

NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM TRỮ LẠNH MÔ TINH HOÀN VỚI HAI CHẤT BẢO QUẢN GLYCEROL VÀ DMSO

Nguyễn Đình Tảo*; Lê Thị Thu Hiền* và CS

TÓM TẮT

Tiến hành phân tích tinh trùng (TT) trên 65 mẫu mô tinh hoàn của 12 chuột nhắt trưởng thành, trong đó 25 mẫu sử dụng glycerol, 30 mẫu sử dụng DMSO, 5 mẫu mô tươi và 5 mẫu sau rã đông. Kết quả: tỷ lệ ống sinh tinh (OST) có cấu trúc bình thường, chất lượng TT được phân lập từ mô tinh hoàn sau trữ lạnh ở nhóm sử dụng glycerol kém hơn so với nhóm DMSO. Tuy cấu trúc OST và chất lượng của TT được phân lập từ mô tinh hoàn sau trữ lạnh giảm, nhưng có đủ số lượng dùng trong hỗ trợ sinh sản.

* Từ khóa: Mô tinh hoàn; Trữ lạnh; Chất bảo quản; Glycerol; DMSO.

EXPERIMENTAL STUDY ON TESTICULAR TISSUE CRYOPRESERVATION WITH GLYCEROL AND DMSO

SUMMARY

A semen analysis was done on 65 testicular tissue samples from 12 mice, of which 25 samples were preserved by glycerol (group 1), 30 samples preserved by DMSO (group 2), 5 fresh and 5 post-frozen samples. Result: Normal testicular tubuli and quality of sperm from group 1 were worse than that of group 2. Although the structure of testicular tubuli and quality of sperm from testicular reduced, it was adequate for ICSI.

* Key words: Testicular tissue; Cryopreservation; Glycerol; DMSO.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đối với những trường hợp vô sinh do không có TT trong tinh dịch, việc thu nhận TT từ mào tinh và mô tinh hoàn là cần thiết để thực hiện hỗ trợ sinh sản thông qua các thủ thuật như MESA, PESA, TESE,... Tuy nhiên, những thủ thuật này có thể gây tai biến như đau, chảy máu, nhiễm khuẩn... hay gây biến chứng tổn thương mào tinh, mô tinh hoàn, ảnh hưởng đến chức năng sinh sản và tình dục từ nhẹ tới nặng, thậm chí không hồi phục. Thủ thuật nhiều lần gây áp lực tâm lý, tăng chi phí điều trị cho

bệnh nhân.

Trữ lạnh mô tinh hoàn giúp bảo quản TT để làm ICSI khi thực hiện chu kỳ hỗ trợ sinh sản. Kỹ thuật này góp phần giảm số lần người chồng phải đến bệnh viện để thực hiện thủ thuật thu nhận TT, hạn chế tai biến, biến chứng của thủ thuật, giảm chi phí và thời gian điều trị cho người bệnh, giúp bác sỹ và người bệnh chủ động hơn trong quá trình điều trị. Có nhiều phương pháp trữ lạnh TT từ mào tinh và mô tinh hoàn, mỗi phương pháp có ưu điểm và hạn chế nhất định.

* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: PGS. TS. Quân Hoàng Lâm
GS. TS. Hoàng Văn Lương

Hiện nay trên thế giới, nhiều trung tâm hỗ trợ sinh sản đã triển khai áp dụng lưu trữ TT từ mào tinh hoặc OST và có thể sử dụng TT thu nhận từ OST trữ lạnh để làm ICSI.

Ở nước ta, thu nhận TT từ mào tinh và mô tinh hoàn bằng kỹ thuật MESA, PESA, TESE... bước đầu cho kết quả khả quan [9, 10]. Tuy nhiên, việc trữ lạnh mô tinh hoàn để hỗ trợ sinh sản cần tiếp tục được nghiên cứu.

Trên cơ sở khoa học và nhu cầu thực tế, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài này nhằm:

- *Đánh giá sự biến đổi hình thái mô tinh hoàn sau trữ lạnh.*

- *Bước đầu so sánh hai chất trữ lạnh chậm mô tinh hoàn là glycerol và DMSO.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

65 mẫu mô tinh hoàn của 12 con chuột nhắt trưởng thành, chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm:

- 55 mẫu trữ lạnh - rã đông (25 mẫu sử dụng hóa chất bảo quản glycerol, 30 mẫu sử dụng DMSO). Đông lạnh trong 2 tháng, sau đó rã đông.

