng tôi nhận thấy nhóm sử dụng tinh trùng thủy tinh hóa có kết quả tốt hơn nhóm sử dụng tinh trùng đông lạnh nhanh thông thường (Bảng 3). Cụ thể là, số noãn trưởng thành trung bình của cả hai nhóm tương đương nhau và không có sự khác biệt. Nhóm sử dụng tinh trùng đông lạnh nhanh thông thường có tỷ lệ thụ tinh cao hơn nhóm sử dụng tinh trùng thủy tinh hóa ($60,67 \pm 21,24\%$ so với $56,52 \pm 24,27\%$) với $p > 0,05$. Tuy nhiên, nhóm sử dụng tinh trùng thủy tinh hóa lại có tỷ lệ tạo phôi nang và tỷ lệ tạo phôi nang tốt cao hơn nhóm sử dụng tinh trùng đông lạnh nhanh thông thường ($p > 0,05$).

4. BÀN LUẬN

Hơn 8 thập kỷ trước, nghiên cứu thủy tinh hóa đầu

tiên trên tinh trùng ếch đã được thực hiện vào năm 1938 [16]. Năm 1953, nghiên cứu đầu tiên sử dụng tinh trùng trữ lạnh trên đá khô và cho kết quả thai sinh sống đã được báo cáo [17]. Từ đó cho đến nay, kỹ thuật bảo quản lạnh tinh trùng đã có một bước tiến dài vượt bậc và được áp dụng rộng rãi trong HTSS. Đông lạnh nhanh là một phương pháp được áp dụng phổ biến tại các trung tâm HTSS trên thế giới. Trong khi đó, thủy tinh hóa vẫn chưa thể thay thế hoàn toàn cho phương pháp trữ lạnh truyền thống.

Thủy tinh hóa, bằng cách nhúng trực tiếp mẫu tinh trùng vào ni-tơ lỏng, là một phương pháp nhanh chóng, đơn giản và tiết kiệm chi phí để bảo quản lạnh tinh trùng người. Phương pháp này không gây tổn thương do không tạo tinh thể đá nội bào trong quá trình làm lạnh. Với 33 mẫu tinh dịch, một nghiên cứu cho thấy cả

đông lạnh chậm và thủy tinh hóa đều có kết quả tương tự nhau, nhưng thủy tinh hóa là phương pháp thực hiện nhanh hơn, dễ dàng hơn, có độc tính thấp hơn và chi phí rẻ hơn [18]. Pabon và cộng sự (năm 2019) [19] đã sử dụng 47 mẫu tinh trùng người trong nghiên cứu so sánh hiệu quả của thủy tinh hóa và đông lạnh thông thường. Nhóm tác giả kết luận rằng thủy tinh hóa phù hợp với trữ lạnh tinh trùng vì phương pháp này cho kết quả thu hồi tinh trùng di động tốt hơn và hoạt tính ty thể cao hơn [19]. Một nghiên cứu của Epis và cộng sự cũng chỉ ra rằng thủy tinh hóa thu hồi được tinh trùng có tỷ lệ toàn vẹn màng ty thể và khả năng di động cao hơn khi trữ lạnh tinh trùng từ mào tinh và tinh hoàn [20]. Nghiên cứu của chúng tôi năm 2019 so sánh kết quả sau khi sử dụng phương pháp thủy tinh hóa tinh trùng và đông lạnh nhanh ghi nhận khả năng di động cũng như sức sống sau rã đông ở nhóm đông lạnh thông thường cao hơn nhóm thủy tinh hoá. Tuy nhiên, nhóm thủy tinh hoá lại cho kết quả tốt hơn về tỷ lệ tinh trùng có hình thái bình thường [13]. Nói chung, thủy tinh hóa tinh trùng người đã cho thấy tiềm năng ứng dụng ngày càng lớn mặc dù quy trình cần được tối ưu hóa hơn.

Mặc dù có rất ít công bố quốc tế nhưng tính an toàn của thủy tinh hóa đã được chứng minh trong các báo cáo trẻ sinh ra khỏe mạnh bằng tinh trùng thủy tinh hóa. Kỹ thuật thủy tinh hóa được áp dụng và cho kết quả có thai đầu tiên trong điều trị IUI với bệnh nhân severe oligoasthenozoospermia (có rất ít tinh trùng) và hai em bé sinh ra đầu tiên được báo cáo vào năm 2012 [2, 11]. Cũng vào năm 2012, Endo và cộng sự tiến hành ICSI với tinh trùng trữ lạnh bằng thủy tinh hóa thể tích nhỏ và cho tỷ lệ thụ tinh đạt 71% và một em bé đã ra đời [21]. Medrano và cộng sự (năm 2019) đã báo cáo trường hợp một em bé khỏe mạnh sinh ra từ mẫu tinh trùng thủy tinh hóa không sử dụng CPA sau khi chuyển phôi nang ngày 5 [3]. Nghiên cứu này của chúng tôi là báo cáo đầu tiên ở Việt Nam sử dụng tinh trùng trữ lạnh bằng thủy tinh hóa trong điều trị TTTON. Ngoài ra, đây cũng là một trong số ít các nghiên cứu sử dụng noãn chị em để so sánh hiệu quả nuôi cấy phôi TTTON khi sử dụng tinh trùng đông lạnh nhanh và thủy tinh hóa.

