

HIỆU QUẢ KỸ THUẬT THỦY TINH HÓA CẢI BIÊN CÓ VÀ KHÔNG CHẤT BẢO QUẢN LẠNH TRÊN NHÓM TINH TRÙNG SỐ LƯỢNG ÍT

Đỗ Ngọc Lan^{1}, Nguyễn Thanh Tùng¹, Trịnh Thế Sơn¹
Nguyễn Thị Thục Anh¹, Lê Thanh Huyền¹, Đào Nguyên Hùng²*

Tóm tắt

Mục tiêu: So sánh hiệu quả quy trình thủy tinh hóa tinh trùng cải biên có hoặc không sử dụng chất bảo quản lạnh (cryoprotective agents - CPA). **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu thử nghiệm labo được thực hiện trên 30 mẫu thiếu tinh năng và 12 mẫu vô tinh do tắc chóc hút từ mào tinh điều trị tại Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội, Học viện Quân y. **Kết quả:** Mẫu thiếu tinh và vô tinh (mẫu tinh trùng số lượng ít) đều cho kết quả chỉ số sống sau đông lạnh (cryosurvival factor - CSF) sống, di động ở nhóm có CPA cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không CPA ($p < 0,05$). **Kết luận:** Thủy tinh hóa tinh trùng số lượng ít trong tuýp PCR có sử dụng CPA cho kết quả tinh trùng sống, di động sau rã đông tốt hơn so với nhóm không sử dụng CPA.

Từ khóa: Thủy tinh hóa tinh trùng; Thiếu tinh; Vô tinh; CPA; CSF.

EFFICACY OF THE MODIFIED VITRIFICATION TECHNIQUE WITH AND WITHOUT CRYOPROTECTIVE AGENTS IN LOW SPERM COUNT SAMPLES

Abstract

Objectives: To compare the effectiveness of the modified sperm vitrification technique with and without the use of cryoprotective agents (CPA). **Methods:** An experimental, laboratory study was conducted on 30 oligospermia and 12 azoospermia aspirated from the epididymis treated at the Military Institute of Clinical Embryology and Histology, Vietnam Military Medical University.

¹Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội, Học viện Quân y

²Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

*Tác giả liên hệ: Đỗ Ngọc Lan (dnlan1887@gmail.com)

Ngày nhận bài: 11/8/2025

Ngày được chấp nhận đăng: 12/9/2025

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v50si4.1517>

Results: In both oligospermia and azoospermia samples (low sperm count samples), the viable and motile cryosurvival factors (CSF) in the CPA group were statistically significantly higher than those in the no-CPA group ($p < 0,05$).

Conclusion: Vitrification of low sperm count samples in PCR tubes using CPA resulted in better sperm survival and mobility after thawing compared to the no-CPA group.

Keywords: Sperm vitrification; Oligospermia; Azoospermia; CPA; CSF.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bảo quản lạnh tinh trùng lần đầu tiên được thực hiện bởi Lazaro Spallanzani vào năm 1776 bằng cách bảo quản lạnh tinh dịch trong tuyết. Em bé đầu tiên ra đời từ tinh trùng bảo quản lạnh được báo cáo bởi tác giả Bunge và Sherman vào năm 1953. Hiện nay, các trung tâm hỗ trợ sinh sản thường sử dụng hai kỹ thuật bảo quản lạnh tinh trùng là kỹ thuật bảo quản lạnh chậm và thủy tinh hóa. Kỹ thuật bảo quản lạnh chậm đã được sử dụng khá lâu tại các labo, tuy nhiên, tỷ lệ tinh trùng hồi phục sau rã đông của kỹ thuật này thường là 50%, thay đổi nhiều tùy theo từng mẫu. Thêm vào đó, một số nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh kỹ thuật này gây ra biến đổi lớn đối với cấu trúc và chức năng tinh trùng [1, 2]. Áp dụng kỹ thuật bảo quản lạnh chậm đối với mẫu tinh dịch thiếu tinh năng, tinh trùng thu nhận từ mào tinh, tinh hoàn do tắc hay không do tắc là thách thức lớn. Thủy tinh hóa tinh trùng có thể khắc phục những nhược điểm của kỹ thuật bảo quản lạnh tinh trùng chậm đối với các loại mẫu này do thực hiện nhanh, đơn giản, tinh trùng hồi phục tốt sau rã đông về số lượng và

