

KẾT QUẢ NUÔI CẤY PHÔI THỤ TINH TRONG ỐNG NGHIỆM VỚI TINH TRÙNG TRỮ LẠNH SAU PHẪU THUẬT TRÍCH TINH TRÙNG

Nguyễn Thị Thái Thanh, Lê Minh Tâm, Cao Ngọc Thành
Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế

Tóm tắt

Mục tiêu nghiên cứu: Đánh giá kết quả nuôi cấy phôi thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng trữ lạnh sau phẫu thuật trích tinh trùng.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu hồi cứu trên 27 cặp vợ chồng đến khám và điều trị tại Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh – Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế (HUECREI) từ tháng 01/2014 đến tháng 12/2015, chia làm 2 nhóm: nhóm 1 – 17 chu kỳ sử dụng tinh trùng trữ lạnh sau phẫu thuật trích tinh trùng, nhóm 2 – 10 chu kỳ sử dụng tinh trùng tươi từ phẫu thuật.

Kết quả: Tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ phôi phân chia, tỷ lệ phôi tốt giữa hai nhóm sai khác không có ý nghĩa thống kê, lần lượt là nhóm 1: 67,16% ± 21,27, 72,29% ± 27,08 và 36,62% ± 19,05, nhóm 2: 92,23% ± 17,55, 78,95% ± 17,38 và 40,23% ± 16,26 ($p > 0,05$). Tỷ lệ có thai lâm sàng của 2 nhóm là 27,64% và 30% ($p > 0,05$).

Kết luận: Kết quả có thai của nhóm sử dụng tinh trùng trữ lạnh và nhóm sử dụng tinh trùng tươi từ phẫu thuật trích tinh trùng là tương đương nhau.

Abstract

RESULTS OF EMBRYOS CULTURE IN IVF/ICSI USING FROZEN-THAWED SPERM FROM SURGICAL SPERM RETRIEVAL

Objective: To determine the results of embryos culture using frozen-thawed sperm from surgical sperm retrieval.

Methods: Prospective study on 27 ICSI cycles dividing into 2 group: using frozen-thawed sperm group ($n=17$) and using fresh sperm group ($n=10$) from 01/2014 to 12/2015, at the Hue Center for Reproductive Endocrinology and Infertility.

Results: The frozen-thawed sperm group showed no statistically significant differences from the fresh sperm group in the rate of fertilization, cleavage, good quality embryos and clinical pregnancy

Tác giả liên hệ (Corresponding author):

Nguyễn Thị Thái Thanh,
email: thanhtmg@gmail.com

Ngày nhận bài (received): 10/03/2016

Ngày phản biện đánh giá bài báo (revised):
20/04/2016

Ngày bài báo được chấp nhận đăng
(accepted): 25/04/2016

(67,16% ± 21,27, 72,29% ± 27,08, 36,62% ± 19,05 and 27,64% vs 92,23% ± 17,55, 78,95% ± 17,38, 40,23% ± 16,26 and 30%, respectively) ($p > 0,05$).

Conclusion: No differences existed between the use of fresh and frozen spermatozoa.

1. Giới thiệu

Nam giới được chẩn đoán vô tinh (azoospermia) sau các xét nghiệm tinh dịch đồ được ghi nhận là do thiếu vắng tinh trùng trong tinh dịch (WHO, 2010). Nguyên nhân là bởi một trong hai tinh hoàn thất bại việc khởi phát hoặc duy trì sự sinh tinh vì lý do tại chỗ hoặc các bất thường ngoại sinh (vô tinh do không tắc nghẽn) hoặc tắc nghẽn hệ thống dẫn tinh. Vô tinh có thể phân ra 2 loại, đó là vô tinh do tắc nghẽn (Obstructive azoospermia: OA) và vô tinh không do tắc nghẽn (Non-obstructive azoospermia: NOA) (Dohle và cs, 2005; McLachlan và cs, 2007). Phương pháp chính xác phân biệt giữa OA và NOA chính là mổ trích tinh trùng. Đây là phương pháp đòi hỏi phải thực hiện các thủ thuật trên tinh hoàn, mào tinh hoàn của bệnh nhân vô tinh, nhờ đó có thể thu được tinh trùng từ bệnh nhân.

Tinh trùng sau phẫu thuật trích ly tinh trùng thường được trữ lạnh để sử dụng cho nhiều lần ICSI. Việc đông lạnh tinh trùng làm giảm những khó khăn trong công tác chuẩn bị như thực hiện chọc hút trứng và phẫu thuật trích ly tinh trùng trong một ngày.

