



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN  
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



**2-0003331**

(51) **C12Q 1/68; C12N 5/076**  
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00226

(22) 02/06/2021

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/08/2021 401

(76) 1. Trịnh Thế Sơn (VN)

Số 28, Liên kè 3, Khu đô thị Xa la, Phúc La, Hà Đông, Hà Nội

2. Nguyễn Đình Tảo (VN)

J806, Tòa Jasmine, 430 Cầu Am, Vạn Phúc, Hà Đông, Hà Nội

3. Nguyễn Thanh Tùng (VN)

Số 29, Liên kè 1, Khu đô thị An Hưng, Hà Đông, Hà Nội

4. Quãn Hoàng Lâm (VN)

Số 14/BT2, Khu đô thị Xa La, Phúc La, Hà Đông, Hà Nội

5. Đặng Tiến Trường (VN)

Phòng 702, V3, Victoria Văn Phú, Phú La, Hà Đông, Hà Nội

6. Vũ Thị Thu Trang (VN)

Số 8, Tạ Quang Bửu, An Tảo, thành phố Hưng Yên, tỉnh Hưng Yên

7. Phạm Đức Minh (VN)

24b5, Ngõ 8, Ngô Quyền, Quang Trung, Hà Đông, Hà Nội

(54) **QUY TRÌNH PHÂN LẬP TINH TRÙNG TỪ MÔ TINH HOÀN**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập tinh trùng từ mô tinh hoàn, trong đó quy trình này cho phép thu nhận được tinh trùng từ mẫu mô tinh hoàn chứa ống sinh tinh thu được bằng phương pháp vi phẫu thuật (micro TESE) ở bệnh nhân vô tinh không do tắc với lượng rất nhỏ, chỉ từ 5 đến 10 mg. Giải pháp hữu ích sử dụng enzym phân cắt đặc hiệu collagen và ADN với môi trường nuôi cấy bảo vệ đặc hiệu tinh trùng cho phép loại bỏ hiệu quả mô liên kết và ADN tạp nhiễm, giảm được tổn thương lên tế bào tinh trùng để thu được tinh trùng khỏe mạnh, đảm bảo chất lượng để sử dụng trong các phương pháp hỗ trợ sinh sản.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực y sinh học, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập tinh trùng từ mô tinh hoàn ở bệnh nhân vô tinh không do tắc nhằm hỗ trợ cho các phương pháp hỗ trợ sinh sản như kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm. Quy trình phân lập tinh trùng từ mô tinh hoàn theo giải pháp cho phép thu được tinh trùng khỏe mạnh từ mẫu mô tinh hoàn thu được bằng phương pháp vi phẫu không làm ảnh hưởng đến chức năng của tinh hoàn.

### **Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Theo các nghiên cứu gần đây cho thấy, trong số các nguyên nhân gây vô sinh, nguyên nhân do nữ thường chiếm khoảng từ 30 đến 40% và vô sinh nam chiếm khoảng 30% các trường hợp. Còn lại khoảng 20% các trường hợp do cả hai vợ chồng và có khoảng từ 10 đến 15% không tìm ra nguyên nhân gây vô sinh. Trong các nguyên nhân vô sinh nam, vô tinh (azoospermia) là nguyên nhân khó điều trị nhất. Bệnh nhân vô tinh được chia làm 2 nhóm là vô tinh do tắc và vô tinh không do tắc. Vô tinh do tắc chiếm khoảng 40% và vô tinh không do tắc chiếm khoảng 60%. Với những tiến bộ trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản, các bệnh nhân vô tinh do tắc có khả năng thu tinh trùng đạt gần 100% và thể có con của chính mình. Trong khi đó, phần lớn các bệnh nhân vô tinh không do tắc không thể thu được tinh trùng bằng các phương pháp thu tinh trùng thông thường như ở các bệnh nhân vô tinh do tắc như phương pháp PESA, MESA, TESA hoặc thậm chí là TESE.