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ thụ tinh của nhóm sử dụng tinh trùng đông lạnh nhanh thông thường đạt 60,67% và nhóm sử dụng tinh trùng thủy tinh hóa là 56,52%. Mẫu tinh trùng sử dụng là các mẫu thiếu tinh nặng và mẫu từ phẫu thuật nên tỷ lệ thụ tinh thấp hơn so với mẫu tinh trùng bình thường. Các mẫu tinh trùng này thường có số lượng tinh trùng có hình dạng bình thường ít, cũng như bị hạn chế về số lượng nên phương pháp thủy tinh hóa thường được lựa chọn để trữ lạnh. Năm 2020, Ohno và cộng sự [22] đã báo cáo nghiên cứu thủy tinh hóa ở mẫu thiếu tinh nặng, đồng thời theo dõi sự phát triển của 14 trẻ sinh ra sau khi sử dụng tinh trùng thủy tinh hóa (từ năm 2011 đến năm 2018). Nhóm tác giả thấy rằng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về kết quả có

thai giữa nhóm sử dụng tinh trùng tươi từ xuất tinh, tinh trùng thủy tinh hóa từ tinh hoàn và thủy tinh hóa từ xuất tinh. Sự phát triển thể chất và nhận thức của 14 trẻ sinh ra từ tinh trùng thủy tinh hóa không khác biệt so với trẻ được sinh tự nhiên [22].

Phương pháp đông lạnh chậm là phương pháp đầu tiên được sử dụng cho bảo quản lạnh tinh trùng. Đông lạnh chậm bằng máy hay tủ âm sâu đều đòi hỏi thiết bị đắt tiền, chi phí vận hành cao, trong khi đó đông lạnh chậm thủ công không đòi hỏi các thiết bị chuyên dụng, chi phí đầu tư và vận hành thấp. Tuy nhiên, đông lạnh chậm cho tỷ lệ tinh trùng sống sót sau rã đông chỉ ở mức trung bình và tạm chấp nhận được. Phương pháp đông lạnh nhanh theo hướng dẫn của nhà sản xuất các kit trữ lạnh - rã đông tinh trùng thì tương đối đơn giản, dễ thực hiện, không cần máy móc thiết bị đắt tiền nhưng nó đòi hỏi thể tích mẫu đủ để thực hiện, mật độ tinh trùng quá ít khó thực hiện thành công [23]. Thủy tinh hóa với nhiều ưu điểm vượt trội như thực hiện đơn giản và nhanh chóng, chi phí rẻ mà vẫn có hiệu quả thu hồi tinh trùng tốt, khả năng trữ lạnh mẫu với lượng nhỏ, đang có xu hướng thay thế cho phương pháp trữ lạnh thông thường trong các chu kỳ điều trị TTTON. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy mặc dù sự khác nhau của hai nhóm không có ý nghĩa thống kê nhưng nhóm sử dụng tinh trùng thủy tinh hóa có tỷ lệ tạo phôi nang và phôi nang tốt rất cao (lần lượt là 78,97% và 60,85%). Như vậy, thủy tinh hóa không những có hiệu quả trữ lạnh tinh trùng tương đương so với đông lạnh nhanh mà còn có thể áp dụng cho các nguồn mẫu khác nhau (mẫu tinh dịch bình thường; mẫu thiếu tinh nặng, mẫu từ phẫu thuật với số lượng tinh trùng rất ít và rất yếu).

5. KẾT LUẬN

Tóm lại, chất lượng phôi nang thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng sau trữ lạnh bằng thủy tinh hóa có khuynh hướng tốt hơn nhóm sử dụng tinh trùng trữ lạnh bằng đông lạnh nhanh thông thường. Tuy nhiên, vẫn còn cần nhiều nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn nữa để khẳng định ưu điểm và tính an toàn của thủy tinh hóa trong điều trị TTTON.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Isachenko E, Isachenko V, Weiss JM, Kreienberg R, Katkov II, Schulz M, et al. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction*. 2008; 136(2):167–73.
2. Sánchez R, Schulz M, Risopatrón J, Isachenko V, Isachenko E. Vitrification sperm: An alternative to intracytoplasmic sperm injection in oligoasthenozoospermic patient. *Rev Int Androl*. 2013; 11:36–9.
3. Medrano L, Enciso M, Gomez-Torres MJ, Aizpurua J. First birth of a healthy infant following intra-cytoplasmic sperm injection using a new permeable cryoprotectant-

