



(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)



2-0003607

(51) **A01N 1/02; C12N 5/06; C12N 1/04**
2006.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00660

(22) 22/09/2021

(67) 1-2021-05980

(45) 27/05/2024 434

(43) 27/12/2021 405

(73) 1. Nguyễn Thanh Tùng (VN)

29 Liên Kê 1, Khu Đô Thị An Hưng, Phường Dương Nội, Quận Hà Đông, Hà Nội

2. Đỗ Ngọc Lan (VN)

Phòng 207, chung cư A3 Tổ 7, Phường Phúc La, Quận Hà Đông, Hà Nội

(72) Nguyễn Thanh Tùng (VN); Đỗ Ngọc Lan (VN); Dương Đình Hiếu (VN); Nguyễn Thị Thục Anh (VN); Lê Thanh Huyền (VN).

(54) **QUY TRÌNH BẢO QUẢN MẪU TINH TRÙNG SỐ LƯỢNG ÍT BẰNG PHƯƠNG PHÁP
THỦY TINH HÓA**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình bảo quản mẫu tinh trùng số lượng ít bằng phương pháp thủy tinh hóa, không nhằm mục đích phòng ngừa, chẩn đoán, điều trị bệnh, quy trình này về cơ bản bao gồm các bước:

i) chuẩn bị mẫu tinh trùng trước khi bảo quản;

ii) xử lý ly tâm mẫu tinh trùng;

iii) chuẩn bị dung dịch bảo quản chứa môi trường cơ bản F12, glyxerol, albumin và sucroza;

iv) bổ sung dung dịch bảo quản trên đây vào ống chứa phần cặn tinh trùng đã được ly tâm;

v) tiến hành phân chia hỗn hợp thu được trong bước iv) vào trong các ống PCR;

vi) tiến hành nhúng ống PCR mà đã được xếp trước vào giá đỡ trong nitrơ lỏng; và

vii) lưu trữ trong bình bảo quản có chứa nitrơ lỏng.

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép trữ đông mẫu tinh trùng số lượng ít (thiểu tinh), cụ thể là cho phép trữ đông mẫu tinh trùng có mật độ nhỏ hơn so với mẫu tinh trùng thông thường theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới 2010 (WHO 2010) với kết quả sau rã đông cải thiện tỷ lệ tinh trùng di động và sống.

Ngoài ra, quy trình theo giải pháp hữu ích không cần thiết bị hạ nhiệt độ, tiết kiệm nitrơ lỏng, tiết kiệm (rút ngắn) thời gian, cho phép sử dụng môi trường tự pha đảm bảo chất lượng và tiết kiệm chi phí, từ đó sẽ giúp tăng hiệu quả trong các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm.

Lĩnh vực kỹ thuật đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ y sinh, cụ thể giải pháp hữu ích đề xuất quy trình bảo quản mẫu tinh trùng số lượng ít bằng phương pháp thủy tinh hóa nhằm mục đích sử dụng trong các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm.

Quy trình theo giải pháp hữu ích không nhằm mục đích phòng ngừa, chẩn đoán, điều trị bệnh và cho phép trữ đông mẫu tinh trùng số lượng ít (thiểu tinh), cụ thể là cho phép trữ đông mẫu tinh trùng có mật độ nhỏ hơn so với mẫu tinh trùng thông thường theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới 2010 (WHO 2010) với kết quả sau rã đông cải thiện tỷ lệ tinh trùng di động và sống so với quy trình thông dụng hiện hành.

Ngoài ra, quy trình theo giải pháp hữu ích không cần thiết bị hạ nhiệt độ, tiết kiệm nitơ lỏng, tiết kiệm (rút ngắn) thời gian, cho phép sử dụng môi trường tự pha đảm bảo chất lượng và tiết kiệm chi phí, từ đó tăng hiệu quả trong các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm.

Giải pháp hữu ích còn mô tả quy trình rã đông mẫu tinh trùng được lưu trữ trên đây nhằm xác định các đặc tính của tinh trùng sau khi được lưu trữ theo quy trình lưu trữ của giải pháp hữu ích.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Ở con người, tinh trùng là giao tử đực, mang bộ nhiễm sắc thể đơn bội với 23 nhiễm sắc thể. Khi thụ tinh, 23 nhiễm sắc thể của tinh trùng kết hợp với 23 nhiễm sắc thể của trứng để tạo thành hợp tử với 46 nhiễm sắc thể và phát triển thành một cá thể hoàn chỉnh. Tinh trùng được biệt hóa cao độ để thực hiện chức năng sinh sản của nó, đó là di chuyển trong đường sinh dục nữ, nhận biết và thụ tinh với trứng. Để thụ tinh, chúng bắt buộc phải bơi qua cổ tử cung, sau đó đi xuyên qua tử cung để tiếp cận được với vòi trứng và buồng trứng của người phụ nữ.

Phần lớn tinh trùng không thực sự bơi thẳng. Thông thường, tốc độ di chuyển của tinh trùng được phân thành một trong ba nhóm sau:

1. Tích cực di chuyển theo đường thẳng hoặc vòng tròn lớn
2. Di chuyển ở mọi mô hình nhưng không tiến về phía trước
3. Bất động - không di chuyển.