chất lượng. Tuy nhiên, sử dụng CPA trong quá trình bảo quản lạnh tinh trùng còn là vấn đề gây tranh cãi giữa các nhà nghiên cứu. Theo tác giả Mochida và CS (2014), sử dụng CPA bảo quản lạnh nồng độ cao với mẫu tinh trùng số lượng ít là cần thiết trong bảo quản lạnh tinh trùng [3]. Tuy nhiên, tinh trùng người rất nhạy cảm với CPA, do đó, một số tác giả đã đưa ra phương pháp trữ lạnh tinh trùng không sử dụng CPA [4]. Từ thực tế trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu “Hiệu quả kỹ thuật thủy tinh hóa cải biên có và không CPA trên nhóm tinh trùng số lượng ít” nhằm: *So sánh hiệu quả quy trình thủy tinh hóa tinh trùng cải biên có hoặc không sử dụng CPA.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 30 mẫu tinh dịch thiếu tinh năng và 12 mẫu tinh trùng vô tinh do tắc có tinh trùng thu nhận được từ phương pháp chọc hút tinh trùng từ mào tinh (percutaneous epididymal sperm aspiration - PESA) tại Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội, Học viện Quân y,

chia thành hai nhóm thiếu tinh nặng (nhóm A) và nhóm tinh trùng thu nhận từ mào tinh (nhóm B) từ tháng 12/2024 - 4/2025.

* *Tiêu chuẩn lựa chọn*: Các mẫu tinh dịch thiếu tinh nặng (< 1 triệu tinh trùng/mL); các mẫu tinh trùng thu nhận từ phương pháp chọc hút mào tinh PESA ở bệnh nhân (BN) vô tinh do tắc; BN đồng ý tham gia nghiên cứu.

* *Tiêu chuẩn loại trừ*: BN có 1 trong các xét nghiệm HIV (+), HbsAg (+), HCV (+).

2. Phương pháp nghiên cứu:

* *Thiết kế nghiên cứu*: Nghiên cứu thử nghiệm labo.

* *Chọn mẫu*: Chọn mẫu thuận tiện và được chia làm hai nhóm.

* *Các bước tiến hành nghiên cứu*:

Đánh giá mật độ và độ di động của tinh trùng sau rã đông: BN sau khi được chia làm hai nhóm sẽ tiến hành thu nhận mẫu tinh trùng:

- Nhóm thiếu tinh nặng (nhóm A): Tiến hành thu nhận mẫu tinh trùng trực tiếp.

- Nhóm vô tinh không do tắc (nhóm B): Tiến hành thu nhận mẫu tinh trùng sau khi chọc hút mào tinh.

Sau khi thu nhận mẫu tinh trùng sẽ tiến hành trữ đông mẫu và rã đông mẫu theo các thời điểm sau:

- Thời điểm T0: Mẫu sau khi được ly tâm, tiến hành lưu mẫu tinh trùng bằng

phương pháp thủy tinh hóa tinh trùng số lượng ít có CPA và không CPA trong tuýp PCR.

- Thời điểm T1: Sau 1 tuần, rã đông mẫu lưu trữ và so sánh mẫu nhóm CPA và nhóm không CPA.

- Thời điểm T2: Sau 4 tuần, rã đông mẫu lưu trữ và so sánh mẫu nhóm CPA và nhóm không CPA.

- Thời điểm T3: Sau 8 tuần, rã đông mẫu lưu trữ và so sánh mẫu nhóm CPA và nhóm không CPA.

* *Quy trình thủy tinh hóa mẫu tinh trùng có sử dụng CPA*:

Tiến hành ly tâm mẫu thiếu tinh, mẫu PESA 1.500 vòng/phút; thu cặn tinh trùng và chia thành hai nhóm: Bổ sung CPA theo tỷ lệ 10/7 (cặn tinh trùng/CPA) và không bổ sung CPA; chia mẫu 5 μ L/tuýp, ghi mã BN, mã mẫu và thời điểm T0, T1, T2, T3; đặt các tuýp PCR trên giá trong hơi nitơ trong 2 phút; nhúng các 1/2 tuýp PCR trong nitơ lỏng trong 10 giây; đặt 2 tuýp PCR vào 1 ống cryotube; đặt cryotube vào giá trữ đông.