Hiện tượng bệnh nhân azoospermia đôi khi có một vài tinh trùng trưởng thành trong các lần xuất tinh khác được coi là azoospermia ảo (virtual azoospermia) (Tournaye và cs, 1995), và đó là hậu quả của sự biến động sinh tinh trong trường hợp vô tinh không do tắc nghẽn (Bendiksin và cs, 2008). Những tinh trùng này có thể được sử dụng để ICSI (Ron-EL và cs, 1997; Swanton và cs, 2007). Tuy nhiên, không có biện pháp nào đảm bảo có thể tìm ra tinh trùng trong ngày chọc hút trứng. Khi không có tinh trùng xuất tinh và không có tinh trùng trữ lạnh dự trữ thì có thể thực hiện phẫu thuật trích tinh trùng. Ngoài ra, một vài nam giới có thể có tinh trùng

chất lượng thấp và số lượng rất ít trong những lần xuất tinh. Đây được gọi là cryptozoospermia (WHO, 2010). Khi kết quả thụ tinh thấp hoặc khi không có kết quả có thai sau một vài chu kỳ với tinh trùng xuất tinh, việc sử dụng tinh trùng từ phẫu thuật trích ly có thể là một sự lựa chọn thay thế (Ron Hauser và cs, 2011).

Nguồn gốc tinh trùng, nguyên nhân hoặc mức độ vô sinh nam ảnh hưởng như thế nào đến kết quả ICSI vẫn còn là vấn đề tranh luận. Do đó không có sự lựa chọn rõ ràng nào giữa tinh trùng tươi và tinh trùng trữ lạnh cho ICSI đối với các trường hợp trên. (Christian Gnoth và cs, 2014).

Chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu nghiên cứu hiệu quả nuôi cấy phôi thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng trữ lạnh từ phẫu thuật trích ly tinh trùng nhằm tìm ra biện pháp hữu hiệu đối với bệnh nhân nam giới có khả năng sinh sản bị suy giảm nặng.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện theo phương pháp hồi cứu trên 27 cặp vợ chồng đến khám và điều trị tại Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh – Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế (HUECREI) từ tháng 01/2014 đến tháng 12/2015, với người chồng bị chẩn đoán là vô tinh khi không tìm thấy tinh trùng trong mẫu tinh dịch, và sau khi phẫu thuật trích tinh trùng tìm thấy tinh trùng sử dụng cho ICSI.

Thủ thuật được tiến hành tuân tự theo các phương pháp TESA (testicular sperm aspiration): sử dụng kim cánh én chọc vào tinh hoàn, sau đó hút dịch và mô tinh hoàn dưới áp lực âm, PESA (percutaneous epidymal sperm aspiration) tương tự như TESA, sử dụng kim én chọc và hút dịch ở mào tinh hoàn, TESE (testicular sperm

extraction) phẫu thuật sinh thiết tinh hoàn. Mẫu trích tinh trùng sẽ được gửi qua phòng lab để được xử lý, tìm tinh trùng. Tiến hành dùng thủ thuật khi phát hiện được tinh trùng trong mẫu trích.

Tinh trùng sau trích ly được trữ lạnh với môi trường Sperm Freeze (Vitrolife, Thụy Điển) và rã đông, xử lý vào ngày chọc hút trứng của người vợ. Vào ngày đó, người vợ được chọc hút trứng sau khi kích thích buồng trứng. Phức hợp trứng-tế bào hạt thu được sẽ được nuôi cấy trong G-IVF plus (Vitrolife, Thụy Điển), sau đó xử lý với Hyase 10X (Vitrolife, Thụy Điển). Quy trình tiêm tinh trùng vào bào tương trứng (intra cytoplasmic sperm injection – ICSI) được thực hiện như quy trình thường quy chuẩn. Trứng sau đó được nuôi cấy đơn trong G1 plus (Vitrolife, Thụy Điển) ở tủ nuôi cấy Galaxy 170S 37°C, 8% O₂, 5% CO₂. Đánh giá phôi ngày 3 theo tiêu chuẩn của Scott (2003) vào 66-68 giờ sau ICSI như sau: (1) Phôi tốt (loại I): phôi 6-8 tế bào, <10% mảnh vỡ, kích thước đồng đều, phôi bào đối xứng; (2) Phôi khá (loại II): phôi 6-8 tế bào, 10-20% mảnh vỡ, kích thước đồng đều hoặc không, phôi bào đối xứng hoặc không; (3) Phôi xấu (loại III): số lượng phôi bào không phải 6-8, >20% mảnh vỡ, kích thước không đều, phôi bào không đối xứng.