Tinh trùng chỉ có thể sống trong một thời gian ngắn sau khi được phóng ra. Tuổi thọ của tinh trùng còn phụ thuộc vào nơi tinh trùng “hạ cánh” sau khi xuất tinh. Bản thân tinh trùng sau khi xuất tinh vào âm đạo có thể sống đến năm

ngày. Điều này là do tác dụng bảo vệ của chất nhầy cổ tử cung. Nhưng nếu tinh trùng bị khô, chúng sẽ chết. Tinh trùng xuất tinh rơi vào các vật thể khô, lạnh có thể chết sau vài phút, mặc dù rất hiếm khi chúng có thể kéo dài đến tận 30 phút. Thậm chí chúng có thể chết nhanh hơn trong bồn nước nóng hay do nhiệt hoặc hóa chất trong nước.

Ngày nay, tình trạng hiếm muộn ngày càng gia tăng, nên việc lưu giữ, bảo quản tinh trùng đã và đang rất được quan tâm. Tinh trùng thường được bảo quản bằng phương pháp đông lạnh để bảo tồn chúng để sử dụng trong tương lai. Bằng cách sử dụng công nghệ đặc biệt và sau đó giữ tinh trùng trong nitơ lỏng ở nhiệt độ âm 196°C và nó có thể được lưu giữ trong nhiều năm với chất lượng được đảm bảo. Trữ lạnh tinh trùng cho phép tinh trùng được sử dụng trong tương lai trong hỗ trợ sinh sản, như bơm tinh trùng vào buồng tử cung (IUI) hoặc thụ tinh trong ống nghiệm (IVF).

Hiện nay các mẫu tinh trùng được bảo quản bằng quy trình đông lạnh là đông lạnh chậm và thủy tinh hóa. Điểm chung của hai phương pháp đều là hạ nhiệt độ mẫu tinh trùng được chứa trong dụng cụ lưu trữ xuống nhiệt độ rất thấp và bảo quản trong nitơ lỏng. Sự khác biệt chính của hai phương pháp này đó là có hay không có sự hình thành tinh thể đá nội bào cũng như ngoại bào.

Trong phương pháp đông lạnh chậm, mẫu tinh trùng được làm lạnh với tốc độ hạ nhiệt chậm, từ nhiệt độ sinh lý xuống nhiệt độ rất thấp trước khi đưa vào lưu trữ trong nitơ lỏng. Mẫu tinh trùng được chứa trong các ống Cryotube (Cryovial tube) trữ lạnh. Trước khi hạ nhiệt độ, mẫu trữ sẽ được thêm chất bảo quản ở nhiệt độ phòng và để cân bằng trong mười (10) phút. Trong quá trình này, một lượng lớn nước trong tế bào sẽ bị mất ra ngoài. Nhược điểm của phương pháp này sẽ hình thành tinh thể đá nội bào cũng như ngoại bào.

Thủy tinh hóa là phương pháp trữ lạnh dựa trên nguyên lý không có sự hình thành tinh thể đá bên trong và ngoài tế bào. Toàn bộ vật chất (bao gồm cả phân tử nước) bên trong và môi trường bên ngoài tế bào sẽ chuyển thành dạng kính và hoàn toàn không có sự hình thành tinh thể đá. Bản chất của quá trình này đòi hỏi hạ nhiệt độ rất nhanh với thể tích nhỏ cho phép. Mẫu tinh trùng được lưu trữ trong dụng cụ chứa như màng trong suốt, hệ thống đông lạnh kín (cellsleeper), dụng cụ trữ phôi (cryotop), dụng cụ cryoloop. Chất bảo quản yêu cầu nồng độ hợp lý.

Màng trong suốt (ZP – zona pellucidae) từ người và động vật được sử dụng cho việc đông lạnh các tinh trùng đơn lẻ. Noãn được loại bỏ tế bào chất bên trong và tinh trùng được chuyển vào ZP bằng kim ICSI. Trước khi đông lạnh, ZP được giữ cân bằng với chất bảo quản lạnh (cryoprotective agents – CPA) thành phần glycerol, sau đó chuyển ZP có chứa tinh trùng vào cọng rạ và nhúng vào nitơ lỏng bảo quản. ZP có kích thước lớn nên là vật chứa được nhiều

tinh trùng và dễ quan sát dưới kính hiển vi. Tuy nhiên, giới hạn của ZP là vật liệu sinh học. Khi loại bỏ tế bào chất từ noãn, các mảnh vỡ ADN có thể chưa được loại bỏ hoàn toàn, lưu lại và được chuyển vào noãn cho lần tiêm tinh trùng vào bào tương trứng (ICSI) sau đó. Một số nguyên cứu cho rằng việc trữ lạnh tinh trùng bằng ZP cho tỷ lệ phục hồi chất lượng tinh trùng sau rã đông và tỷ lệ thụ tinh thấp do tinh trùng gắn vào ZP3 trên ZP cũng có thể gây ra phản ứng acrosome ảnh hưởng đến chất lượng tinh trùng. Ngoài ra, việc sử dụng ZP trên người còn liên quan đến vấn đề đạo đức ở một số quốc gia; vì vậy, trong tương lai các nhà khoa học đang dần tìm kiếm vật liệu phi sinh học thay thế tương tự như ZP.

