

NGHIÊN CỨU HÌNH THÁI TẾ BÀO GỐC SINH TINH VÀ TINH TRÙNG TRONG QUÁ TRÌNH NUÔI CẤY

Nguyễn Đình Tảo*; Quản Hoàng Lâm*; Trịnh Thế Sơn* và CS

TÓM TẮT

Nuôi cấy các tế bào dòng tinh là phương pháp điều trị có nhiều triển vọng cho bệnh nhân (BN) không có tinh trùng trong tinh dịch không do tắc. Bài báo này đề cập đến việc kiểm tra, đánh giá số lượng và hình thái các tế bào được sinh sản và phát triển trong môi trường nuôi cấy từ tế bào gốc (TBG) sinh tinh. Kết quả bước đầu cho thấy TBG sinh tinh phát triển trong môi trường nuôi cấy, phân chia giảm nhiễm tạo thành các tinh tử.

* Từ khóa: Tế bào gốc; Nuôi cấy tế bào dòng tinh; Hình thái tế bào gốc sinh tinh.

STUDY OF MORPHOLOGY OF SPERMATOGENESIS CELL AND SPERM IN VITRO CULTURE

SUMMARY

In vitro culture of spermatogenesis cell is one of prospective methods for non-obstructive azospermia patients. In this paper, we focus on the number and morphology of spermatogenesis cells in vitro of culture. The results show that spermatogonia are on going mitosis, meiosis and developing to spermatids.

* Key words: Stem cell; In vitro culture of spermatogenesis cell; Morphology of spermatogenesis cells.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nuôi cấy các tế bào dòng tinh (In vitro culture of spermatogenesis cell): là phương pháp điều trị trong tương lai cho BN không có tinh trùng trong tinh dịch không do tắc. Hiện nay, trên thế giới một số tác giả đã tiến hành nuôi cấy và có được một số thành công bước đầu như M. Sousa [6].

Nghiên cứu này tiến hành phân lập, nuôi cấy TBG sinh tinh. Kết quả bước đầu cho thấy TBG sinh tinh phát triển trong môi trường nuôi cấy, phân chia giảm nhiễm tạo thành các tinh tử tròn, tinh tử đang kéo dài và tinh tử đã kéo dài, Tuy nhiên, số lượng,

chất lượng tế bào này như thế nào là vấn đề còn tiếp tục được nghiên cứu.

Để giải quyết vấn đề trên, chúng tôi tiến hành kiểm tra đánh giá số lượng và hình thái tế bào được sinh sản và phát triển trong môi trường nuôi cấy từ TBG sinh tinh.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

* Đối tượng 1 (nghiên cứu thực nghiệm): 50 mẫu ống sinh tinh của 50 chuột nhắt chưa trưởng thành, 7 - 8 ngày tuổi.

* Đối tượng 2: 50 mẫu ống sinh tinh của 50 BN không có tinh trùng trong tinh dịch.

* Học viện Quân y

Phán biện khoa học: PGS. TS. Hoàng Văn Lương

2. Phương pháp nghiên cứu.

* Phương pháp đánh giá hình thái dưới kính hiển vi quang học (Tesarik) [8, 7]:

Sau khi phân lập, nuôi cấy TBG sinh tinh trong môi trường tích hợp, tế bào sinh sản và phát triển. Quan sát dưới kính hiển vi soi nổi hình thái tế bào.

Đánh giá số lượng các tế bào dòng tinh trong điều kiện nuôi cấy:

+ Xác định tế bào dòng tinh theo Sousa (2002): dựa trên kích thước tế bào, đặc điểm về nhân và bào tương.

- Tinh tử tròn (round spermatid): kích thước 8 - 10 μm , nhân tròn, đậm, nằm ở giữa hoặc lệch về phía màng, đã xuất hiện acrosome nằm sát nhân.

- Tinh tử đang kéo dài (enlongating spermatid): đuôi bắt đầu hình thành, đường kính từ 4 - 6 μm , có hình oval, nhân đã lồi ra vùng ngoại vi.