Schlege NP đã tiến hành phương pháp micro TESE đầu tiên với kính hiển vi có độ phóng đại từ 6 đến 8 lần vào năm 1999 với mục đích tránh các mạch máu khi mở rộng màng trắng tinh hoàn, đây là phương pháp tiến hành TESE ở nhiều vị trí có sử dụng kính vi phẫu. Sau đó độ phóng đại được áp dụng tăng lên từ 15-20 lần nhằm nhìn rõ các ống sinh tinh. Phương pháp micro TESE đã mang lại khả năng thu tinh trùng từ tinh hoàn cao. Do dưới kính hiển vi phẫu thuật, các bác sỹ có thể lựa chọn được các ống sinh tinh có khả năng có chứa tinh trùng, từ đó có thể cắt những đoạn ống sinh tinh với lượng mẫu nhỏ, gây tổn thương ít nhất đến tinh hoàn của bệnh nhân. Do đó, phương pháp vi phẫu TESE không những giúp làm giảm thiểu tác động, giảm thiểu sự tổn thương đến tinh hoàn mà còn giảm thiểu sự ảnh hưởng đến chức năng tinh hoàn do có khả năng

giảm tối đa thể tích mô tinh hoàn bị lấy đi đồng thời làm giảm các nguy cơ chảy máu trong và sau phẫu thuật. Các nghiên cứu chỉ ra rằng, với mỗi lần phẫu thuật, nếu lấy khoảng từ 5 đến 10 mg mô tinh hoàn thì không ảnh hưởng đến chức năng sinh lý bình thường của tinh hoàn. Do đó, việc sử dụng kỹ thuật vi phẫu TESE để thu mẫu tinh hoàn chứa ống sinh tinh đang được coi là phương pháp xâm lấn an toàn cho người bệnh trong nghiên cứu các phương pháp hỗ trợ sinh sản.

Mặc dù hiện nay các kỹ thuật vi phẫu TESE đã và đang được nghiên cứu, ứng dụng rộng rãi, nhưng các kỹ thuật xử lý mẫu mô tinh hoàn, phân lập tinh trùng lại khác nhau. Các phương pháp xử lý mẫu và phân lập tinh trùng này thường không hiệu quả và thu được một lượng tinh trùng ít. Trong phương pháp hỗ trợ sinh sản trong ống nghiệm, ví dụ thụ tinh trong ống nghiệm, vẫn cần có một lượng tinh trùng khỏe mạnh với lượng đủ để có thể kết hợp với trứng tạo ra phôi. Trong các kỹ thuật xử lý mẫu và phân lập tinh trùng đã biết, mô tinh hoàn sẽ được cắt khỏi tinh hoàn bằng dao, kéo, sau đó dùng các biện pháp can thiệp cơ học nhằm thu tinh trùng từ mô tinh hoàn. Phương pháp này có kết quả thu tinh trùng không cao và do đó cần một lượng mẫu lớn, hạn chế ưu điểm của phương pháp vi phẫu TESE. Hơn nữa, các can thiệp cơ học tác động trực tiếp lên tế bào tinh trùng làm thay đổi cấu trúc, chức năng và sự sống của tinh trùng hoặc gây ra các khuyết tật.

Do đó, vẫn cần có quy trình phân lập tinh trùng hiệu quả từ ống sinh tinh cho phép áp dụng được với một lượng nhỏ mẫu mô tinh hoàn, dưới 10mg để vừa có thể tận dụng được những ưu điểm của phương pháp vi phẫu TESE vừa không ảnh hưởng đến chức năng tinh hoàn của người hiến. Ngoài ra, vẫn cần có kỹ thuật nhằm giảm các tác động trực tiếp lên tế bào tinh trùng, giúp thu được lượng tinh trùng khỏe mạnh để có thể ứng dụng trong các phương pháp hỗ trợ sinh sản, như thụ tinh trong ống nghiệm, mở ra cơ hội làm cha mẹ cho các bệnh nhân có chồng vô tinh không do tắc theo hướng hiệu quả, an toàn.

### **Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, theo đó giải pháp hữu ích đề xuất quy trình phân lập tinh trùng từ mô tinh hoàn sử dụng enzym để phân giải mô liên kết, nhưng không ảnh hưởng đến đặc tính, chức năng của tinh trùng để ứng dụng

trong thụ tinh nhân tạo. Quy trình phân lập tinh trùng từ mô tinh hoàn theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

a) xử lý mẫu bằng cách thu thập từ 5 đến 10 mg mẫu mô tinh hoàn chứa ống sinh tinh chuyển vào môi trường đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin đã được giữ ở 37°C rồi ly tâm khoảng 5 phút với lực 300g, phần mô lắng được trộn đều với khoảng từ 2 đến 5ml dung dịch đệm ly giải hồng cầu (ELB) chứa 155mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM  $\text{KHCO}_3$  và 2mM EDTA, pH=7,2 trong khoảng từ 5 đến 10 phút, sau đó rửa dịch huyền phù lần mẫu mô với lượng từ 5 đến 10 ml môi trường đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin thu được mẫu mô tinh hoàn sạch;