Cell-sleeper là hệ đông lạnh kín, cho phép đông lạnh tinh trùng số lượng ít.

Cryotop được sử dụng phổ biến ở khoảng 40 quốc gia. Vật liệu tạo ra cryotop từ nhựa cứng, có thể chống lại sự phá hủy cơ học vật lý và chống nhiễm virus từ bình chứa nitơ lỏng nên an toàn cho mẫu chứa. Vì vậy, cryotop được sử dụng chủ yếu trong các trung tâm điều trị IVF hiện nay. Tuy nhiên, khi đông lạnh bằng cryotop với các hóa chất đông lạnh khác nhau cho tỷ lệ tinh trùng di động khác nhau.

Cryoloop là dụng cụ bao gồm một vòng tròn rỗng bằng nhựa mềm, gắn với cán nhựa hoặc kim loại. Dung dịch thủy tinh hóa tạo thành một lớp màng mỏng trong phần rỗng của vòng trong và tinh trùng/phôi được đặt lên trên màng mỏng này, sau đó toàn bộ dụng cụ chứa đặt trong nitơ lỏng. Cryoloop giúp bảo quản được tinh trùng số lượng ít, đơn giản, loại bỏ các bước rửa tinh trùng và có thể thay thế cho việc trữ tinh trùng bằng ZP. Tuy nhiên, đây là hệ thống đông lạnh hở nên nguy cơ lây nhiễm chéo dễ xảy ra cho các mẫu đông lạnh.

Các dụng cụ và chất bảo quản trên đòi hỏi chi phí cao, kỹ thuật thực hiện phức tạp. Vì thế có nhu cầu đổi với việc tối ưu dụng cụ chứa mẫu tinh trùng số lượng ít, chất bảo quản mẫu và kỹ thuật thực hiện.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là khắc phục các nhược điểm nêu trên.

Mục đích khác của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình không nhằm mục đích phòng ngừa, chẩn đoán, điều trị bệnh mà cho phép trữ đông mẫu tinh trùng số lượng ít, cụ thể là cho phép trữ đông mẫu tinh trùng có mật độ nhỏ hơn so với mẫu tinh trùng thông thường theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới 2010 (WHO 2010) với kết quả sau rã đông cải thiện tỷ lệ tinh trùng di động và sống so với quy trình thông dụng hiện hành.

Mục đích khác nữa của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình cho phép không cần thiết bị hạ nhiệt độ, tiết kiệm nitơ lỏng, tiết kiệm (rút ngắn) thời gian,

và cho phép sử dụng môi trường tự pha đảm bảo chất lượng, tiết kiệm chi phí, từ đó tăng hiệu quả trong các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm.

Để đạt được các mục đích trên đây, theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình bảo quản trữ đông với dụng cụ lưu trữ và nồng độ chất bảo quản phù hợp với mẫu tinh trùng số lượng ít bằng phương pháp đông lạnh bằng thủy tinh hóa, không nhằm mục đích phòng ngừa, chẩn đoán, điều trị bệnh, quy trình này bao gồm các bước:

i) chuẩn bị mẫu tinh trùng trước khi bảo quản, trong đó:

tiến hành thu nhận mẫu tinh trùng,

đánh giá chất lượng mẫu tinh trùng để chọn mẫu trước khi tiến hành bảo quản, trong đó mẫu tinh trùng được chọn là mẫu tinh trùng có mật độ nhỏ hơn $15 \times 10^6/\text{mL}$ ($< 15 \times 10^6/\text{mL}$);

ii) xử lý ly tâm mẫu tinh trùng, trong đó:

tiến hành ly tâm mẫu tinh trùng với tốc độ ly tâm là khoảng 1500 vòng/phút trong thời gian khoảng 10 phút, và

loại bỏ dịch nổi để thu được phần cặn tinh trùng đã được ly tâm;

iii) chuẩn bị dung dịch bảo quản, trong đó:

dung dịch bảo quản được chuẩn bị từ các thành phần bao gồm dung dịch F12, glyxerol nồng độ 99,99% (theo khối lượng), dung dịch sucroza 0,1M, albumin 20% (theo khối lượng), và

tỷ lệ thể tích của dung dịch sucroza 0,1M/albumin20%/glyxerol 99,99%/dung dịch F12 là khoảng 50/5/10,01/34,9;

iv) bổ sung dung dịch bảo quản trong bước iii) vào phần cặn tinh trùng trong bước ii), trong đó:

tỷ lệ theo thể tích của phần cặn tinh trùng/dung dịch bảo quản là khoảng 7/10, và

tiến hành trộn đều, sau đó để ở nhiệt độ phòng trong khoảng 10 phút;

v) chia hỗn hợp thu được trong bước iv) vào trong các ống PCR;

vi) xếp các ống PCR trong bước iv) vào giá đỡ, đặt cách bề mặt nitơ lỏng khoảng 3cm trong 2 phút, sau đó nhúng $\frac{1}{2}$ (nửa) phần đáy ống vào trong nitơ lỏng để tránh nitơ lỏng tràn vào ống trong thời gian khoảng 10 giây;

vii) cho các ống PCR vào ống Cryotube trữ lạnh, đậy nắp kín mà đã được ghi mã số lưu trữ, lưu trữ ống Cryotube trong bình bảo quản chứa nitơ lỏng.

