

# **XÂY DỰNG MỘT SỐ CHỈ TIÊU ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG TẾ BÀO GỐC SINH TINH VÀ TINH TRÙNG SAU NUÔI CẤY**

Nguyễn Đình Tào\*; Trịnh Thế Sơn\*

## **TÓM TẮT**

Trên cơ sở nuôi cấy các tế bào dòng tinh đã tạo ra thể hệ tinh trùng từ tế bào gốc (TBG) sinh tinh trong môi trường nuôi cấy, mở ra một tương lai đầy hứa hẹn cho BN không có tinh trùng trong tinh dịch không do tắc. Trong quá trình nuôi cấy các tế bào phân chia và phát triển tạo thành tinh tử. Bài báo này chúng tôi đề cập tới chất lượng tế bào gốc sinh tinh (TBGST) và tinh trùng sau nuôi cấy, khả năng thụ tinh và đánh giá một sự kiện quan trọng đó là phân chia giảm nhiễm, từ tế bào mang 46 nhiễm sắc thể (NST) thành tế bào mang 23 NST.

\* Từ khóa: Tế bào gốc sinh tinh; Tinh trùng; Chất lượng tế bào gốc.

## **ESTABLISH CRITERIA TO EVALUATION OF SPERMATOGENESIS CELL QUALIFICATION AND SPERMATIC AFTER INVITRO CULTURE**

### **SUMMARY**

*Based on in vitro culture of spermatogenesis cell, new cell generation developed in culture medium. This have open new area for men who sustained in non-obstructive. In this paper, we focus on the quality and ability of fertilization of sperm from culture. Especially, the cell going on meiosis, the cell bearing 46 chromosome divided into 23 chromosome.*

\* *Key words: Spermatogenesis cell; Spermatic: Quality of sperm cell*

### **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Trên cơ sở nuôi cấy tế bào, các nhà khoa học trên thế giới đã thành công tạo ra những thể hệ tế bào mới. Đặc biệt trong nuôi cấy tế bào dòng tinh đối với BN không có tinh trùng trong tinh dịch không do tắc. Trong môi trường nuôi cấy các tế bào phân chia phát triển tạo thành tinh tử, tinh trùng.

Từ năm 2006, nhiều tác giả đã tiến hành tiêm tinh tử và tinh trùng sau nuôi cấy vào bào tương noãn, kết quả bước đầu mở ra triển vọng cho những cặp vô sinh, đặc biệt đối với những BN Azoospermia không do tắc có chẩn đoán dòng tinh phát triển nửa chừng (maturation arrest). [14].

+ Dong Ryul Lee và Kye Seong Kim (2006) đã phân lập tế bào dòng tinh của BN không do tắc, phát triển tinh trùng nửa chừng. Các tinh bào I được nuôi cấy đã phân chia giảm nhiễm thành tinh bào II và tinh tử. Tinh tử được tiêm vào noãn và được theo dõi trong những ngày tiếp theo. Kết quả cho thấy sau 1 ngày ICSI, 23,1% noãn được phát triển thành 2 tiểu nhân [5].

+ N. Sofikitis (2005) đã nuôi cấy TBG sinh tinh, công bố thành công với kỹ thuật ISCI 75% tạo phôi với spermatid nuôi cấy và 24% có thai trên động vật thực nghiệm.

*Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập, nuôi cấy TBG sinh tinh. Kết quả bước đầu cho thấy TBGST phát triển trong môi trường nuôi cấy, tăng về số lượng, tạo thành các tinh tử tròn, tinh tử đang kéo dài và tinh tử đã kéo dài, Tuy nhiên, 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 đánh chất lượng các tế bào được sinh sản và phát triển trong môi trường nuôi cấy từ TBGST và tinh trùng sau nuôi cấy với mục tiêu:

- Đánh giá khả năng phân chia và phát triển các TBGST trong môi trường nuôi cấy.
- Đánh giá khả năng tạo phôi trong ống nghiệm của các tinh tử sau nuôi cấy.

## **ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **1. Đối tượng nghiên cứu.**

- *Đối tượng 1:*

- + 50 mẫu ống sinh tinh của 50 con chuột nhất chưa trưởng thành 7 - 8 ngày tuổi.
  - + 100 noãn của 10 chuột nhất cái trưởng thành, 7 - 10 tuần tuổi.
- Tiêu chuẩn lựa chọn: Noãn chuột được lấy vào thời điểm 14 giờ sau tiêm hCG.

- *Đối tượng 2:*

- + 50 mẫu ống sinh tinh của 50 BN không có tinh trùng.
- + 125 noãn của 20 BN tiến hành kích thích buồng trứng làm TTON tại Trung tâm Công nghệ Phôi, Học viện Quân y.