b) phân giải mô liên kết bằng cách cấy khoảng từ 1 đến 3 mg mẫu mô tinh hoàn sạch vào 0,5 ml dung dịch nuôi cấy bao gồm đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin được bổ sung enzym collagenaza typ IA với nồng độ 0,95 mg/ml, 25 $\mu\text{g}$  DNaza và 1,6 mM  $\text{CaCl}_2$ , ủ ở 37°C trong môi trường 5%  $\text{CO}_2$  trong khoảng từ 2 đến 3 giờ, mỗi 30 phút lắc nhẹ trong 5 phút để hòa tan mô liên kết, thu được dịch nuôi cấy màu trắng đục; và

c) thu tinh trùng bằng cách trộn đều dịch nuôi cấy và ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút, sau khi loại bỏ phần dịch, thu phần cặn, bổ sung từ từ 200 đến 300  $\mu\text{l}$  dung dịch nuôi cấy bao gồm đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin bổ sung enzym collagenaza typ IA với nồng độ 0,95 mg/ml, 25 $\mu\text{g}$  Dnaza và 1,6 mM  $\text{CaCl}_2$  vào phần cặn và rửa nhẹ, sau khi loại bỏ phần dịch, thu được mẫu tinh trùng sạch, mẫu tinh trùng này được ủ trong tủ chứa 5%  $\text{CO}_2$  ở nhiệt độ 37°C trong 45 phút để thu được tinh trùng hoạt động.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Hình 1: Ảnh chụp mẫu mô tinh hoàn sau khi tiến hành phân lập tinh trùng bằng phương pháp cơ học. Tinh trùng bị phá vỡ thành các mảnh nằm rải rác.

Hình 2: Ảnh chụp mẫu mô tinh hoàn sau khi tiến hành phân lập tinh trùng bằng phương pháp theo giải pháp hữu ích. Vị trí đánh dấu (hình elip) cho thấy tinh trùng thu được có hình thái hoàn chỉnh bao gồm cả đầu, thân và đuôi.

### Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án và các ví dụ này chỉ nhằm làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Theo giải pháp hữu ích, mẫu mô tinh hoàn được sử dụng để phân lập tinh trùng là mẫu mô tinh hoàn được thu từ bệnh nhân vô tình không do tác, tốt nhất bằng kỹ thuật vi phẫu micro TESE. Kỹ thuật này được thực hiện bằng cách gây tê, cố định thừng tinh, mổ theo đường giữa 2 bên bìu đã gây tê tại chỗ bằng lidocain dùng dao phẫu thuật mở bao trắng, bóc lộ mô tinh hoàn. Sau khi kiểm tra dưới kính hiển vi phóng đại từ 5 đến 20 lần, xác định vùng ống sinh tinh có kích thước lớn, màu trắng đục, cắt một lượng mẫu từ 5 đến 10 mg để phân lập tinh trùng từ mẫu này. Việc vi phẫu để thu mẫu với lượng nhỏ này không ảnh hưởng đến chức năng sinh lý bình thường của tinh hoàn. Kỹ thuật vi phẫu để thu mẫu tinh hoàn không nằm trong phạm vi của giải pháp hữu ích và có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ, miễn sao có thể thu được một lượng mẫu khoảng 10 mg chứa ống sinh tinh để làm mẫu phân lập tinh trùng theo giải pháp hữu ích.

Các môi trường, hóa chất được sử dụng là các môi trường, hóa chất chuẩn được sử dụng trong kỹ thuật sinh học phân tử và y sinh đảm bảo các chỉ tiêu, chất lượng và có thể mua được từ các công ty hóa sinh dưới dạng hóa chất riêng lẻ hoặc dưới dạng chế phẩm thương mại, ví dụ môi trường đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin có thể được mua từ công ty Orgio dưới dạng chế phẩm Sperm Preparation Medium thương mại.

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, theo đó giải pháp hữu ích đề xuất quy trình phân lập tinh trùng từ mô tinh hoàn để ứng dụng trong thụ tinh nhân tạo. Quy trình phân lập tinh trùng từ mô tinh hoàn theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước: a) xử lý mẫu; b) phân giải mô liên kết; và c) thu tinh trùng.