Theo một phương án, trong bước i) mẫu được bảo quản trong lọ đựng vô trùng.

Theo phương án khác, trong bước ii) mẫu được chứa trong ống Falcon đáy tròn vô trùng dung tích 5mL để tiến hành ly tâm.

Theo phương án khác nữa, trong bước iii) dung dịch sucroza 0,1M được chuẩn bị bằng cách pha sucroza dạng hạt vào nước cất theo tỷ lệ khoảng khối lượng (g)/thể tích (mL) của sucroza/nước cất là khoảng 3,42/100.

Theo phương án khác nữa, trong bước iii) dung dịch bảo quản được chuẩn bị từ các thành phần bao gồm dung dịch F12, glyxerol nồng độ 99,99% và dung dịch sucroza 0,1M bằng cách pha trộn 50 mL của dung dịch sucroza 0,1M, 5mL albumin 20%, 10,01 mL glyxerol 99,99% và 34,9mL dung dịch F12.

Theo phương án khác nữa, trong bước iv) tỷ lệ theo thể tích dung dịch bảo quản/ phần cận tinh trùng là khoảng 7/10.

Theo phương án khác nữa, trong bước v) hỗn hợp thu được trong bước iv) được chia vào trong các ống PCR với lượng khoảng chứa 5 μ l hỗn hợp này.

Theo phương án khác nữa, trong bước vi) ba ống PCR được cho vào một ống Cryotube trữ lạnh để tiến hành bảo quản.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích còn mô tả quy trình rã đông tinh trùng bao gồm các bước:

- i) bổ sung nhanh dung dịch Sperm Rinse vào ống PCR lưu trữ tinh trùng mà đã được lưu trữ trong nitơ lỏng theo quy trình như nêu trong khía cạnh thứ nhất hoặc phương án bất kỳ của khía cạnh này và tiến hành trộn đều;
- ii) tiến hành ly tâm ở tốc độ khoảng 1000 vòng/phút trong khoảng 10 phút, trong đó tỷ lệ thể tích của mẫu trong ống PCR/môi trường Sperm Rinse là khoảng 1/50;
- iii) bỏ dịch nổi, thu lấy cận lắng sau khi được rã đông.

Theo một phương án của khía cạnh thứ hai, quy trình này còn bao gồm bước:

- iv) trộn đều sản phẩm thu được trong bước iii), sau đó tiến hành đánh giá mật độ và chất lượng tinh trùng sau rã đông.

Theo phương án khác, trong bước i) 2mL môi trường Sperm Rinse được bổ sung vào 25 μ l mẫu trong mỗi ống PCR.

Theo phương án khác nữa, trong bước iii) lượng cận lắng thu được là khoảng 100 μ l.

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép trữ đông mẫu tinh trùng số lượng ít (thiểu tinh), cụ thể là cho phép trữ đông mẫu tinh trùng có mật độ nhỏ hơn so với mẫu tinh trùng thông thường theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới 2010 (WHO 2010), cụ thể là cho phép lưu trữ tinh trùng với mật độ nhỏ hơn $15 \times 10^6/\text{mL}$, với kết quả sau rã đông cải thiện tỷ lệ tinh trùng di động và sống so với quy trình thông dụng hiện hành mà sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Ngoài ra, quy trình theo giải pháp hữu ích không cần thiết bị hạ nhiệt độ, tiết kiệm nitơ lỏng, tiết kiệm (rút ngắn) thời gian, cho phép sử dụng môi trường tự pha đảm bảo chất lượng và tiết kiệm chi phí, từ đó tăng hiệu quả trong các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích còn được mô tả thông qua các phương án cụ thể được ưu tiên theo theo giải pháp hữu ích. Cần phải hiểu rằng, giải pháp hữu ích không chỉ giới hạn chỉ ở các phương án này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, trên cơ sở thông tin được bộc lộ, có thể thực hiện các thay đổi, biến đổi để tạo ra các phương án tương đương và/hoặc hiển nhiên so với các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “khoảng” trước các giá trị số được dùng để chỉ chính các giá trị số đó, cũng như các giá trị số nằm trong khoảng $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ giá trị số đó. Theo phương án được ưu tiên, tốt hơn nếu thuật ngữ này được dùng để chỉ chính các giá trị số đó.

Cần lưu ý rằng, giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ y sinh và đề xuất quy trình bảo quản mẫu tinh trùng số lượng ít bằng phương pháp thủy tinh hóa với mục đích bao gồm sử dụng trong các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm. Quy trình theo giải pháp hữu ích không nhằm mục đích phòng ngừa, chẩn đoán, điều trị bệnh và cho phép trữ đông mẫu tinh trùng số lượng ít (thiểu tinh), cụ thể là cho phép trữ đông mẫu tinh trùng có mật độ nhỏ hơn so với mẫu tinh trùng thông thường theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới 2010 (WHO 2010) với kết quả sau rã đông cải thiện tỷ lệ tinh trùng di động và sống so với quy trình thông dụng hiện hành.

Theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới 2010 (WHO 2010), liên quan đến tinh trùng, cần lưu ý các thuật ngữ và các nội dung sau đây.

pH mẫu

pH của tinh dịch phản ánh sự cân bằng giữa giá trị pH của dịch tiết từ các tuyến sinh dục phụ khác nhau: dịch tiết từ túi tinh mang tính kiềm và dịch tiết của tuyến tiền liệt có tính axit. pH nên được đo sau khi mẫu ly giải, thường là khoảng 30 phút sau khi xuất tinh. Nếu để mẫu quá lâu sẽ có sự thay đổi nồng độ

CO₂ trong mẫu, vì vậy thời gian đo pH nên trong khoảng 30 đến 60 phút sau khi xuất tinh.

Giá trị 7,2 được sử dụng là ngưỡng tham khảo tối thiểu cho giá trị pH của tinh dịch. Những trường hợp mẫu có pH có tính axit (<7,0) thường nghi ngờ không có tinh trùng hoặc có rất ít tinh trùng trong mẫu.

Thể tích mẫu

Thể tích của mẫu xuất tinh có nguồn gốc chính từ túi tinh và tuyến tiền liệt với một lượng nhỏ từ tuyến hành niệu đạo và mào tinh hoàn. Thể tích tinh dịch cho phép tính tổng số tinh trùng trong mỗi lần xuất tinh và các tế bào không phải tinh trùng trong mẫu. Thể tích mẫu được tính bằng cách lấy cân nặng của lọ chứa tinh dịch trừ đi cân nặng của lọ ban đầu. Ở đây, tỷ trọng của tinh dịch là 1 g/mL.

Mật độ tinh trùng và tổng tinh trùng trong mẫu

Tổng số tinh trùng và mật độ tinh trùng trong một lần xuất tinh đều được chứng minh là cơ sở để tiên lượng khả năng có thai. Trong những trường hợp xuất tinh bình thường, hệ thống ống dẫn tinh không bị bế tắc, thời gian kiêng xuất tinh ngắn, tổng tinh trùng trong một lần xuất tinh tương quan với thể tích tinh hoàn.

Mật độ tinh trùng là số tinh trùng trên một đơn vị thể tích tinh dịch. Tổng số tinh trùng là tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh toàn bộ, được tính bằng mật độ nhân với thể tích tinh dịch. Để tính mật độ tinh trùng, có thể sử dụng buồng đếm Neubauer cải tiến. Chỉ đếm những tinh trùng có đầy đủ đầu và đuôi rõ ràng.

Giới hạn tối thiểu của mật độ tinh trùng là 15×10^6 tinh trùng/mL tinh dịch.

Giới hạn tối thiểu của tổng tinh trùng trong mẫu là $\geq 39 \times 10^6$ tinh trùng. Một mẫu được đánh giá là có mật độ tinh trùng bình thường khi có đồng thời mật độ tinh trùng và tổng tinh trùng trong mẫu đều lớn hơn giới hạn tối thiểu.

Độ di động của tinh trùng

Độ di động của tinh trùng được phân loại như sau:

- Tinh trùng di động tiến tới (PR): tinh trùng di chuyển tích cực, hoặc là tuyến tính hoặc trong một vòng tròn lớn, bất kể tốc độ.

- Tinh trùng di động không tiến tới (NP): có khả năng di động trong các trường hợp như bơi trong vòng tròn nhỏ, di động tại chỗ hoặc đuôi cử động nhẹ.
- Tinh trùng bất động (IM): tinh trùng không di động.

Khi xem xét độ di động của tinh trùng, cần xác định tổng tỷ lệ tinh trùng di động (PR+NP) hoặc tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới (PR). Theo tiêu chuẩn WHO 2010, những mẫu có $PR \geq 32\%$ hoặc $PR + NP \geq 40\%$ được cho là những mẫu có độ di động trên ngưỡng giới hạn tối thiểu.

Tỷ lệ sống

Đánh giá tinh trùng sống qua việc xác định tính nguyên vẹn của màng tế bào. Tỷ lệ tinh trùng sống thường cao hơn tỷ lệ tinh trùng di động. Tỷ lệ này quan trọng ở những mẫu có số lượng tinh trùng di động thấp hơn 40%, đặc biệt ở những trường hợp tinh trùng bất động 100%.

Tỷ lệ tinh trùng sống được đánh giá bằng cách xác định tính nguyên vẹn của màng tế bào thông qua khả năng kháng thuốc nhuộm hay phản ứng trong môi trường nhuộm trương. Đánh giá khả năng sống bằng thuốc nhuộm Eosin-Nigrosin là kỹ thuật nhuộm kết hợp Nigrosin giúp tăng sự tương phản giữa nền tiêu bản và đầu tinh trùng, làm cho chúng dễ phân biệt hơn. Giá trị tham khảo tối thiểu cho tinh trùng sống là 58%.

Hình dạng bình thường của tinh trùng

Hình dạng tinh trùng rất đa dạng làm cho việc đánh giá trở nên khó khăn. Những quan sát trên tinh trùng thu được ở cơ quan sinh dục nữ, đặc biệt là trong chất nhầy cổ tử cung sau giao hợp cũng như bề mặt màng trong suốt của noãn giúp xác định hình dạng của các tinh trùng có khả năng thụ tinh (hình dạng bình thường). Việc đánh giá nghiêm ngặt cho thấy tỷ lệ tinh trùng có hình dạng bình thường có thể giúp tiên lượng khả năng mang thai tự nhiên và trong hỗ trợ sinh sản.