2-3 phôi tốt được lựa chọn để chuyển phôi vào ngày 3. Các phôi còn lại được trữ bằng môi trường đông phôi (Kitazato, Nhật Bản) sử dụng cho các chu kỳ chuyển phôi trữ.

Kết quả chính là tỷ lệ beta-hCG, tỷ lệ thai lâm sàng. Thử thai thực hiện vào 14 ngày sau khi chọc hút trứng, beta-hCG > 5 mIU/ml được xem là dương tính. Tỷ lệ thai lâm sàng (clinical pregnancy rate) được tính bằng tỷ lệ phần trăm các trường hợp có thai lâm sàng trên tổng số các trường hợp chuyển phôi. Thai lâm sàng được ghi nhận khi xác định được hình ảnh túi thai và đo được tim thai vào khoảng 3 tuần sau khi có xét nghiệm beta-hCG dương tính. Tỷ lệ đa thai bằng tỷ lệ phần trăm các trường hợp đa thai trên tổng số trường hợp có thai lâm sàng.

Xử lý số liệu: Sử dụng phần mềm SPSS 16.0 (Mỹ) với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi p-value < 0.05

3. Kết quả

Từ tháng 01/2014 đến tháng 12/2015, chúng tôi tiến hành nghiên cứu 27 chu kỳ nuôi cấy phôi với tinh trùng từ phẫu thuật trích tinh trùng trong đó bao gồm 17 chu kỳ sử dụng tinh trùng trữ lạnh (nhóm 1) và 10 chu kỳ sử dụng tinh trùng tươi (nhóm 2).

Bảng 1. Đặc điểm bệnh nhân

Đặc điểm	Nhóm 1	Nhóm 2	p value
Tuổi trung bình người vợ	33,12 ± 5,32	35 ± 5,93	p > 0,05
Thời gian vô sinh (năm)	3,82 ± 3,24	5,9 ± 4,18	p > 0,05
Nguyên nhân vô sinh			
- Do yếu tố chồng	17	10	
- Suy buồng trứng sớm	3	1	
- Buồng trứng đa nang	3	1	
- Vô tử cung	0	1	
- U xơ tử cung	0	1	
- Lạc nội mạc tử cung	1	1	

Bảng 2. Các thông số kết quả nuôi cấy phôi

	Nhóm 1	Nhóm 2	p value
Số trứng thu được	11,24 ± 7,69	9,4 ± 8,13	p > 0,05
Số trứng trưởng thành	9,35 ± 6,56	7,6 ± 6,33	p > 0,05
Tỷ lệ thu tinh (%)	67,16 ± 21,27	92,23 ± 17,55	p > 0,05
Tỷ lệ phôi phân chia (%)	72,29 ± 27,08	78,95 ± 17,38	p > 0,05
Tỷ lệ phôi tốt	36,62 ± 19,05	40,23 ± 16,26	p > 0,05

Bảng 3. Kết quả có thai của các chu kỳ chuyển phôi

	Nhóm 1	Nhóm 2	p value
Beta-hCG (+)	27,64%	30%	p > 0,05
Thai lâm sàng	27,64%	30%	p > 0,05

4. Thảo luận

Trong 27 chu kỳ ICSI với tinh trùng từ phẫu thuật trích tinh trùng tại Trung tâm chúng tôi, có 17 chu kỳ sử dụng tinh trùng đông lạnh và 10 chu kỳ sử dụng tinh trùng tươi.

Đặc điểm bệnh nhân của 2 nhóm được thống kê ở bảng 1. Chúng tôi nhận thấy rằng không có sự khác biệt đáng kể giữa 2 nhóm ở độ tuổi người vợ, 33 tuổi và 35 tuổi tương ứng với nhóm 1 và nhóm 2, tương tự với đặc điểm nhóm nghiên cứu của Ron Hauser và cs (2011) là 34 tuổi. Độ tuổi trung bình người vợ của nghiên cứu này khá cao, có trường hợp bệnh nhân trên 40 tuổi. Tuổi của người vợ là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến kết quả nuôi cấy phôi. Độ tuổi thích hợp để thực hiện ICSI là dưới 35 tuổi. Đối với phụ nữ ngoài 40, mặc dù sử dụng kỹ thuật hỗ trợ sinh sản tối ưu thì vẫn chỉ có khoảng dưới 20% cho kết quả có thai (Hiệp hội Y học Sinh sản Hoa Kỳ,

2008). Ở các cặp vợ chồng trong nghiên cứu, yếu tố vô sinh không chỉ xuất phát từ chồng mà còn do một trong các nguyên nhân khác liên quan đến người vợ bao gồm: suy buồng trứng sớm, buồng trứng đa nang, vòi tử cung, u xơ tử cung và lạc nội mạc tử cung. Thời gian vô sinh của nhóm 1 và nhóm 2 lần lượt là $3,82 \pm 3,24$ và $5,9 \pm 4,18$ năm.