- free sperm vitrification protocol. *Cryobiology*. 2019; 87:117–9.
4. Li Y, Zhou L, Lv M, Ge P, Liu Y, Zhou D. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019; 233:84–92.
5. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online*. 2018; 37(3):327–39.
6. Patel K, Sharma N, Mishra V, Aggarwal R, Suthar A, Sheth H. Comparison between the outcome of sperm vitrification protocol and conventional slow freezing protocol for semen cryopreservation. *Hum Reprod*. 2021; 36(Supplement_1).
7. Schulz M, Risopatrón J, Uribe P, Isachenko E, Isachenko V, Sánchez R. Human sperm vitrification: A scientific report. *Andrology*. 2020; 8(6):1642–50.
8. Eastick J, Venetis C, Cooke S, Storr A, Susetio D, Chapman M. Is early embryo development as observed by time-lapse microscopy dependent on whether fresh or frozen sperm was used for ICSI? A cohort study. *J Assist Reprod Genet*. 2017; 34(6):733–40.
9. Vicdan K, Akarsu C, Sözen E, Buluç B, Vicdan A, Yılmaz Y, et al. Outcome of intracytoplasmic sperm injection using fresh and cryopreserved-thawed testicular spermatozoa in 83 azoospermic men with Klinefelter syndrome. *J Obstet Gynaecol Res*. 2016; 42(11):1558–66.
10. Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: Principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum Reprod Update*. 2015; 21(2):209–27.
11. Isachenko V, Isachenko E, Petrunkina AM, Sanchez R. Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: Birth of two healthy babies. *Reprod Fertil Dev*. 2012; 24:323–6.
12. Sanchez R, Isachenko V, Petrunkina AM, Risopatrón J, Schulz M, Isachenko E. Live birth after intrauterine insemination with spermatozoa from an oligoasthenozoospermic patient vitrified without permeable cryoprotectants. *J Androl*. 2012; 33(4):559–62.
13. Le MT, Nguyen TTT, Nguyen TT, Nguyen VT, Nguyen TTA, Nguyen VQH, et al. Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: Effects on motility, viability, morphology and cellular defects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019; 234:14–20.
14. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: Towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 2000; 73(6):1155–8.
15. Lê Minh Tâm, Nguyễn Văn Trung, Nguyễn Thị Thái Thanh, Đặng Thị Hồng Nhạn. Chương 4. Kỹ thuật nuôi cấy, đánh giá và các can thiệp trên phôi. Các vấn đề trọng yếu trong Hỗ trợ Sinh sản. Tập 2: Dành cho Phôi học lâm sàng. Nhà xuất bản Y học; 2022; 274–355.
16. Luyet BJ, Hodapp EL. Revival of Frog's Spermatozoa Vitrified in Liquid Air. *Exp Biol Med*. 1938; 39(3):433–4.
17. Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*. 1953; 172(4382):767–8.
18. Mohamed MSA. Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; An experimental controlled study. *Iran J Reprod Med*. 2015; 13(10):633–44.
19. Pabón D, Meseguer M, Sevillano G, Cobo A, Romero JL, Remohí J, et al. A new system of sperm cryopreservation: evaluation of survival, motility, DNA oxidation, and mitochondrial activity. *Andrology*. 2019; 7(3):293–301.
20. Spis E, Bushkovskaia A, Isachenko E, Todorov P, Sanchez R, Skopets V, et al. Conventional freezing vs. cryoprotectant-free vitrification of epididymal (MESA) and testicular (TESE) spermatozoa: Three live births. *Cryobiology*. 2019; 90:100–2.
21. Endo Y, Fujii Y, Shintani K, Seo M, Motoyama H, Funahashi H. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2012; 24(3):301–7.
22. Ohno M, Tanaka A, Nagayoshi M, Yamaguchi T, Takemoto Y, Tanaka I, et al. Modified permeable cryoprotectant-free vitrification method for three or fewer ejaculated spermatozoa from cryptozoospermic men and 7-year follow-up study of 14 children born from this method. *Hum Reprod*. 2020; 35(5):1019–28.
23. Lê Minh Tâm, Nguyễn Văn Trung, Nguyễn Thị Thái Thanh, Đặng Thị Hồng Nhạn. Chương 5. Kỹ thuật trữ lạnh trong hỗ trợ sinh sản. Các vấn đề trọng yếu trong Hỗ trợ Sinh sản. Tập 2: Dành cho Phôi học lâm sàng. 2022; 335–95.