Những tinh trùng được đánh giá là bình thường không được có bất kỳ bất thường nào ở đầu, cổ, thân và đuôi tinh trùng. Để đánh giá hình dạng tinh trùng, người ta sử dụng quy trình nhuộm Papanicolaou.

Nhuộm Papanicolaou còn được gọi là “nhuộm PAP”, là một loại kỹ thuật tế bào học nhuộm đa sắc, dùng để phân biệt tế bào trên phiến đồ được lấy từ các dịch hoặc từ tế bào bong của cơ thể. Cho đến nay, cơ chế nhuộm của kỹ thuật vẫn chưa được hiểu một cách đầy đủ. Tuy nhiên, dạng kinh điển của nhuộm PAP gồm 5 loại phẩm màu, được pha thành 3 dung dịch.

Hematoxylin (phẩm nhuộm base): nhuộm nhân tế bào

Orang G (gồm axit photphotungstic và OG-5, OG-8): nhuộm chất keratin có trong tế bào.

Phẩm EA (Eosin Azure): gồm 3 loại phẩm (EA-36, EA-50, EA-65). Eosin Y nhuộm các tế bào vảy bề mặt, hạt nhân, hồng cầu. Xanh lá cây nhạt SF (Light Green). Ánh vàng dùng để nhuộm bào tương của các loại tế bào khác (tế bào vảy không sừng hóa). Nâu Bismarck Y do không nhuộm thành phần nào nên trong công thức nhuộm hiện tại, một số phòng xét nghiệm đã bỏ

Phương pháp này cho phép tinh trùng và các tế bào khác bắt màu tốt với thuốc nhuộm. Theo tiêu chuẩn của WHO (2010), ngưỡng giới hạn tối thiểu của hình dạng tinh trùng bình thường ở người là 4%.

Sự hiện diện các tế bào không phải tinh trùng

Sự hiện diện của các tế bào không phải là tinh trùng trong tinh dịch thường là dấu hiệu của bệnh lý về tổn thương tinh hoàn (hiện diện các tế bào mầm chưa trưởng thành), bệnh lý ống dẫn tinh hoặc viêm nhiễm các tuyến phụ (hiện diện các bạch cầu). Việc đánh giá các tế bào này giống như cách đánh giá đối với tinh trùng. Ở mật độ thấp, sự hiện diện của các tế bào này không cần ghi nhận lại, tuy nhiên nếu mật độ của chúng vượt quá ngưỡng 1×10^6 tế bào/mL tinh dịch thì đây là dấu hiệu của bệnh lý.

Nói cách khác, mẫu tinh trùng được bảo quản thường có thông số như được thể hiện trong Bảng 1 sau đây

Bảng 1

Thông số	WHO 2010
Thời gian ly giải	15 – 60 phút
Thể tích tinh dịch	$\geq 1,5\text{mL}$
Độ pH	$\geq 7,2$
Mật độ tinh trùng	$\geq 15 \times 10^6$
Tổng số tinh trùng	$\geq 39 \times 10^6$
Độ di động	Tỷ lệ tiến tới $\geq 32\%$ Tỷ lệ tinh trùng tiến tới + tinh trùng di động tại chỗ (PR+NP) $\geq 40\%$

Hình thái bình thường	$\geq 4\%$
Tỷ lệ sống	$\geq 58\%$
Tế bào lạ	< 1 triệu tế bào/mL

Giải pháp hữu ích, theo cách ngược lại và linh hoạt, cho phép lưu trữ tinh trùng với mật độ nhỏ hơn tiêu chuẩn trên đây, cụ thể là cho phép lưu trữ tinh trùng với mật độ nhỏ hơn 15×10^6 /mL.

Cụ thể hơn, theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình trữ đông với dụng cụ lưu trữ và nồng độ chất bảo quản phù hợp với mẫu tinh trùng số lượng ít bằng phương pháp đông lạnh bằng thủy tinh hóa, không nhằm mục đích phòng ngừa, chẩn đoán, điều trị bệnh, quy trình này bao gồm các bước:

i) chuẩn bị mẫu tinh trùng trước khi bảo quản, trong đó:

tiến hành thu nhận mẫu tinh trùng,

đánh giá chất lượng mẫu tinh trùng để chọn mẫu trước khi tiến hành bảo quản, trong đó mẫu tinh trùng được chọn là mẫu tinh trùng có mật độ nhỏ hơn 15×10^6 /mL ($< 15 \times 10^6$ /mL);

ii) xử lý ly tâm mẫu tinh trùng, trong đó:

tiến hành ly tâm mẫu tinh trùng với tốc độ ly tâm là khoảng 1500 vòng/phút trong thời gian khoảng 10 phút, và

loại bỏ dịch nổi để thu được phần cặn tinh trùng đã được ly tâm;

iii) chuẩn bị dung dịch bảo quản, trong đó:

dung dịch bảo quản được chuẩn bị từ các thành phần bao gồm dung dịch F12, glyxerol nồng độ 99,99% (theo khối lượng), albumin 20% (theo khối lượng) và dung dịch sucroza 0,1M; và

tỷ lệ thể tích của dung dịch sucroza 0,1M/albumin20%/glyxerol 99,99%/dung dịch F12 là khoảng 50/5/10,01/39,99;