Số trứng thu được trung bình của 2 nhóm lần lượt là 11,24 và 9,4. Nhóm 2 có số trứng thu được thấp hơn, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Số trứng trưởng thành giữa hai nhóm nghiên cứu không có sự khác biệt đáng kể, nhóm 1 có $9,35 \pm 6,56$ trứng MII và nhóm 2 có $7,6 \pm 6,33$ trứng.

Tỷ lệ thụ tinh của nhóm sử dụng tinh trùng trữ lạnh là $67,16\% \pm 21,27$ và thấp hơn nhiều so với nhóm sử dụng tinh trùng tươi ($92,23\% \pm 17,55$). Tuy tỷ lệ thụ tinh của nhóm 2 rất cao nhưng sự khác biệt giữa 2 nhóm không có ý nghĩa thống kê do cỡ mẫu nghiên cứu nhỏ. Trong khi đó, Fischer và cs (2011) lại chỉ ra sự khác biệt không lớn giữa 2 nhóm (61% và 75%).

Kết quả tỷ lệ phôi phân chia trong nghiên cứu này đối với nhóm 1 là $72,29\% \pm 27,08$ và nhóm 2 là $78,95\% \pm 17,38$. Mặc dù tỷ lệ thụ tinh của nhóm 2 cao hơn nhóm 1 nhưng tỷ lệ phôi phân chia của 2 nhóm lại xấp xỉ nhau. Trong khi đó, nghiên cứu của Ron Hauser và cs (2011) cho kết quả thấp hơn, lần lượt là 62,6% và 54,3%. Tuy tỷ lệ phôi phân chia khá cao nhưng tỷ lệ phôi tốt trong cả 2 nhóm đều thấp, tương ứng là $36,62\% \pm 19,05$ và $40,23\% \pm 16,26$, chứng tỏ chất lượng phôi khi ICSI với tinh trùng từ phẫu thuật trích tinh trùng không cao so với tinh trùng bình thường từ xuất tinh.

Nhóm sử dụng tinh trùng đông lạnh cho kết quả 27,64% có thai, trong khi đó, nhóm ICSI với tinh trùng tươi cho kết quả có thai cao hơn là 30%. Tuy nhiên sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê. Trong nghiên cứu của Ron Hauser và cs (2011), nhóm 1 cho tỷ lệ có thai thấp hơn nhiều so với nghiên cứu của chúng tôi (12,8%), nhóm 2 có tỷ lệ có thai cao hơn (42,9%). Tỷ lệ có thai thấp ở nhóm 2 cũng được Botelho và cs báo cáo năm 2011 (19,29%) khi

nghiên cứu 114 bệnh nhân nam và các ca có thai lâm sàng đều nằm trong nhóm bệnh nhân nữ có độ tuổi trung bình thấp 31,7 tuổi. Theo báo cáo của Hiệp hội Y học Sinh sản Hoa Kỳ (2008), tỷ lệ có thai lâm sàng đối với tinh trùng nguồn gốc từ phẫu thuật nằm trong khoảng 26-57%. Ở nhiều Trung tâm, kết quả có thai lâm sàng 30-40% là con số có thể mong đợi. Có một số nghiên cứu khi sử dụng tinh trùng từ phẫu thuật trích ly tinh trùng lại cho kết quả có thai rất cao. Fischer và cs (2011) đã báo cáo kết quả có thai đạt trên 60% trong cả 2 nhóm. Tỷ lệ này trong nghiên cứu của Jansen và cs (2000) của 2 nhóm lần lượt là 60,6% và 66,7%. Ngược lại, Kalsi và cs (2011) khi so sánh hiệu quả ICSI với mẫu tinh trùng rã đông và tinh trùng tươi thì cho kết quả có thai của nhóm 1 cao hơn (60% so với 32,1%).

Kết quả nuôi cấy phôi và có thai của nhóm sử dụng tinh trùng từ mẫu tươi tốt hơn do những tác động bất lợi của quy trình trữ lạnh và rã đông tinh trùng đến độ di động, những tổn thương của nhiễm sắc thể, hình thái học và phản ứng cực đầu của tinh trùng. O'Connel và cs (2002) đưa ra các ảnh hưởng đến hình dạng và chức năng của ty thể, đồng thời khả năng sống của tinh trùng rã đông cũng giảm. Độ di động của tinh trùng cũng giảm 25% sau khi rã đông (Prabakaran và cs, 2006). Theo Nicopoullos và cs (2004), đối với mẫu tinh trùng có nguồn gốc tinh hoàn, tỷ lệ thụ tinh không có sự khác biệt giữa hai nhóm nhưng tỷ lệ làm tổ bị ảnh hưởng đáng kể khi dùng tinh trùng trữ lạnh. Tuy nhiên, sử dụng tinh trùng trữ lạnh có thuận lợi trong việc đảm bảo có tinh trùng trong ngày chọc hút trứng và với một lần phẫu thuật có thể trữ lạnh tinh trùng dùng cho nhiều lần ICSI về sau.