* *Quy trình rã đông tinh trùng thiếu tinh và vô tinh do tắc*:

Tiến hành lấy mẫu thiếu tinh nặng, mẫu PESA đông lạnh; nhúng đáy tuýp PCR vào nước ấm (37°C); nhỏ tinh trùng vào giọt G-IVF (37°C); tiến hành đánh giá mẫu sau rã đông.

** Các chỉ tiêu nghiên cứu:*

Mật độ tinh trùng (triệu/mL); tỷ lệ tinh trùng di động (PR + NP), tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới (PR%); tỷ lệ tinh trùng sống (%); tỷ lệ tinh trùng có hình thái bình thường (%).

$$\text{Chỉ số CSF di động tiến tới} = \frac{\% \text{ tinh trùng di động tiến tới sau đông}}{\% \text{ tinh trùng di động tiến tới trước đông}} \times 100\%$$

$$\text{Chỉ số CSF sống} = \frac{\% \text{ tinh trùng sống sau đông}}{\% \text{ tinh trùng di động sống trước đông}} \times 100\%$$

** Xử lý số liệu:* Bằng chương trình Stata 14.0. Giá trị của các trị số được trình bày dưới dạng số trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. So sánh 2 giá trị trung bình sử dụng test T-student. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$ trong các so sánh.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu thử nghiệm labo, các mẫu của BN được mã hóa, sử dụng, lưu trữ, rã đông, đánh giá mẫu và mẫu được hủy sau nghiên cứu. Nghiên cứu được thực hiện theo đúng quy định của Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội, Học viện Quân y. Số liệu nghiên cứu được Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội, Học viện Quân y cho phép sử dụng và công bố. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Bảng 1. Chỉ số CSF sống sau bảo quản lạnh ở nhóm thiếu tinh nặng.

Thời điểm	Không CPA	Có CPA	p
AT1	50,45 $\pm$ 4,63	72,06 $\pm$ 5,94	0,000
AT2	45,24 $\pm$ 4,33	71,13 $\pm$ 5,85	0,000
AT3	40,69 $\pm$ 3,96	73,10 $\pm$ 9,91	0,000

Rã đông mẫu tinh trùng sau 1 tuần, 4 tuần và 8 tuần, chỉ số CSF sống (%) của nhóm thiếu tinh nặng có CPA cao hơn so với nhóm không CPA, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Bảng 2. Chỉ số CSF di động sau bảo quản lạnh ở nhóm thiếu tỉnh.

Thời điểm	Không CPA	Có CPA	p
AT1	43,35 ± 4,81	54,92 ± 2,85	0,000
AT2	37,24 ± 4,39	54,51 ± 3,36	0,000
AT3	33,96 ± 4,14	55,79 ± 4,43	0,000

Rã đông mẫu tinh trùng sau 1 tuần, 4 tuần và 8 tuần, chỉ số CSF di động (%) của nhóm thiếu tỉnh nặng có CPA cao hơn so với nhóm không CPA, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Bảng 3. Chỉ số CSF sống ở nhóm vô tinh.

Thời điểm	Không CPA	Có CPA	p
BT1	46,21 ± 3,58	70 ± 3,28	0,000
BT2	44,20 ± 3,38	69,29 ± 3,10	0,000
BT3	44,84 ± 3,04	69,39 ± 2,78	0,000

Rã đông mẫu tinh trùng sau 1 tuần, 4 tuần và 8 tuần, chỉ số CSF sống (%) của nhóm vô tinh có CPA cao hơn so với nhóm không CPA, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Bảng 4. Chỉ số CSF di động ở nhóm vô tinh.

Thời điểm	Không CPA	Có CPA	p
BT1	36,35 ± 2,90	41,79 ± 4,86	0,000
BT2	34,34 ± 2,74	49,34 ± 3,38	0,000
BT3	33,42 ± 2,68	48,83 ± 3,15	0,000

Rã đông mẫu tinh trùng sau 1 tuần, 4 tuần và 8 tuần, chỉ số CSF di động (%) của nhóm vô tinh có CPA cao hơn so với nhóm không CPA, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

BÀN LUẬN

Trong bảo quản lạnh tinh trùng, có hai dạng CPA thường dùng là CPA có khả năng thẩm thấu qua màng tế bào và CPA không có khả năng thẩm thấu qua màng tế bào. Hai loại này có tính chất và hoạt động khác nhau, đều hỗ trợ quá trình khử nước bên trong tế bào, giúp hạn chế việc hình thành tinh thể đá nội bào [2].