- Tiến hành phân lập TT 10 mẫu (5 mẫu mô tươi và 5 mẫu sau rã đông), đánh giá tỷ lệ vận động và tỷ lệ sống chết.

** Hóa chất và thiết bị sử dụng trong nghiên cứu:*

Hóa chất:

- Glycerol (Sperm Frezze - Fertipro, Bỉ): lọ 20 ml.

- DMSO (D2650, Sigma, Đức): ống 5 ml.

- Fercult aspiration 100 ml.

- Fercul flushing (Fertipro, Bỉ) 20 ml.

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Phương pháp trữ lạnh mô tinh hoàn:*

Mẫu mô tinh hoàn sau khi lấy cho vào đĩa Petri có chứa dung dịch ferticult aspiration, sau đó, rửa sạch hết máu bám rồi chuyển sang đĩa khác có chứa môi trường ferticult flushing, rửa nhẹ nhàng, chuyển mẫu mô vào ống Nunc 1,8 ml đã được ghi mã số, nhỏ từng giọt chất bảo quản lạnh glycerol hoặc DMSO.

Bảo quản tất cả các mẫu trong 2 tháng, sau đó rã đông và đánh giá.

3. Phương pháp đánh giá.

** Với mẫu mô tinh hoàn:* trên tiêu bản kính hiển vi quang học: đánh giá từng OST ở vật kính 40X theo phương pháp bán định lượng của Victoria Keros [6].

- 0 điểm: hủy hoại nghiêm trọng > 50% OST, khi có 2/3 yếu tố sau:

+ Phá vỡ sự kết nối tế bào trong OST; lớp tế bào tách khỏi màng đáy; nhân của các tinh nguyên bào bị thu nhỏ.

+ Màng và nhân tế bào leydig bị phá hủy, chất đệm bị tan rã;

+ Màng đáy bị bong ra khỏi lớp áo xơ OST.

- 1 điểm: cấu trúc OST có sự thay đổi nhỏ.

- 2 điểm: không có sự thay đổi.

Điểm 1,2: cấu trúc OST được coi là bình thường.

** Với mẫu TT thu được sau khi phân lập từ mô tinh hoàn chuột trước và sau rã đông:*

- Đánh giá độ di động của TT trước và sau rã đông theo 3 chỉ tiêu:

- + TT di động tiến tới.
- + TT vận động tại chỗ.
- + TT di động: bằng tổng của TT di động tiến tới và TT vận động tại chỗ.
- Tỷ lệ sống TT trước và sau rã đông: đánh giá qua tiêu bản nhuộm Eosin - Nigrosin. Những TT bắt màu hồng hoặc đỏ là TT chết, những TT không bắt màu là TT sống.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Đánh giá cấu trúc mô tinh hoàn trước và sau rã đông.

* Cấu trúc mô tinh hoàn trước đông lạnh:

Bảng 1: Đặc điểm mô tinh hoàn chuột trước trữ lạnh.

| | ĐIỂM 2 | ĐIỂM 1 | ĐIỂM 2 + 1 | ĐIỂM 0 |
|--------------------|------------|-------------|------------|------------|
| Số lượng OST (200) | 77 | 82 | 159 | 41 |
| Tỷ lệ (%) | 38,5 ± 8,5 | 40,9 ± 10,4 | 79,4 ± 8,6 | 20,6 ± 8,5 |

Cấu trúc OST bình thường ở mô tinh hoàn chuột trước trữ lạnh chiếm 79,4%; 20,6% OST bị thương tổn, thường gặp nhất là các tế bào ở thành OST bị bong khỏi màng đáy, mô kẽ bị tan rã.

* Cấu trúc mô tinh hoàn chuột sau đông lạnh:

25 mẫu mô sử dụng chất bảo quản glycerol (nhóm I), 30 mẫu mô sử dụng DMSO (nhóm II), mỗi mẫu sau khi rã đông làm 2 tiêu bản kính hiển vi quang học, mỗi tiêu bản đánh giá 10 OST. Như vậy, nhóm I có 500 OST, nhóm II có 600 OST được đánh giá.

