

NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG THỂ THỎ CHỐNG TINH TRÙNG NGƯỜI VÀ XÁC ĐỊNH MỨC ĐỘ NGỪNG KẾT TINH TRÙNG TRÊN NGƯỜI

**HỒ QUANG HUY, PHẠM ĐĂNG KHOA,
PHAN MAI HOA, ĐỖ THỊ NGÀ, NGUYỄN VĂN TUẤT**
Trường Đại học Y Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vô sinh, một vấn đề lớn về mặt xã hội, là một bệnh phức tạp trong các bệnh lý phụ khoa, bệnh do nhiều nguyên nhân. Vô sinh là tình trạng không có thai từ 12 tháng trở lên, khi có thực hiện quan hệ đều đặn và không áp dụng biện pháp tránh thai. Vấn đề vô sinh hiện nay có xu hướng tăng và là một lĩnh vực rất đáng được quan tâm trong chăm sóc sức khỏe sinh sản. Hiện nay, một số nguyên nhân gây vô sinh đã được phát hiện, từ đó đã đưa ra được phương pháp điều trị thích hợp.

Một trong những nguyên nhân gây vô sinh hiện nay đang được quan tâm và nghiên cứu đó là vô sinh do miễn dịch. Là bệnh rối loạn tự miễn, vô sinh do miễn dịch xảy ra ở cả nam lẫn nữ. Ở người mắc bệnh này, hệ miễn dịch của họ sẽ nhận biết tinh trùng là một kháng nguyên (KN) lạ, cơ thể sẽ sản xuất ra kháng thể (KT) chống lại và tiêu diệt tinh trùng dẫn đến hiện tượng vô sinh, KT đó được gọi là kháng thể chống tinh trùng (KTCTT). Trong huyết thanh của người phụ nữ bị vô sinh do miễn dịch, KTCTT làm cho tinh trùng ngưng kết lại với nhau, làm mất khả năng di chuyển của tinh trùng (TT) đến gặp trứng, gây nên vô sinh. Nghiên cứu về KTCTT trong nước ta vẫn còn ít, nhất là trong chẩn đoán và điều trị vô sinh.

Vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm:

Tạo KTCTT người trên thỏ bằng phương pháp gây miễn cảm.

Xác định mức độ ngưng kết trực tiếp giữa huyết thanh người vợ dương tính với KTCTT và tinh trùng người chồng.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng là thỏ: 3 thỏ, to, khỏe, cân nặng từ 2-2,5kg

Đối tượng là bệnh nhân được xác định theo tiêu chuẩn sau

Đã được xác định vô sinh tại các bệnh viện chuyên khoa, nghi ngờ nguyên nhân vô sinh do miễn dịch,

2. Các kỹ thuật nghiên cứu

Kỹ thuật gây miễn cảm

Chọn đối tượng thỏ: theo tiêu chuẩn mục 2.1

Mẫu tinh dịch của nhiều người (có số lượng TT từ 60.10^6 TT/ml trở lên) độ hoạt động của TT trên 70%, trộn đều với nhau

Kháng nguyên tinh trùng người được trộn đều với tá chất tạo thành một hỗn dịch đục trắng như sữa, quánh và không tan trong nước trong vòng 10 phút.

Trong đó, lần tiêm thứ nhất và thứ ba dùng với tá chất Freund hoàn toàn; lần tiêm thứ hai và thứ tư với tá chất Freund không hoàn toàn

Tiêm dưới da ở nhiều vị trí khác nhau dọc theo cột sống bốn lần tiêm cách nhau 1 tuần

Sau 7- 10 ngày kể từ lần gây miễn dịch cuối cùng huyết thanh thỏ được thu thập, lấy máu thỏ qua động mạch cảnh.

Sau đó ly tâm tách huyết thanh. Huyết thanh thỏ được đông khô và cất giữ ở -20 độ C.

Xác định sự sản xuất KTCTT trong huyết thanh thỏ bằng kỹ thuật miễn dịch ELISA.