Có nhiều quan điểm khác nhau về việc sử dụng CPA trong bảo quản lạnh tinh trùng. Nhiều tác giả đã sử dụng những môi trường bảo quản lạnh khác nhau với mục đích hạn chế tổn thương và đặc biệt là cải thiện khả năng di động kém của tinh trùng. Nhiều nghiên cứu sử dụng môi trường phối hợp cho kết quả chất lượng tinh trùng sau bảo quản lạnh tốt hơn glycerol đơn thuần. Nghiên cứu của Trịnh Sinh Tiên (2002) sử dụng môi trường GEYC và môi trường Sperm Freeze cho chất lượng tinh trùng sau bảo quản lạnh là tương đương [5]. Tuy nhiên, nghiên cứu của Isachenko và CS, Chen và CS cho rằng thủy tinh hóa tinh trùng người không dùng CPA cho tỷ lệ thu hồi tinh trùng tương đối tốt [4, 6]. Do đó, vẫn còn nhiều tranh cãi xung quanh việc sử dụng CPA trong quá trình đông lạnh tinh trùng.

Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng Sperm Freeze (CPA phối hợp) - loại CPA được pha sẵn lưu trữ trong lọ vô

trùng, sử dụng phổ biến tại các trung tâm hỗ trợ sinh sản. Điểm mạnh của Sperm Freeze là khi pha vào mẫu tinh dịch thì không thấy các hạt nhỏ từ lòng đỏ trứng (egg yolk) xen lẫn như khi sử dụng môi trường GEYC, đảm bảo chất lượng mẫu hơn [5]. Điều cần lưu ý khi pha CPA vào tinh dịch là phải đảm bảo đúng tỷ lệ và nhỏ từng giọt với tốc độ 5 giây/giọt vào lọ tinh dịch và lắc đều. Sau khi trộn đều mẫu với CPA, mẫu được ổn định ở nhiệt độ phòng 10 phút trước khi bảo quản lạnh. Đây là khoảng thời gian để cho glycerol (thành phần trong Sperm Freeze) trong môi trường ngoại bào trao đổi nước với môi trường nội bào qua màng tế bào [7].

Thủy tinh hóa tinh trùng với thể tích nhỏ là một trong những hướng tiếp cận mới với nhiều nghiên cứu sử dụng các vật chứa khác nhau được làm từ vật liệu sinh học như màng trong suốt [7] và phi sinh học (mini-straw, hạt alginate, cryoloop, cryotop). Tác giả Cohen và CS (1997) nghiên cứu hiệu quả của bảo quản lạnh tinh trùng bằng màng trong suốt ở người [8]. Tuy nhiên, các vật liệu trên đều có nhược điểm là tiềm ẩn nguy cơ lây nhiễm chéo, chi phí cao đối với cryotop và quy trình phức tạp. Chúng tôi sử dụng vật chứa là tuýp PCR có thể bảo quản lạnh mẫu với thể tích rất nhỏ, an toàn trong các labo [9].

Khi so sánh chỉ số CSF sống và CSF di động ở nhóm thiếu tinh nặng và vô tinh do tắc có sử dụng CPA có xu hướng cao hơn so với không sử dụng CPA. Tại thời điểm rã đông T1, ở nhóm thiếu tinh nặng, chỉ số CSF sống ở nhóm có CPA cao hơn nhóm không CPA ($72,06 \pm 5,94$ so với $50,45 \pm 4,63$), với $p = 0,000$. Tỷ lệ CSF di động ở nhóm CPA cao hơn so với nhóm không CPA. Tại các thời điểm rã đông sau bảo quản lạnh 4 tuần và 8 tuần cũng cho kết quả tương tự, với CSF sống và CSF di động ở nhóm có sử dụng CPA đều cao hơn so với không sử dụng CPA, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Đối với nhóm vô tinh, tại từng thời điểm rã đông sau thời gian bảo quản lạnh 1 tuần, 4 tuần và 8 tuần cũng đều cho kết quả mẫu tinh trùng vô tinh có sử dụng CPA có CSF sống và CSF di động có xu hướng cao hơn so với mẫu tinh trùng vô tinh không sử dụng CPA, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Giải thích cho điều này là do nhóm có bổ sung CPA CPA là những chất có trọng lượng phân tử thấp và có tính thấm cao được sử dụng để bảo vệ tinh trùng, tránh sự hình thành tinh thể đá trong quá trình bảo quản lạnh. Đây chính là yếu tố gây tổn thương tinh trùng trong quá trình bảo quản lạnh và làm giảm các chỉ số CSF di động và CSF sống sau rã đông.