Bảng 2: So sánh kết quả trữ lạnh mô tinh hoàn sử dụng chất bảo quản glycerol và DMSO.

| PHƯƠNG PHÁP | | ĐIỂM | ĐIỂM 2 | ĐIỂM 1 | ĐIỂM 2 + 1 | ĐIỂM 0 |
|-------------|---------------|------|------------|------------|-------------|-------------|
| | | | | | | |
| Nhóm I | OST (n = 500) | | 32 | 77 | 109 | 391 |
| | Tỷ lệ % | | 6,4 ± 5,1 | 15,4 ± 8,2 | 21,8 ± 10,8 | 78,2 ± 10,7 |
| Nhóm II | OST (n = 600) | | 185 | 253 | 438 | 162 |
| | Tỷ lệ % | | 30,8 ± 6,7 | 42,2 ± 8,1 | 73,0 ± 9,43 | 27,0 ± 9,48 |
| p | | | < 0,01 | | | |

Ở nhóm sử dụng glycerol làm chất bảo quản lạnh, sau khi rã đông có 78,2% OST bị thương tổn; 21,8% OST có cấu trúc bình thường. Ở nhóm mô trữ lạnh sử dụng DMSO, tỷ lệ này lần lượt là 27,0% và 73%. Các tổn thương thường gặp ở nhóm I là tế bào bong khỏi màng đáy, mất sự liên kết giữa các tế bào, màng đáy không còn nguyên vẹn hoặc bị bong ra khỏi lớp áo xơ OST, mô kẽ bị tổn thương, có những vị trí mô kẽ tan rã hoàn toàn, nhóm II cũng gặp các thương tổn tương tự nhưng ít hơn.

2. Kết quả trữ lạnh TT được phân lập từ mô tinh hoàn chuột.

* Độ di động:

Bảng 3: So sánh độ di động của TT được phân lập từ mô tinh hoàn sau trữ lạnh sử dụng chất bảo quản glycerol và DMSO.

| | TRƯỚC TRỮ LẠNH | SAU TRỮ LẠNH | |
|-------------------------|----------------|--------------|------------|
| | | Nhóm I | Nhóm II |
| TT tiến tới (%) | 2,2 ± 1,7 | 0,00 | 1,3 ± 1,0 |
| TT vận động tại chỗ (%) | 25,7 ± 5,3 | 4,3 ± 1,2 | 16,4 ± 6,4 |
| Tổng TT vận động (%) | 27,9 ± 7,2 | 4,3 ± 1,4 | 17,8 ± 6,9 |

* Tỷ lệ sống - chết:

Bảng 4: So sánh tỷ lệ sống - chết của TT được phân lập từ mô tinh hoàn sau trữ lạnh sử dụng chất bảo quản glycerol và DMSO.

| | TRƯỚC TRỮ LẠNH | SAU TRỮ LẠNH | |
|----------------|----------------|--------------|------------|
| | | Nhóm I | Nhóm II |
| Tỷ lệ sống (%) | 71,2 ± 6,1 | 17,4 ± 11,4 | 49,3 ± 9,8 |

Các loại chất bảo quản (CBQ) hay được sử dụng nhất là glycerol, DMSO (dimethylsulfoxide), PrOH (1,2-propanediol), EG (ethylene glycol hay 1,2 -ethanediol). Các chất này thường hoạt động ở pha đầu tiên của quá trình khử nước, khi tế bào tiếp xúc với dung dịch có chứa CBQ, sự hiện diện của chúng ở môi trường ngoại bào khiến chênh lệch áp suất thẩm thấu, giúp rút nước ra khỏi tế bào, đồng thời các CBQ sẽ từ từ đi vào bên trong tế bào, thay thế phân tử nước. Tùy mục đích và phương thức trữ lạnh mà lựa chọn các CBQ khác nhau, trong trữ lạnh TT, mô tinh hoàn, 2 CBQ được lựa chọn đầu tiên là glycerol và DMSO.

Glycerol: là một hợp chất đường của rượu,

có nhiều trong tế bào gan của những động vật sống trong điều kiện nhiệt độ rất thấp, giúp máu của những động vật này không bị đông, do đó, nó tương thích với những vật chất sinh hóa trong tế bào sống. Glycerol có ưu điểm ít gây độc nên thường được sử dụng nhiều trong việc bảo vệ tế bào, tuy nhiên, nhược điểm của nó là khả năng thấm qua màng tế bào chậm.

Theo Abrishami M (2009) [3], Hallak J (2000) [3], Bell M (1993) [4]: khi pha thêm sodium citrate và fructose hoặc sodium citrate vào môi trường có egg yolk, glycerol và TEST, thấy không có sự khác nhau khi so sánh 3 loại môi trường và không tốt hơn so với bảo quản bằng glycerol đơn thuần. Ngày nay, nhiều nghiên cứu đề cập môi trường phối hợp với glycerol như TESTCY, GEYC và các dung dịch bảo quản được pha sẵn như sperm freeze. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Lan và CS (2000) [1] với sperm freeze, chỉ số CSF tăng cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm glycerol có bổ sung egg-yolk.