Kỹ thuật ngưng kết

Dùng kỹ thuật ngưng kết tinh trùng Franklin-dukes (F-D test)

Chọn đối tượng theo mục 2.2.2

Lấy tinh dịch của người chồng, pha loãng với dung dịch đệm Baker [16] tới mật độ 5.10^6 TT/ml

Huyết thanh người vợ:

Lấy máu từ tĩnh mạch, ly tâm tách huyết thanh

Khử bỏ thể ở 56°C trong vòng 30 phút

Bảo quản ở 4°C đến khi sử dụng

Huyết thanh thỏ: khử bỏ thể ở 56°C trong vòng 30 phút

Quá trình thực hiện

	Bất hoạt 56°C/30 phút	Tinh dịch đã pha loãng	Ủ
Chứng +	100µl HT thỏ chống TT người	100µl (chứa 5.10^6 TT/ml)	37°C
Chứng -	100µl nước muối sinh lý	100µl (chứa 5.10^6 TT/ml)	37°C
Mẫu HT thử	100µl HT cần thử	100µl (chứa 5.10^6 TT/ml)	37°C

Tại thời điểm sau 1 giờ, từ mỗi ống lấy ra một giọt, soi trên kính hiển vi thường

Kết quả đánh giá dựa vào tỷ lệ số tinh trùng ngưng kết trên toàn bộ số tinh trùng, kết quả dương tính khi tỷ lệ này trên 10% [2] [4] [12]

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả nghiên cứu gây miễn cảm tạo KTCTT trên thỏ

Định lượng nồng độ KTCTT trong huyết thanh thỏ sau quá trình gây miễn cảm ta được kết quả

Thỏ 1: thỏ xám

Thỏ 2: thỏ đen

Thỏ 3: thỏ loang

Bảng 1: Nồng độ KTCTT ở 3 loại thỏ gây miễn cảm

Thỏ	Nồng độ kháng thể (UI/ml)
1	660,6
2	483,1
3	299,1

Để tạo được miễn cảm thỏ với KTCTT ta dựa vào nguyên lý của miễn dịch dịch thể. Kháng nguyên lạ xâm nhập lần đầu vào cơ thể sẽ kích thích cơ thể sinh kháng thể chống lại kháng nguyên đó. Đáp ứng miễn dịch tiên phát có cường độ đáp ứng kém, thời gian duy trì ngắn, những lần tiếp xúc sau với kháng nguyên, cơ thể sinh ra nhiều kháng thể hơn và có ái tính cao hơn.

Do đó ta tiêm KN tinh trùng người vào cơ thể thỏ 4 lần, mỗi lần cách nhau 1 tuần để cơ thể thỏ tạo được phản ứng miễn dịch với nồng độ cao, có ái tính cao. Mỗi lần thực hiện, KT sẽ được trộn với tá chất Freund hoàn toàn hoặc Freund không hoàn toàn. Thu hoạch huyết thanh thỏ sau 7-10 ngày từ lần tiêm cuối, vì đây là thời điểm nồng độ kháng thể trong máu là cao nhất [2]

Nồng độ KTCTT trong huyết thanh ≥ 60 UI/ml là dương tính với KTCTT. Nồng độ KTCTT trong huyết thanh thỏ của 3 con thỏ xám, đen và loang lần lượt là 660,6 UI/ml; 483,1 UI/ml và 299,1 UI/ml. Kết quả định lượng KTCTT trong huyết thanh thỏ cho thấy thỏ gây miễn cảm đáp ứng tốt với KN tinh trùng người. So với nghiên cứu của D'Cruz OJ khi gây miễn cảm thỏ với KN tinh trùng người [9] thì cũng có kết quả tương đương

Trong ba con thỏ gây miễn cảm, thỏ xám là thỏ có nồng độ KTCTT cao nhất, đáp ứng miễn dịch cao hơn những con thỏ có màu lông khác, cùng cân nặng, cùng điều kiện nuôi dưỡng. Theo D'Cruz OJ [9] thỏ xám cũng có đáp ứng miễn dịch cao hơn thỏ đen, thỏ trắng và thỏ nâu cùng cân nặng và điều kiện nuôi dưỡng.

Xác định mức độ ngưng kết trực tiếp giữa huyết thanh người vợ dương tính với KTCTT và tinh trùng người chồng.