Kết quả về CSF di động và CSF sống trong nghiên cứu của chúng tôi tương tự các nghiên cứu của Widyastuti R và CS (2017) [9] và Nguyễn Thị Hằng (2018) với phương pháp đông tinh viên [10]. Trong nghiên cứu của Widyastuti R và CS (2017), các mẫu được chia thành hai nhóm sử dụng hai CPA khác nhau. Tinh trùng được bảo quản lạnh bằng hơi nitơ lỏng. Kết quả là các mẫu tinh trùng được bảo quản lạnh bằng CPA có tỷ lệ CSF động và CSF sống cao hơn đáng kể (56%) so với những sản phẩm thủy tinh hóa không có CPA (lần lượt là 35% và 48%, $p < 0,05$) [9]. Nhược điểm của nghiên cứu trừ đông tinh trùng ở các nghiên cứu trên là mẫu tinh dịch phơi nhiễm với nitơ lỏng, do đó có nguy cơ lây nhiễm từ môi trường nitơ lỏng và nhiễm chéo giữa các mẫu. Để khắc phục nhược điểm này, nghiên cứu của chúng tôi sử dụng mẫu tinh dịch với thể tích nhỏ 5 μ L được cho vào các tuýp PCR và 2 tuýp PCR trong cryotube sẽ hạn chế việc lây nhiễm so với các nghiên cứu về trừ đông tinh trùng trước đây.

KẾT LUẬN

Chất lượng tinh trùng sau bảo quản lạnh bằng kỹ thuật thủy tinh hóa cải biên trong tuýp PCR đã được cải thiện đáng kể. Sau bảo quản, nhóm có sử dụng CPA cho kết quả sau rã đông tốt hơn so với nhóm không sử dụng CPA ở cả nhóm thiếu tinh nặng và vô tinh do tắc.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn chân thành tới các chuyên viên phôi học của Khoa Hỗ trợ sinh sản, kíp phẫu thuật Khoa Nam học, Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội và các BN đồng ý tham gia nghiên cứu đã giúp đỡ chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. P Desrosiers, C Légaré, P Leclerc, et al. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events. 2006; 85(6):1744-1752.
2. G Vajta and ZPJRbo Nagy. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? *Review on Vitrification*. 2006; 12(6):779-796.
3. A Hasegawa, K Mochida, T Tomishima, et al. Microdroplet in vitro fertilization can reduce the number of spermatozoa necessary for fertilizing oocytes. 2014; 60(3):187-193.
4. Y Chen, L Li, Y Qian, et al. Small-volume vitrification for human spermatozoa in the absence of cryoprotectants by using Cryotop. 2015; 47(6):694-699.
5. Trịnh Sinh Tiên. Đánh giá chất lượng tinh trùng sau bảo quản lạnh sâu ở những mẫu tinh trùng người đã được lọc rửa. *Luận văn Thạc sỹ Y học*, Trường Đại học Y Hà Nội. 2007.
6. V Isachenko, E Isachenko, J Reinsberg, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparison of rapid and conventional freezing. 2007; 55(3):261-268.
7. NN Desai, H Blackmon and JJRBO Goldfarb. Single sperm cryopreservation on cryoloops: An alternative to hamster zona for freezing individual spermatozoa. *Reproductive Bio Medicine Online*. 2004; 9(1):47-53.
8. J Cohen, GJ Garrisi, TA Congedo-Ferrara, et al. Cryopreservation of single human spermatozoa. 1997; 12(5):994-1001.
9. R Widyastuti, R Lesmana, A Boediono, et al. Effect of cryoprotectants on sperm vitrification. *Advances in Biomolecular Medicine*. CRC Press. 2017:119-122.
10. Nguyễn Thị Hằng. Kết quả bảo quản lạnh mẫu tinh dịch bình thường và thiểu tinh nặng khi sử dụng máy Nicool LM10 và phương pháp đông tinh viên. *Luận văn Thạc sỹ Y học*, Trường Đại học Y Hà Nội. 2018.