DMSO (Me₂SO): là một chất bảo vệ rất quan trọng, được phát hiện sau glycerol. DMSO được sản xuất và lưu hành từ năm 1953 với vai trò của một dung môi phổ biến. Năm 1961, bác sỹ Jacob tại Đại học Oregon, phát hiện DMSO có tác dụng của một chất bảo vệ tế bào, mô ở nhiệt độ lạnh sâu. Ngày nay, DMSO là chất bảo vệ rất quan trọng và phổ biến để bảo quản các tế bào và đặc biệt là mô của động vật có vú. Nhược điểm của DMSO là khả năng gây độc cho tế bào cao khi ở nhiệt độ cao và thời gian tiếp xúc dài, vì vậy, khi sử dụng DMSO trong trữ lạnh, người ta thường để tế bào tiếp xúc môi trường có chứa DMSO ở nhiệt độ thấp (0 - 4°C).

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu phương pháp trữ lạnh 65 mẫu mô tinh hoàn chuột trưởng thành, chúng tôi rút ra một số nhận xét sau:

1. Đánh giá sự biến đổi hình thái mô tinh hoàn sau trữ lạnh.

Cấu trúc OST và chất lượng của TT được phân lập từ mô tinh hoàn trước và sau trữ lạnh thay đổi có ý nghĩa thống kê. TT thu được khi phân lập từ mô tinh hoàn sau trữ lạnh có thể đủ số lượng dùng trong hỗ trợ sinh sản.

Các thương tổn thường gặp là tế bào bong khỏi màng đáy, mất sự liên kết giữa các tế bào, màng đáy không còn nguyên vẹn hoặc bị bong ra khỏi lớp áo xơ OST, mô kẽ bị tổn thương, có những vị trí mô kẽ tan rã hoàn toàn.

2. So sánh hai chất trữ lạnh chậm mô tinh hoàn.

Tỷ lệ OST có cấu trúc bình thường, chất lượng TT được phân lập từ mô tinh hoàn sau trữ lạnh ở nhóm sử dụng glycerol kém hơn nhóm DMSO có ý nghĩa thống kê.

+ Tỷ lệ OST có cấu trúc bình thường ở nhóm I: 21,8%; nhóm II: 73%.

+ Phân lập TT từ mô tinh hoàn sau rã đông: nhóm I: 4,3% di động; 17,4% TT sống; nhóm II: tỷ lệ di động: 17,8%; tỷ lệ sống 49,3%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Thu Lan, Đặng Quang Vinh. Kỹ thuật trữ lạnh trong hỗ trợ sinh sản. Thụ tinh trong ống nghiệm. 2010, 19, tr.387-408.

2. Hồ Mạnh Tường. Trữ lạnh TT người trong thụ tinh nhân tạo. Thời sự Y dược học. 2000, 5, tr.8-13.

3. Abrishami M, Anzar M, Yang Y, Honaramooz A. Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. Theriogenology. 2009, 73, pp.86-96.

4. Bell M, Wang R, Hellstrom MJ, Sikka S.C. Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. J Androl. 1993, 14 (6), pp.472-478.

5. Craft I, Tsirigotis M. Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. Hum Reprod. 1995.

6. Keros V. Cryopreservation of human fetus testicular tissue and low temperature bank creation for further application in clinical transplantology. Prob Cryobiol3, 1999, pp.54-58.

7. Oates R.D, Mulhall J, Burgess C, Cunningham D, Carson R. Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with non-obstructive azoospermia. Human Reproduction. 1997, Vol 12, No 4 pp.734-739.

8. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A.C. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon in to an oocyte. Lancet. 1992, 340, pp.17-18.

9. Saritha K.R, Bongso A. Comparative evaluation of fresh and washed human sperm cryopreserved in vapor and liquid phases of liquid nitrogen. J Androl. 2001, 22 (5), pp.857-862.

10. Schoroeder-P I, Zumbe J, Bispink L et al. Microsurgical epididymal sperm aspiration: aspirate analysis and straws available after cryopreservation in patient with non-obstructive azoospermia. Hum Reprod. 2000, 15, pp.2531-2535.