- Tinh tử đã kéo dài (enlongated spermatid): đuôi đã hình thành, bào tương giảm thể tích và chuyển về sau, nhân có hình dạng trường thành.

+ Xác định số lượng tế bào: tại mỗi thời điểm nuôi cấy, mỗi giếng nuôi cấy đếm 20 vi trường, mỗi vi trường đếm từng loại tế bào, sau đó tính số trung bình mỗi loại mỗi tế bào và cho cả nhóm nghiên cứu, cả trên thực nghiệm và trên lâm sàng (n = 50 cho mỗi nhóm).

- Quan sát hình thái, kích thước của tế bào, hình thái cấu trúc của nhân, cực đầu dưới kính hiển vi quang học (theo Sousa M, 2002).

- Quan sát cấu trúc đầu, cổ, đuôi dưới kính hiển vi điện tử (theo Francavilla S, 2001) [3].

- Theo dõi sự biến đổi số lượng các loại tế bào sau nuôi cấy

2. Biến đổi số lượng các tế bào dòng tinh người trong môi trường nuôi cấy.

Phương pháp đánh giá hình thái dưới kính hiển vi điện tử (theo Pallade, 1952 và Nguyễn Kim Giao, 2004) [2].

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Biến đổi số lượng tế bào dòng tinh chuột trong môi trường nuôi cấy.

Bảng 1:

LOẠI TẾ BÀO	NGÀY 1	NGÀY 5	NGÀY 10	NGÀY 15	NGÀY 20
Tinh nguyên bào	34,1 \pm 2	45,2 \pm 3	65,1 \pm 4	80,2 \pm 4	82,4 \pm 5
Tinh bào 1	30,3 \pm 2	45,3 \pm 2	57,2 \pm 3	65,3 \pm 3	66,7 \pm 4
Tinh bào 2	10,8 \pm 3	18,3 \pm 1	26,4 \pm 2	30,4 \pm 3	20,4 \pm 2
Tinh tử tròn	2,5 \pm 2	7,4 \pm 2	10,1 \pm 2	11,3 \pm 3	12,2 \pm 3
Tinh tử đang kéo dài	0	0	4,2 \pm 2	4,8 \pm 2	5,1 \pm 2
Tinh tử đã kéo dài	0	0	3,2 \pm 2	3,9 \pm 2	4,2 \pm 2
Tinh trùng	0	0	1,3 \pm 2	2,1 \pm 2	2,5 \pm 1

Chuột 7 - 8 ngày tuổi trong ống sinh tinh chủ yếu có tinh nguyên bào, tinh bào I và một ít tinh bào II, sau thời gian nuôi cấy, các tinh nguyên bào trải qua một loạt quá trình gián phân. Kết quả, chúng tạo thành các tế bào giống như tế bào ban đầu, đây là nguồn duy trì tiếp tục của tinh nguyên bào. Một số tinh nguyên bào phân chia giảm phân tạo thành tinh bào II và tinh tử. Trong quá trình phân chia và hình thành tinh tử, một số tế bào bị thoái hóa, điều này lý giải tại sao số lượng tinh bào II và tinh tử không nhiều như mong muốn.

Bảng 2:

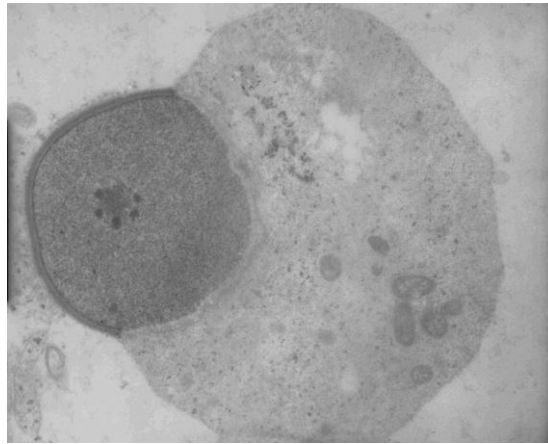
LOẠI TẾ BÀO	NGÀY 1	NGÀY 5	NGÀY 10	NGÀY 15	NGÀY 20
Tinh nguyên bào	28,3 ± 2	35,4 ± 2	40,5 ± 3	48,7 ± 4	52,2 ± 3
Tinh bào 1	20,3 ± 2	30,2 ± 2	35,3 ± 3	40,2 ± 3	42,6 ± 3
Tinh bào 2	5,2 ± 2	7,7 ± 2	9,5 ± 3	14,8 ± 2	18,7 ± 3
Tinh tử tròn	1,3 ± 1	2,4 ± 1	3,7 ± 2	5,1 ± 2	7,7 ± 2
Tinh tử đang kéo dài	0	0	2,3 ± 1	3,7 ± 2	4,5 ± 2
Tinh tử đã kéo dài	0	0	1,5 ± 1	2,4 ± 2	3,2 ± 2
Tinh trùng	0	0	0	1,2 ± 1	2,1 ± 2

Trong ống sinh tinh của BN không có tinh trùng trong tinh dịch không do tắc chủ yếu có tinh nguyên bào và tinh bào I, một ít tinh bào II. Sau thời gian nuôi cấy, các tế bào dòng tinh phân chia để duy trì và phát triển. Kết quả, chúng tăng về số lượng theo thời gian và xuất hiện các tinh tử.

Quan sát dưới kính hiển vi quang học thấy số lượng tế bào phát triển, đặc biệt xuất hiện các tinh tử với hình dạng đặc trưng, đường kính khoảng 7 - 8 μm , có nhân tụ đặc, lồi về một phía, túi cực đầu xuất hiện.



Hình 1: Hình ảnh nuôi cấy 5 ngày, mũi tên chỉ tinh tử tròn đã xuất hiện cực đầu.



Hình 2: Hình ảnh tinh tử dưới kính hiển vi điện tử x 5000 (mũi tên chỉ cực đầu của tinh tử tròn).

Trong quá trình nghiên cứu, các mẫu nuôi cấy đều được cố định một phần, nghiên cứu dưới kính hiển vi điện tử. Phóng đại hình ảnh 3 - 10.000 lần cho phép quan sát, đánh giá sự phân chia phát triển của TBG sinh tinh. Một tinh tử tròn điển hình phát triển trong môi trường nuôi cấy, có nhân tụ đặc ở phần đầu, túi cực đầu xuất hiện.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu hình thái TBG sinh tinh trong quá trình nuôi cấy, chúng tôi có một số kết luận như sau:

- Trong quá trình nuôi cấy, các TBG sinh tinh phân chia, tăng về số lượng.
- Các tinh bào I, tinh bào II và tinh tử tròn, tinh tử đang kéo dài và tinh tử đã kéo dài được hình thành. Các tinh tử có hình dạng đặc trưng, đường kính khoảng 7 - 8 μm , có nhân tụ đặc, lõi về một phía, túi cực đầu xuất hiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Quán Anh và CS. Vô sinh nam giới. Bệnh học giới tính nam. Nhà xuất bản Y học. 2009, tr.253-324
2. John C.M.Dumoulin et al. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. Human Reproduction. 2000, Vol 15, N^o2, pp.402-409
3. Junquera L.C, Carneiro J. The male reproduction system. Basic Histology. McGraw-hill. pp.418-434.
4. Rossalia Sa, Mario Sousa. Cytological and expression studies and quantitative analysis of the temporal and stage - specific effect of ellicle - stimulating hormone during co-culture of the normal human seminiferous epithelium. 2008.
5. Sofikitis. Effort to create an artificial testis: Culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. 2005.
6. Tesarik et al. Assisted reproduction with in-vitro-culture testicular spermatozoa in cases of severe germ cell apoptosis: a pilot study. Human Reproduction. 2001, Vol 16, N^o12, pp.2640-2645.