Trong bước xử lý mẫu, sau khi mẫu được thu bằng phương pháp vi phẫu với lượng từ 5 đến 10 mg, chuyển mẫu vào môi trường đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin đã được giữ ở 37°C. Lưu ý rằng, để không ảnh hưởng đến chức năng và gây tổn thương tinh hoàn, lượng mẫu thu được cần tối thiểu. Theo giải pháp hữu ích, với

lượng mẫu chỉ cần từ 5 đến 10 mg sẽ không ảnh hưởng đến chức năng sinh lý của tinh hoàn, do đó an toàn cho vật chủ cung cấp mẫu. Môi trường đệm bicarbonat HEPES, HSA và gentamicin được giữ ấm ở nhiệt độ 37°C trong khoảng 60 phút trước bị được bổ sung mẫu nhằm đảm tế bào sinh tinh trong mẫu không bị ảnh hưởng. Sau đó, tiến hành ly tâm khoảng 5 phút với lực 300g để loại bỏ tạp chất.

Phần mô lắng được loại bỏ tế bào hồng cầu dính bám bằng cách được trộn đều phần mô thu được với khoảng từ 2 đến 5ml dung dịch đệm ly giải hồng cầu (ELB) chứa 155mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM  $\text{KHCO}_3$  và 2mM EDTA, pH=7,2 trong khoảng từ 5 đến 10 phút. Đệm ly giải hồng cầu được bổ sung chứa 2mM EDTA (axit etylendiamineteaxetic) cho phép loại bỏ tế bào hồng cầu, nhưng không ảnh hưởng đến tế bào ống sinh tinh. Sau khi rửa, mẫu thu được bao gồm dịch huyền phù lẫn mẫu mô được chuyển vào khoảng từ 5 đến 10 ml môi trường đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin thu được mẫu mô tinh hoàn sạch đã được loại bỏ tế bào hồng cầu.

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, tế bào hồng cầu có trong mẫu mô ảnh hưởng đến chất lượng tinh trùng thu được. Việc xử lý, loại bỏ tế bào hồng cầu cho phép thu được tinh trùng khỏe mạnh, tránh được những tổn thương ảnh hưởng đến chất lượng.

Trong bước phân giải mô liên kết, giải pháp sử dụng enzym collagenaza typ IA và DNAza để phân giải mô liên kết thay vì sử dụng phương pháp cơ học. Tiến hành cấy khoảng từ 1 đến 3 mg mẫu mô tinh hoàn sạch vào 0,5 ml dung dịch nuôi cấy bao gồm đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin được bổ sung enzym collagenaza typ IA với nồng độ 0,95 mg/ml, 25 $\mu\text{g}$  DNAza và 1,6 mM  $\text{CaCl}_2$ . Việc sử dụng kết hợp enzym collagenaza typ IA với nồng độ 0,95 mg/ml, 25 $\mu\text{g}$  DNAza và 1,6 mM  $\text{CaCl}_2$  trong môi trường nuôi cấy cho phép loại bỏ được mô liên kết chứa collagen và ADN từ tế bào sinh dưỡng, đồng thời giúp bảo vệ được tế bào sinh tinh trong môi trường chứa enzym. Các tác giả đã nhận thấy rằng, bằng việc sử dụng enzym collagenaza typ IA với nồng độ 0,95 mg/ml cho phép loại bỏ hiệu quả mô liên kết mà không ảnh hưởng đến tế bào sinh tinh. Nếu sử dụng enym collagenaza với nồng độ lớn hơn, các tế bào sinh tinh sẽ bị ảnh hưởng, ngược lại, nếu sử dụng với nồng độ thấp hơn, khả năng phân giải mô liên kết kém, không tách hoàn toàn được các tế bào sinh tinh khiến hiệu quả thu tinh trùng giảm. Sau khi ủ môi trường ở 37°C trong môi trường 5%  $\text{CO}_2$  trong khoảng từ 2 đến 3 giờ, mỗi 30 phút lắc nhẹ trong 5 phút để hòa tan mô liên kết, thu được dịch nuôi

cây màu trắng đục chứa tinh trùng. Bằng nhiều thực nghiệm, các tác giả đã tối ưu được enzym, thời gian phân cắt mô liên kết để đảm bảo phân cắt hiệu quả mô liên kết, nhưng không ảnh hưởng đến khả năng phát triển và sinh tinh trùng của tế bào sinh tinh để có thể thu được tinh trùng khỏe mạnh.