### **2. Hóa chất và thiết bị sử dụng trong nghiên cứu.**

\* *Thiết bị:*

- Tủ ấm 37<sup>0</sup>C, 6% CO<sub>2</sub> (Forma, Mỹ).
- Kính hiển vi soi ngược có gắn hệ thống kính tương phản Hoffman, máy ảnh Canon và bộ vi thao tác Narishige (Olympus IX 70, Nhật).
- Kính hiển vi soi nổi (Olympus 30, Nhật).
- Hood vô trùng (Sanyo, Nhật).
- Dụng cụ tiêu hao: hộp cấy nunc, pipette 1ml, 5 ml, 10 ml, đĩa petri đường kính 30mm, 60mm, 100mm, pipette pasteur, kim thực hiện kỹ thuật ICSI.

\* *Hóa chất:*

- Môi trường nuôi cấy: collagenase tít I (SIGMA Chemical Co); DNase I(Gibco); soybean trypsin inhibitor (Gibco), hyaluronidase (Sigma) trong môi trường PBS; huyết thanh fetal bovine serum (Gibco); axit amin không cần thiết (Gibco)
- Thuốc nội tiết: gonad-F 75 IU (Serono, Thụy Sĩ), pregnyl 1000 IU (Organon, Hà Lan).
- Môi trường nuôi phôi chuột: M16, Bovine Serum Albumin (Sigma, Mỹ).
- Môi trường nuôi cấy phôi: G-IVF, G1 plus, G2 plus (Vitrolife, Thụy Điển).

### **3. Phương pháp nghiên cứu.**

\* *Phương pháp ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) (theo Palermo (1992) [6]).*

Kỹ thuật ICSI được thực hiện trên đĩa nhiệt của kính hiển vi đảo ngược Olympus IX 70, độ phóng đại 200 lần có gắn bộ vi thao tác. Noãn sau khi rã đông và ủ 2 giờ trong tủ ấm, cho vào các giọt môi trường G-IVF plus (Vitrolife). Tinh trùng được hút vào kim tiêm, và tiêm tinh trùng vào trong bào tương của noãn tại điểm 3 giờ. Noãn sau khi thực hiện ICSI, rửa 2 lần trong môi trường G-IVF plus sau đó tiếp tục nuôi cấy trong tủ ấm 6% CO<sub>2</sub>, 37<sup>0</sup>C.

\* Nuôi cấy và theo dõi phôi:

Sau 16 - 18 giờ, thực hiện kỹ thuật ICSI, đánh giá noãn thụ tinh, noãn thụ tinh bình thường chuyển sang hộp nuôi mới chứa môi trường G1 plus. Phôi nuôi cấy trong tủ ẩm 6% CO<sub>2</sub>, 37°C đến ngày thứ 3. [7,10].

\* Kỹ thuật nhuộm FISH:

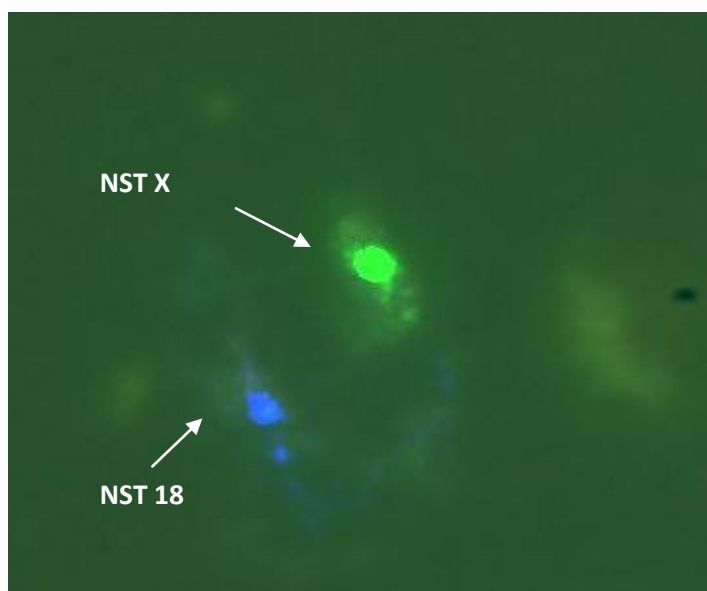
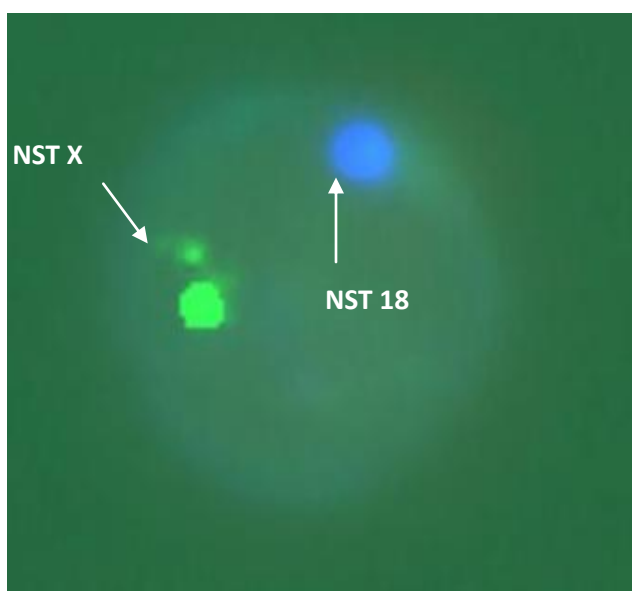
**FISH (Fluorescence in situ hybridisation)** là kỹ thuật cho phép nhìn thấy đoạn gen trong tế bào, sự lai ghép mỗi với ADN tế bào có thể phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang.