iv) bổ sung dung dịch bảo quản trong bước iii) vào phần cặn tinh trùng đã được ly tâm trong bước ii), trong đó:

tỷ lệ theo thể tích dung dịch bảo quản/phần cặn tinh trùng đã được ly tâm là khoảng 7/10, và

tiến hành trộn đều, sau đó để ở nhiệt độ phòng trong khoảng 10 phút;

v) chia hỗn hợp thu được trong bước iv) vào trong các ống PCR với thể tích 5 μ L;

vi) xếp các ống PCR trong bước iv) vào giá đỡ, đặt cách bề mặt nitơ lỏng khoảng 3cm trong 2 phút, sau đó nhúng ½ phần đáy ống vào trong nitơ lỏng để tránh nitơ lỏng tràn vào ống trong thời gian khoảng 10 giây;

vii) cho các ống PCR vào ống Cryotube (Nunc – ThermoFisher Scientific) trữ lạnh, đậy nắp kín mà đã được ghi mã số lưu trữ, lưu trữ ống Cryovial trong bình bảo quản chứa nitơ lỏng.

Theo một phương án, trong bước i) mẫu được bảo quản trong lọ đựng vô trùng.

Theo giải pháp hữu ích, mẫu tinh trùng còn được ly tâm. Mục đích của việc ly tâm mẫu tinh trùng là làm tăng số lượng tinh trùng trong một thể tích nhỏ khi trữ đông để đảm bảo khi rã đông thu hồi được số lượng tối đa, giảm số lượng dụng cụ lưu trữ tinh trùng.

Các tác giả giải pháp hữu ích đã tiến hành ly tâm mẫu tinh trùng trong ống 5ml Falcon-BD, mà là ống đáy tròn vô trùng có độ chính xác cao, chuyên dụng trong phòng thí nghiệm được sản xuất từ nhựa, thường là Polypropylen hoặc Polystyren, có độ tinh khiết cao, đáy tròn, nắp làm bằng Polyetylen nắp kiểu chụp, tốt hơn là có dung tích 5 mL. Lực ly tâm có thể chịu được lên tới 3000 vòng, thử nghiệm nội độc tố Endotoxin < 0,1 EU/ml, ống được đóng gói tiệt trùng từng cái, do đó giúp đảm bảo an toàn tuyệt đối cho mẫu được lưu trữ bên trong. Ngoài ra, ống còn có vùng rộng để đánh dấu và ký hiệu mẫu ở trên thân của ống, thuận lợi cho quá trình vận hành, thực hiện.

Quá trình ly tâm trong bước ii) tốt hơn là được thực hiện với tốc độ ly tâm là 1500 vòng/phút trong thời gian 10 phút, sau đó tiến hành loại bỏ dịch nổi để thu được phần cận tinh trùng đã được ly tâm.

Trong bước iii) chuẩn bị dung dịch bảo quản, cần lưu ý rằng các tác giả giải pháp hữu ích cũng đã thực hiện rất nhiều các tổng hợp, nghiên cứu thông tin nhằm chủ động pha chế tạo ra dung dịch bảo quản thích hợp và hiệu quả hơn dùng để lưu trữ mẫu.

Theo một phương án cụ thể, dung dịch bảo quản theo giải pháp hữu ích được pha chế từ các thành phần sau đây:

- a) dung dịch F12;
- b) đường sucroza dạng hạt;
- c) albumin 20%; và

d) dung dịch glyxerol 99,99%.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "dung dịch F12", "môi trường cơ bản F12" được dùng thay thế cho nhau và để chỉ hỗn hợp dinh dưỡng Ham's F-12 (Ham's F-12 nutrient mixture) có thành phần và hàm lượng, nồng độ như được mô tả trong Bảng 2 sau đây.

Bảng 2

Thành phần	Khối lượng phân tử	Nồng độ (mg/L)	mM
Amino axit			
Glycin	75,0	7,5	0,1
L-Alanin	89,0	8,9	0,099999994
L-Arginin hydroclorua	211,0	211,0	1,0
L-Asparagin-H ₂ O	150,0	15,01	0,10006667
axit L-Aspartic	133,0	13,3	0,1
L-Cystein hydroclorua-H ₂ O	176,0	35,12	0,19954544
Axit L-Glutamic	147,0	14,7	0,1
L-Glutamin	146,0	146,0	1,0
L-Histidin hydroclorua-H ₂ O	210,0	21,0	0,1
L-Isoleucin	131,0	4,0	0,030534351
L-Leucin	131,0	13,1	0,1
L-Lysin hydroclorua	183,0	36,5	0,19945355
L-Methionin	149,0	4,5	0,030201342
L-Phenylalanin	165,0	5,0	0,030303031
L-Prolin	115,0	34,5	0,3
L-Serin	105,0	10,5	0,1
L-Threonin	119,0	11,9	0,099999994