Trong bước thu tinh trùng, tiến hành trộn đều dịch nuôi cấy và ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút để loại tạp chất thu tế bào sinh tinh và tinh trùng mới sinh. Sau khi loại bỏ phần dịch, phần cặn bao gồm các tế bào sinh tinh và tinh trùng được thu hồi. Tiếp đó, bổ sung từ từ 200 đến 300  $\mu$ l dung dịch nuôi cấy bao gồm đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin bổ sung enzym collagenaza typ IA với nồng độ 0,95 mg/ml, 25 $\mu$ g DNAza và 1,6 mM  $\text{CaCl}_2$ . Quá trình này nhằm loại bỏ tế bào sinh tinh để thu được tinh trùng. Bằng cách bổ sung 1,6mM  $\text{CaCl}_2$  vào trong môi trường, các tế bào tinh trùng được bảo vệ đặc hiệu mà không bị tác động bởi enzym. Sau khi rửa nhẹ và loại bỏ phần dịch, thu được mẫu tinh trùng sạch. Mẫu tinh trùng này được ủ trong tủ chứa 5%  $\text{CO}_2$  ở nhiệt độ 37°C trong 45 phút để hoạt hóa nhằm thu được tinh trùng hoạt động.

Để kiểm tra, các mẫu sẽ được tiến hành soi và tìm tinh trùng, các mẫu tinh trùng thu được này được đánh giá về chỉ số thể tích, mật độ, độ di động, tỷ lệ sống chết, tỷ lệ bất thường của các dạng trước khi quyết định tiến hành các phương pháp hỗ trợ sinh sản như thụ tinh trong ống nghiệm.

Tinh trùng thu được sẽ được sử dụng để tiêm vào bào tương noãn (phương pháp ICSI) hoặc được bảo quản bằng phương pháp thủy tinh hóa để bảo quản dùng cho chu kỳ sau. Trong trường hợp tinh trùng được sử dụng làm ICSI ngay, tinh trùng được ủ ủ trong tủ ẩm 5%  $\text{CO}_2$ , nhiệt độ 37°C trong 45 phút để hoạt hóa trước khi chuyển sang đĩa làm ICSI.

### **Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích**

#### ***Ví dụ 1. Phân lập tinh trùng từ mô tinh hoàn***

Mẫu mô tinh hoàn thu được bằng kỹ thuật vi phẫu micro TESE bằng cách gây tê, cố định thừng tinh và mổ theo đường giữa 2 bên bìu đã gây tê tại chỗ bằng lidocain dùng dao phẫu thuật mở bao trắng, bộc lộ mô tinh hoàn. Sau khi kiểm tra dưới kính hiển vi phóng đại từ 5 đến 20 lần, xác định vùng ống sinh tinh có kích thước lớn, màu trắng

đục, cắt một lượng mẫu khoảng 10 mg chứa ống sinh tinh để làm mẫu mô để phân lập tinh trùng.

Chuyển khoảng 5 mg mẫu mô tinh hoàn chứa ống sinh tinh sau khi được vi phẫu vào môi trường đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin đã được giữ ở 37°C và chuyển vào thiết bị ly tâm. Tiến hành ly tâm trong 5 phút với lực 300g. Phần dịch được loại bỏ và phần mô lắng được trộn đều với khoảng 5ml dung dịch đệm ly giải hồng cầu (ELB) chứa 155mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM  $\text{KHCO}_3$  và 2mM EDTA, pH=7,2 trong 5 phút. Tiếp đó bổ sung 10 ml môi trường đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin để rửa dịch huyền phù lần mẫu mô. Quá trình này cho phép loại bỏ hoàn toàn hồng cầu lẫn trong mẫu, thu được mẫu mô tinh hoàn sạch.

Lấy khoảng 2 mg mẫu mô tinh hoàn sau khi loại bỏ hồng cầu tạp nhiễm và cấy vào 0,5 ml dung dịch nuôi cấy bao gồm đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin được bổ sung enzym collagenaza type IA với nồng độ 0,95 mg/ml, 25 $\mu\text{g}$  DNAza và 1,6 mM  $\text{CaCl}_2$ . Tiến hành ủ ở 37°C trong môi trường 5%  $\text{CO}_2$  trong khoảng từ 2 đến 3 giờ. Mỗi 30 phút lắc nhẹ trong 5 phút để hòa tan mô liên kết, sau khi phân giải hết mô liên kết, thu được dịch nuôi cấy màu trắng đục.