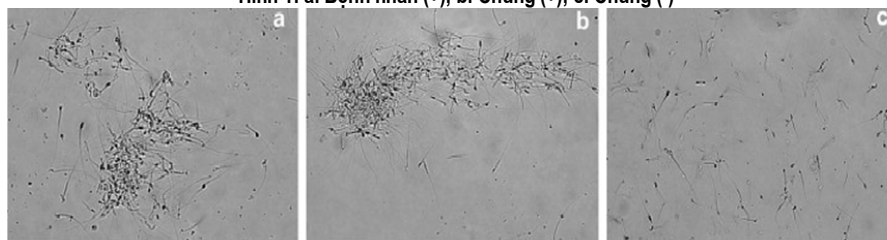
Chúng tôi sử dụng kỹ thuật ELISA để xác định nồng độ kháng thể chống tinh trùng trong huyết thanh bệnh nhân. Trong số 31 bệnh nhân nữ làm xét nghiệm tìm KTCTT bằng kỹ thuật ELISA thì có 9 người dương tính, 9 người này ta tiếp tục lấy huyết thanh và sử dụng kỹ thuật ngưng kết F-D test để xác định mức độ gây ngưng kết với tinh trùng người chồng. Ta chia ra làm 3 nhóm với nồng độ KTCTT tăng dần, và mức độ ngưng kết cũng có sự khác nhau giữa 3 nhóm

Nhóm 1: có nồng độ KTCTT 60-79 UI/ml. Nhóm này có mức độ ngưng kết từ 20 đến 40%, thấp nhất trong ba nhóm.

Nhóm 2: có nồng độ KTCTT 80-99 UI/ml. Nhóm này có mức độ ngưng kết từ 50 đến 60%, cao thứ hai trong ba nhóm.

Nhóm 3: có nồng độ KTCTT ≥ 100 UI/ml. Nhóm này có mức độ ngưng kết từ 50 đến 80%, cao nhất trong ba nhóm.

Hình 1: a: Bệnh nhân (+); b: Chứng (+); c: Chứng (-)



Bảng 2. Mức độ ngưng kết ở nhóm nồng độ KTCTT thấp (nhóm 1: 60-79UI/ml)

Bệnh nhân	Nồng độ (UI/ml)	%Ngưng kết
1	60,8	20-25
2	61,5	30-35
3	62,3	20-30
4	71,9	30-35
5	73,4	35-40
6	79,9	30-40

Trong số 6 bệnh nhân nữ dương tính có nồng độ KTCTT trong khoảng 60-79 UI/ml làm kỹ thuật ngưng kết với tinh trùng chồng cả 6 trường hợp đều gây được ngưng kết ở mức độ trên 20% đến 40%

Bảng 3. Mức độ ngưng kết ở nhóm nồng độ KTCTT trung bình (nhóm 2: 80-99UI/ml)

Bệnh nhân	Nồng độ (UI/ml)	%Ngưng kết
7	86,8	50-60

Nhóm bệnh nhân có nồng độ KTCTT 80-99UI/ml có 1 bệnh nhân.

Mức độ ngưng kết đạt 50-60%, cao hơn hẳn nhóm có nồng độ KTCTT 60-79 UI/ml

Bảng 4. Mức độ ngưng kết ở nhóm nồng độ KTCTT cao (nhóm ≥ 100 UI/ml)

Bệnh nhân	Nồng độ	%ngưng kết
8	109	50-60
9	157,1	70-80

Nhóm bệnh nhân có nồng độ KTCTT ≥ 100 UI/ml có 2 bệnh nhân.

Mức độ ngưng kết đạt từ 50-80%, cao hơn nhóm 80-99UI/ml và nhóm 60-79UI/ml Nguyên tắc của kỹ thuật ngưng kết dựa vào phản ứng ngưng kết của KN-KT

Chúng tôi sử dụng kỹ thuật ngưng kết tinh trùng Franklin-dukes (F-D test). Dùng một mẫu huyết thanh làm chứng dương, đó là mẫu huyết thanh được chế tạo từ kỹ thuật gây miễn cảm, một mẫu làm chứng âm (nước muối sinh lý). Khi huyết thanh của người vợ có KTCTT, KT trong huyết thanh người vợ sẽ kết hợp với KN trên bề mặt của tinh trùng chồng, tinh trùng tạo thành phức hợp KN-KT gây ra hiện tượng "ngưng kết"

Sắp xếp số thứ tự theo chiều tăng dần của nồng độ KTCTT trong cả ba nhóm thì mức độ ngưng kết tinh trùng đa phần cũng tỷ lệ thuận với chiều tăng nồng độ, nồng độ KTCTT càng cao thì mức độ ngưng kết càng cao. So với báo cáo trên thế giới của Marshburn PB [6] và Naz RK [11] kết quả không có sự khác biệt.