## **KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN**

### **1. Tế bào dòng tinh nhuộm FISH.**

Qua phân tích nhuộm FISH cho thấy, trong 5 ngày đầu quá trình nuôi cấy, chỉ có các tinh nguyên bào và tinh bào 1, các tế bào này có 46 nhiễm sắc thể (NST) thân và 2 NST giới tính. Trên kính hiển vi huỳnh quang, mỗi tế bào có thể phân biệt được NST 18 bắt màu xanh lam và 2 NST giới tính (màu xanh thẫm) và Y (màu hồng vàng). *Hình 1A.*

Sau 15 ngày, trong quá trình nuôi cấy, các TBG đã phân chia giảm nhiễm, kết quả tạo ra tế bào đơn bội NST. Trên kính hiển vi huỳnh quang, mỗi tế bào có thể phân biệt được 1 NST 18 bắt màu xanh lam và 1 NST giới tính X (màu xanh thẫm) hoặc Y (màu hồng vàng).



*Hình 1A:* Tế bào nuôi cấy ngày 5.

### **2. Đánh giá khả năng thụ tinh của tế bào sau nuôi cấy bằng kỹ thuật ICSI trên thực nghiệm (n = 100 noãn).**

\* Khả năng thụ tinh của tinh tử chuột sau nuôi cấy:

Khả năng thụ tinh của tinh tử sau nuôi cấy là 66/100, đạt tỷ lệ 68%. Theo John Dumoulin (2001) [4] và Hồ Mạnh Tường (2004) [2], tỷ lệ thụ tinh bằng kỹ thuật ICSI với tinh trùng là 67% và 60,8%. Kết quả này cho thấy kỹ thuật ICSI ngày nay không những phổ biến trên thế giới mà con người, mức độ áp dụng và hoạt động giữa các trung tâm trên thế giới ngày càng hiệu quả và đáng tin cậy. Đây cũng là một tỷ lệ thụ tinh khá cao, điều này chứng tỏ nuôi cấy làm cho khả năng biệt hóa của tinh tử diễn ra nhanh hơn, tinh tử trưởng thành hơn và do đó có khả năng thụ tinh cao hơn. Qua đây cũng cho thấy chỉ định và xu hướng nuôi cấy các tế bào dòng tinh là hợp lý và cần thiết.

\* Sự phát triển của phôi chuột ngày 2 sau khi thụ tinh:

Bảng 1:

	Số phôi	Tỷ lệ %	Cộng: phôi độ 4, độ 3
Phôi độ 4	18	27,27%	40 (60,6%)
Phôi độ 3	22	33,33%	
Phôi độ 2	16	24,24	
Phôi độ 1	10	15,15%	
Tổng	66	100 %	

Kết quả phát triển phôi ngày 2 với 66,6% hình thái phôi bình thường là. Theo John Dumoulin (2001) [7] và Nguyễn Thanh Tùng (2011) [3], tỷ lệ hình thái phôi bình thường ngày 2 với chỉ định phương pháp ICSI thông thường là 53,7% và 69,2% nhưng chưa thấy có sự khác biệt, cho thấy khả năng biệt hóa của tế bào dòng tinh sau nuôi cấy phần nào ổn định về mặt di truyền.

3. Đánh giá khả năng thụ tinh của tế bào sau nuôi cấy bằng kỹ thuật ICSI trên lâm sàng (n = 125 noãn).

\* Khả năng thụ tinh của tinh tử sau nuôi cấy.:

Đối với những BN không có tinh trùng không do tắc, trên tiêu bản mô học được chẩn đoán là trong ống sinh tinh không có tinh tử, chúng tôi đã nuôi cấy. Mặc dù trong quá trình nuôi cấy phát hiện sự phân chia, phát triển của các TBG sinh tinh thành tinh tử tròn, tinh tử kéo dài, song chất lượng những tinh tử này như thế nào là vấn đề cần tiếp tục nghiên cứu. Vì vậy, nghiên cứu này chỉ đánh giá khả năng thụ tinh của các tinh tử đã kéo dài được nuôi cấy đối với BN được chẩn đoán là không có tinh trùng nhưng có tinh tử tròn trong lòng ống sinh tinh.