Phần dịch nuôi cấy được trộn đều và ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút. Loại bỏ phần dịch nổi, phần cặn được bổ sung từ từ 300  $\mu\text{l}$  dung dịch nuôi cấy bao gồm môi trường đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin bổ sung enzym collagenaza type IA với nồng độ 0,95 mg/ml, 25 $\mu\text{g}$  DNAza và 1,6 mM  $\text{CaCl}_2$  và trộn nhẹ nhàng. Sau khi loại bỏ phần dịch, thu được mẫu tinh trùng sạch. Mẫu tinh trùng này được ủ trong tủ chứa 5%  $\text{CO}_2$  ở nhiệt độ 37°C trong 45 phút để thu được tinh trùng hoạt động và phục vụ cho bước tiếp theo trong điều trị vô sinh hiếm muộn.

***Ví dụ 2. Đánh giá chất lượng tinh trùng thu được bằng phương pháp phân lập tinh trùng từ mô tinh hoàn theo giải pháp hữu ích***

Để đánh giá khả năng thu nhận và chất lượng mẫu tinh trùng thu được, tiến hành soi kiểm tra, đánh giá mẫu tinh trùng thu được theo giải pháp hữu ích và mẫu tinh trùng thu được bằng phương pháp phá vỡ mô liên kết bằng phương pháp cơ học truyền thống.

Kết quả được thể hiện trên Hình 1 và Hình 2, trong đó Hình 1 là kết quả soi trên kính hiển vi mẫu thu được bằng kỹ thuật phá vỡ mô liên kết cơ học, trong đó cho thấy

các tế bào hồng cầu hình tròn dẹt và tế bào mô liên kết thành từng cụm. Không thể tìm thấy tinh trùng trong mẫu này do phương pháp cơ học đơn thuần không thể làm ly giải được tinh trùng ra khỏi các ống sinh tinh, hơn nữa những thủ thuật thô bạo cũng góp phần làm tổn thương tinh trùng khiến chúng trở nên bất hoạt và không có khả năng thụ tinh. Tế bào tinh trùng dễ bị tổn thương và phân thành các mảnh nằm rải rác.

Ngược lại, trong Hình 2, các tế bào mô liên kết được phân tách rời và thu được tế bào tinh trùng (dấu mũi tên) thể hiện đủ cả phần đầu, thân và đuôi. Điều này cho thấy tế bào tinh trùng được phân tách hiệu quả nhờ vào môi trường phân lập và cho phép thu được tế bào tinh trùng toàn vẹn gồm cả phần đầu, phần thân và phần đuôi (vị trí được đánh dấu bằng hình elip). Tinh trùng thu được này đủ chất lượng, đáp ứng được yêu cầu ứng dụng trong các phương pháp hỗ trợ sinh sản.

### **Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

Quy trình phân lập tinh trùng từ mô tinh hoàn theo giải pháp hữu ích cho phép phân lập được một lượng tinh trùng đủ lớn từ mô tinh hoàn với lượng nhỏ, chỉ khoảng từ 5 đến 10 mg mẫu. Quy trình này cho phép kết hợp với kỹ thuật vi phẫu TESE, cắt chọn lọc một lượng tối thiểu mẫu mô tinh hoàn chứa ống sinh tinh để thu lượng tinh trùng đủ để có thể ứng dụng trong các phương pháp hỗ trợ sinh sản, như phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm. Qua đó, tinh trùng thu được có thể dùng để tạo phôi cho quá trình điều trị vô sinh hiếm muộn, giúp các cặp vợ chồng có chồng bị vô tinh không do tắc có thể có con của chính mình.

Quy trình theo giải pháp hữu ích sử dụng enzym phân cắt đặc hiệu collagen trong các mô liên kết và ADN tạp nhiễm với môi trường nuôi cấy bảo vệ đặc hiệu tinh trùng cho phép loại bỏ hiệu quả mô liên kết và ADN tạp nhiễm, giảm được tổn thương lên tế bào tinh trùng, nâng cao chất lượng tinh trùng thu được. Quy trình cho phép giảm thiểu được các nguy cơ can thiệp phẫu thuật, giúp bảo vệ sức khỏe, cũng như đảm bảo được chức năng của tinh hoàn người hiến.