5. Kết luận

- Kết quả nuôi cấy phôi với tinh trùng trữ lạnh từ phẫu thuật trích tinh trùng tương đương đối với tinh trùng mẫu tươi từ phẫu thuật.

- Nguồn gốc tinh trùng (từ mẫu trữ lạnh và mẫu tươi) đóng vai trò không đáng kể đến kết quả nuôi cấy phôi thụ tinh trong ống nghiệm.

Tài liệu tham khảo

- Christian Gnoth, Vitaly Markhinin, Beatrice Maxrath, Therese Skonieczny, Kerstin Friol, Judith Roos, Gohar Rahimi, Erhard Godehardt (2014), Impact of sperm cell source on the results of intracytoplasmic sperm injection, Springer ISSN 0932-0067.
- Bendikson KA, Neri OV, Takeuchi T, Tosch M, Schlegel PN, Rosenwaks Z, Palermo GD (2008), The outcome of intracytoplasmic sperm injection using occasional spermatozoa in the ejaculate of men with spermatogenic failure, *J Urol* 180:1060–1064.
- Botelho F, Figueiredo L, Leite R, Carvalho A, Tomada N, Vendeira P (2011), Which Men Have More Likelihood of Success with a Testicular Biopsy?, *J Urol* 78.
- Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W (2005), EAU Guidelines on male infertility, *Eur Urol* 48:703–711.
- Fischer M, Kovac J (2011), VF Using Surgically Obtained Spermatozoa May Be Preferred as the Primary Treatment Modality in Cases of Obstructive Azoospermia, *J Urol* 78.
- Janzen N, Goldstein M, Schlegel PN, Palermo GD, Rosenwaks Z (2000), Use of electively cryopreserved microsurgically aspirated epididymal sperm with IVF and intracytoplasmic sperm injection for obstructive azoospermia, *Fertil Steril* 74(4):696–701.
- Kalsi J, Thum MY, Muneer A, Pryor J, Abdullah H, Minhas S (2011), Analysis of the outcome of intracytoplasmic sperm injection using fresh or frozen sperm, *BJU Int.*107(7):1124–8.
- McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Hoei-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE (2007), Histological evaluation of the human testis – approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review, *Hum Reprod* 22:2–16.
- Nicopoulos JDM, Gilling-Smith C, Almeida PA, Norman-Taylor J, Grace I, Ramsay JWA (2004), Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis, *Fertil Steril* 82(3):691–701.
- O'Connell M, McClure N, Lewis SE (2002), The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function, *Hum Reprod* 17(3):704–9.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine in collaboration with the Society for Male Reproduction and Urology (2008), The management of infertility due to obstructive azoospermia, *Fertil Steril* 90(Suppl(3)):S121–4.
- Prabakaran SA, Agarwal A, Sundaram A, Thomas AJ, Jr, Sikka S (2006), Cryosurvival of testicular spermatozoa from obstructive azoospermic patients: The Cleveland Clinic Experience, *Fertil Steril* 86(6):1789–91
- Ron Hauser, Guy Bibi, Leah Yogev, Ariella Carmon, Foad Azem, Amnon Botchan, Haim Yavetz, Sandra e. Klieman, Ofer Lehavi, Ami amit, Dalit Ben-Yosef (2011), Virtual Azoospermia and Cryptozoospermia—Fresh/Frozen Testicular or Ejaculate Sperm for Better IVF Outcome?, *Journal of Andronoly* 32(5):484-490.
- Ron-El R, Strassburger D, Friedler S, Komarovski D, Bern O, Soffer Y, Raziel A (1997), Extended sperm preparation: an alternative to testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia, *Hum Reprod* 12:1222–1226.
- Swanton A, Itani A, McVeigh E, Child T (2007), Azoospermia: is sample centrifugation indicated? A national survey of practice and the Oxford experience, *Fertil Steril* 88:374–378.
- Tournaye H, Camus M, Goossens A, Liu J, Nagy P, Silber S, Van Steirteghem AC, Devroey P (1995), Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia, *Hum Reprod* 10:115–119.