\* Khả năng thụ tinh của tinh tử sau nuôi cấy: Số noãn thu được: 125; số phôi được tạo thành: 80 (64%).

Khả năng thụ tinh của tinh tử sau nuôi cấy là 80/125, đạt tỷ lệ 64%. Theo John Dumoulin, (2001) [4] và Hồ Mạnh Tường (2004) [1], tỷ lệ thụ tinh bằng kỹ thuật ICSI với tinh trùng không phải nuôi cấy (có sẵn) là 67% và 60,8%. Kết quả này cho thấy kỹ thuật ICSI ngày nay không những phổ biến trên thế giới mà càng hiệu quả và đáng tin cậy. Đây cũng là một tỷ lệ thụ tinh khá cao, điều này chứng tỏ nuôi cấy làm cho khả năng biệt hóa của tinh tử diễn ra nhanh hơn, tinh tử trưởng thành hơn và do đó có khả năng thụ tinh cao hơn. Qua đây cũng cho thấy chỉ định và xu hướng nuôi cấy các tế bào dòng tinh là hợp lý và cần thiết.

#### 4. Sự phát triển của phôi ngày 2 sau khi thụ tinh.

Bảng 2: Sự phát triển phôi ngày 2 với tinh tử sau nuôi cấy.

	Số phôi (tỷ lệ)	Cộng: phôi độ 4, độ 3
Phôi độ 4	16 (30,18%)	35 (66,02%)
Phôi độ 3	19 (35,84)	
Phôi độ 2	14 (26,41)	
Phôi độ 1	4 (7,54%)	

Kết quả phát triển phôi ngày 2 với tỷ lệ 66,02% hình thái phôi bình thường. Theo John Dumoulin (2001) [4] và Nguyễn Thanh Tùng (2011) [3], tỷ lệ hình thái phôi bình thường ngày 2 với chỉ định phương pháp ICSI thông thường là 53,7% và 69,2%, nhưng chưa thấy có sự khác biệt, cho thấy khả năng biệt hóa của các tế bào dòng tinh sau nuôi cấy phần nào ổn định về mặt di truyền [1].

## KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu, đánh giá chất lượng TBGST và tinh trùng sau nuôi cấy, chúng tôi có một số kết luận sau:

- Trong quá trình nuôi cấy, các TBGST phân chia giảm nhiễm tạo thành tinh bào I, tinh bào II và tinh tử tròn, tinh tử đang kéo dài và tinh tử đã kéo dài.
- Khả năng thụ tinh và chất lượng phôi được tạo thành với tinh trùng sau nuôi cấy.
- + Trên thực nghiệm, 68% tinh tử có khả năng thụ tinh tạo phôi, trong đó số phôi độ 4 và độ 3 và ngày 2 đạt 60,6%.
- Trên người, các tinh tử có khả năng thụ tinh tạo phôi với tỷ lệ 64%, trong đó số phôi độ 4 và độ 3 và ngày 2 đạt 66,02%.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hồ Mạnh Tường và CS. Thụ tinh trong ống nghiệm: tiêm tinh trùng vào bào tương trứng. Bệnh viện Từ Dũ, Thành phố Hồ Chí Minh. 2004.
2. Nguyễn Kim Giao. Hiện vi điện tử truyền qua. Nhà xuất bản Y học. 2004.
3. Nguyễn Thanh Tùng. Nghiên cứu hình thái cấu trúc hợp tử giai đoạn tiền nhân và phôi hai ngày tuổi trên BN thụ tinh trong ống nghiệm. Luận án Tiến sỹ Y học. 2011.
4. Trần Quán Anh và CS. Vô sinh nam giới, Bệnh học giới tính nam, Nhà Xuất bản Y học. tr.253-324.
5. Dong Ryul Lee. Isolation of male germ stem cell-like cell from testicular tissue of non-obstructive azoospermic patients and differentiation into haploid male germ cells in vitro. 2006.
6. Francavilla S., Bianco M.A., Cordeschi G. Ultrastructural analysis of chromatin defects in testicular spermatids in azoospermic men submitted to TESE-ICSI. Human Reproduction. 16 (7), pp.1440-1448.
7. 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. Vol15, N<sup>o</sup>2, pp.402-409
8. Junquera L.C., Carneiro J. The male reproduction system. Basic Histology, McGraw-hill. pp.418-434.
9. Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. Fertility and Sterility. 85, pp.108-111.
10. Lynette Scott et al. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. Human Reproduction. Vol 15, N<sup>o</sup>11, pp.2394-2403.