Quy trình phân lập tinh trùng từ mô tinh hoàn kết hợp sử dụng enzym phân cắt đặc hiệu collagen theo giải pháp cho hiệu quả thu tinh trùng đạt tới 37%, vượt trội so với các kỹ thuật thu tinh trùng khác, đồng thời đảm bảo được cấu trúc và chức năng của tinh trùng thu được giúp hỗ trợ hiệu quả cho các phương pháp hỗ trợ sinh sản.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

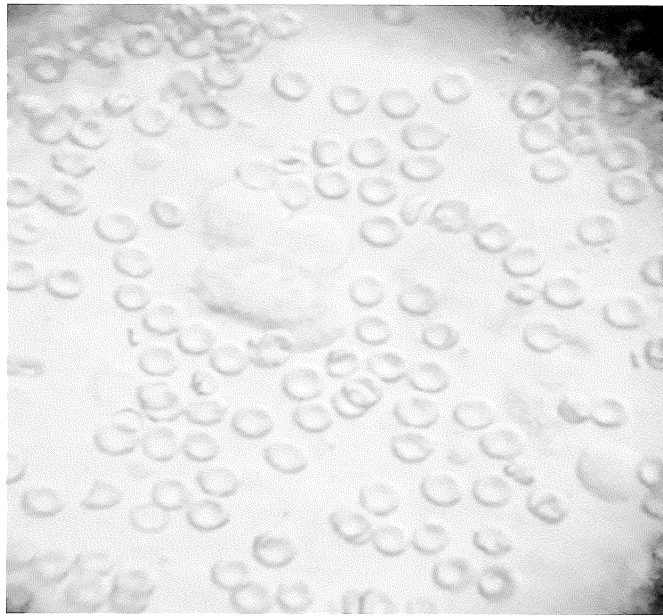
1. Quy trình phân lập tinh trùng từ mô tinh hoàn, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) xử lý mẫu bằng cách thu thập từ 5 đến 10 mg mẫu mô tinh hoàn chứa ống sinh tinh chuyển vào môi trường đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin đã được giữ ở 37°C rồi ly tâm khoảng 5 phút với lực 300g, phần mô lắng được trộn đều với khoảng từ 2 đến 5ml dung dịch đệm ly giải hồng cầu (ELB) chứa 155mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM  $\text{KHCO}_3$  và 2mM EDTA, pH=7,2 trong khoảng từ 5 đến 10 phút, sau đó rửa dịch huyền phù lẫn mẫu mô với lượng từ 5 đến 10 ml môi trường đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin thu được mẫu mô tinh hoàn sạch;

b) phân giải mô liên kết bằng cách cấy khoảng từ 1 đến 3 mg mẫu mô tinh hoàn sạch vào 0,5 ml dung dịch nuôi cấy bao gồm đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin được bổ sung enzym collagenaza typ IA với nồng độ 0,95 mg/ml, 25 $\mu\text{g}$  Dnaza và 1,6 mM  $\text{CaCl}_2$ , ủ ở 37°C trong môi trường 5%  $\text{CO}_2$  trong khoảng từ 2 đến 3 giờ, mỗi 30 phút lắc nhẹ trong 5 phút để hòa tan mô liên kết, thu được dịch nuôi cấy màu trắng đục; và

c) thu tinh trùng bằng cách trộn đều dịch nuôi cấy và ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút, sau khi loại bỏ phần dịch, thu phần cặn, bổ sung từ từ 200 đến 300  $\mu\text{l}$  dung dịch nuôi cấy bao gồm đệm bicarbonat chứa HEPES, HSA và gentamicin bổ sung enzym collagenaza typ IA với nồng độ 0,95 mg/ml, 25 $\mu\text{g}$  Dnaza và 1,6 mM  $\text{CaCl}_2$  vào phần cặn và rửa nhẹ, sau khi loại bỏ phần dịch, thu được mẫu tinh trùng sạch, mẫu tinh trùng này được ủ trong tủ chứa 5%  $\text{CO}_2$  ở nhiệt độ 37°C trong 45 phút để thu được tinh trùng hoạt động.

**HÌNH 1**



**HÌNH 2**