Tuy nhiên ta cũng thấy có một số trường hợp ngược lại, bệnh nhân thứ 2 (61,5 UI/ml) có nồng độ KTCTT thấp hơn nồng độ của bệnh nhân thứ 3 (62,3 UI/ml) nhưng mức độ gây ngưng kết cao hơn. Bệnh nhân thứ 7 nồng độ KTCTT 86,8 UI/ml thấp hơn bệnh nhân thứ 8 (109 UI/ml) nhưng mức độ ngưng kết bằng nhau (50-60%). Những trường hợp này do những người phụ nữ thứ 2 và 7 có yếu tố cá thể khác biệt, sẽ gây hiện tượng ngưng kết với mức độ nhiều hơn những người có

nồng độ tương tự. Lại một lần nữa, yếu tố “cá thể” có vai trò trong phản ứng tự miễn của cơ thể.

Số liệu thu được từ nghiên cứu về mức độ ngưng kết của KTCTT là số liệu định tính và dao động trong khoảng, đó là nhược điểm của phương pháp này. Bên cạnh ưu điểm các F-D test cho phép đánh giá chất lượng của KTCTT, được sử dụng như là một xét nghiệm sàng lọc để xác định hiện tượng ngưng kết tinh trùng do KTCTT và là một bằng chứng về tác dụng điều trị trong các trường hợp vô sinh. Nhược điểm của nó là các thông số của các F-D test vẫn có thể dao động và không có con số cụ thể, phụ thuộc vào kinh nghiệm người đọc kết quả. [7]

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu đề, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Đã sản xuất thành công KTCTT người trên thỏ bằng kỹ thuật gây miễn cảm với kết quả: Thỏ xám (660,6 UI/ml) là thỏ có đáp ứng miễn dịch cao hơn thỏ có màu lông đen (483,1 UI/ml) và loang (299,1 UI/ml).

Mức độ ngưng kết trực tiếp tinh trùng người chồng có mối liên quan thuận với nồng độ KTCTT trong huyết thanh người vợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Vương Văn Vệ và Cs (2010). *Nghiên cứu vô sinh nam không do tinh trùng*. Nam học và hiếm muộn Hà Nội.
2. Phạm Đăng Khoa (2007). *Nghiên cứu ứng dụng qui trình tạo KT kháng Heparan Sulfate Interacting Protein và đánh giá mức độ biểu lộ Protein của HIP ở các mô*. Trường Đại học Y Hà Nội.
3. Nguyễn Triệu Vân (1993). *Tim hiểu sự xuất hiện tự kháng thể chống tinh trùng ở nam giới sau thất ống dẫn tinh*. Trường Đại học Y Hà Nội.

4. Trần Thị Chính và cộng sự (2008) *KTCTT sau thất ống dẫn tinh*. Tạp chí y học.

5. Suresh C. Sikka and Wayne J. G. Hellstrom (5/2010). *Tests for antisperm antibodies*. Cambridge University Press. pp. 603-612.

6. Marshburn PB, Kutteh WH (1994). *The role of antisperm antibodies in infertility*. U.S. National Library of Medicine - National Institutes of Health. Steril 61, 799-811.

7. Mettler L, Gradl (2010) *Difficulty of obtaining reproducibility in the Franklin and Dukes test for the detection of sperm-agglutinating antibodies in human sera*. Reproduction – the journal of the society for reproduction and fertility.

- A. J.-H. Adeghe, J. Zhang, J. Cuthbert, M. Obhrai (16 May 2008). *Antisperm antibodies and sperm motility: a study using timed exposure photomicrography*. International Journal of Andrology, 12: 281–285.

8. D'Cruz OJ, Haas GG Jr Res. (1995). *Protection of sperm from isoimmune attack in vivo by pretreatment with antisperm Fab: fertility trials in the immune rabbit model*. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol 88, 243-270.

9. SS, Wang L. Kamada M. (2000). *Antisperm antibodies associated with infertility - properties and encoding genes of target antigens*. Biol. Med press. 224, 123-132.

10. Naz RK, Ahmad K, Menge AC. (1993). *Antiidiotypic antibodies to sperm in sera of fertile women that neutralize antisperm antibodies*. The Journal of Clinical Investigation. 92, 2331-2338.

11. F.Karimi, S.Khazaei, F.Alaedin. (2008). *Serum antisperm antibodies in Fertile and Infertile Individuals*. Archive of SID IJMS. 33 No2