Thành phần	Khối lượng phân tử	Nồng độ (mg/L)	mM
L-Tryptophan	204,0	2,04	0,01
L-Tyrosin muối dinatri dihydrat	262,0	7,81	0,02980916
L-Valin	117,0	11,7	0,1
Vitamin			
Biotin	244,0	0,0073	2,9918034E-5
Cholin clorua	140,0	14,0	0,1
D-Canxi pantothenat	477,0	0,5	0,001048218
Axit Folic	441,0	1,3	0,0029478457
Niacinamid	122,0	0,036	2,9508196E-4
Pyridoxin hydroclorua	206,0	0,06	2,9126214E-4
Riboflavin	376,0	0,037	9,8404256E-5
Thiamin hydroclorua	337,0	0,3	8,9020777E-4
Vitamin B12	1355,0	1,4	0,0010332103
i-Inositol	180,0	18,0	0,1
Muối vô cơ			
Canxi Clorua (CaCl_2) (khan)	111,0	33,22	0,2992793
Đồng sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	250,0	0,0025	1,0E-5
Sắt sulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	278,0	0,834	0,003
Magie Clorua (khan)	95,0	57,22	0,6023158
Kali Clorua (KCl)	75,0	223,6	2,9813335
Natri Bicarbonat (NaHCO_3)	84,0	1176,0	14,0
Natri Clorua (NaCl)	58,0	7599,0	131,01724

Thành phần	Khối lượng phân tử	Nồng độ (mg/L)	mM
Natri phosphat diaxit (Na_2HPO_4) khan	142,0	142,0	1,0
Kẽm sulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	288,0	0,863	0,0029965276
Thành phần khác			
D-Glucosa (Dextraza)	180,0	1802,0	10,011111
Hypoxanthin Na	159,0	4,77	0,03
Axit Linoleic	280,0	0,084	2,9999999E-4
Axit Lipoic	206,0	0,21	0,0010194174
Phenol đỏ (Phenol Red)	376,4	1,2	0,0031880978
Putrescin 2HCl	161,0	0,161	0,001
Natri Pyruvat	110,0	110,0	1,0
Thymidin	242,0	0,7	0,002892562

Hỗn hợp dinh dưỡng này, các hóa chất và nguyên liệu là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, do đó việc mô tả thêm là không cần thiết. Thông tin về hỗn hợp này có thể tham khảo tại, ví dụ, <https://www.thermofisher.com/vn/en/home/technical-resources/media-formulation.64.html>.

Dung dịch bảo quản là rất quan trọng đối với quy trình lưu trữ bởi dung dịch này là một trong các yếu tố ảnh hưởng quyết định đến tỷ lệ sống sau khi rã đông. Để xác định tỷ lệ thích hợp nhằm tạo ra dung dịch bảo quản hiệu quả, các tác giả giải pháp hữu ích đã thực hiện pha dung dịch chất bảo quản với các thành phần được khuyến cáo dựa trên các hãng sản xuất môi trường bảo quản và một số nghiên cứu khác đưa ra, cụ thể, nồng độ glycerol khoảng từ 8% đến 15% được áp dụng pha trong một số môi trường chất bảo quản đã được sử dụng rộng rãi trên thị trường. Cụ thể, các tác giả đã pha môi trường với nồng độ glycerol khác nhau ở các tỷ lệ lần lượt 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9% và 8% cùng với sucroza 0,1M và 0,05M sử dụng cùng một mẫu tinh trùng đông lạnh với hai loại chất bảo quản đó là loại tự pha chế và một loại chất bảo quản có sẵn trên thị trường Spermfreeze, Vitrolife (Thụy Điển) để làm nhóm chứng.

Sau khi rã đông kiểm tra mẫu qua kính hiển vi và sử dụng phần mềm SCA (Sperm Class Analyser) để đánh giá tỷ lệ tinh trùng di động, và tiến hành nhuộm bằng kỹ thuật nhuộm eosin-nigrosin để đánh giá tỷ lệ sống. Kết quả cho thấy dung dịch chất bảo quản chứa dung dịch F12, sucroza 0,05M, albumin 1% và glyxerol 10% cho tỷ lệ di động, sống cao nhất. Do đó, theo một phương án cụ thể được ưu tiên, dung dịch bảo quản dùng cho bước iii) trong quy trình theo khía cạnh thứ nhất bao gồm dung dịch F12, sucroza 0,05M, albumin 1% và glyxerol 10%.

Ngoài ra, tác giả giải pháp hữu ích còn nghiên cứu phát hiện ra rằng để thích hợp trong phương pháp thủy tinh hóa tinh trùng, nồng độ chất bảo quản cần nồng độ glyxerol cao phù hợp với tốc độ làm lạnh nhanh. Theo một phương án cụ thể được ưu tiên, dung dịch bảo quản được chuẩn bị từ các thành phần bao gồm dung dịch F12, glyxerol nồng độ 99,99% và dung dịch sucroza 0,05M, và tỷ lệ thể tích của dung dịch sucroza 0,1M/albumin20%/glyxerol 99,99%/dung dịch F12 là khoảng 50/5/10,01/34,9 để tạo ra dung dịch bảo quản giúp, sau rã đông, cải thiện tỷ lệ tinh trùng di động và sống so với quy trình thông dụng hiện hành, đồng thời cho phép sử dụng môi trường tự pha đảm bảo chất lượng và tiết kiệm chi phí, từ đó tăng hiệu quả trong các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm.

Theo phương án khác nữa, trong bước iii) tốt hơn nếu dung dịch sucroza 0,1M được chuẩn bị bằng cách pha sucroza dạng hạt vào nước cất theo tỷ lệ khoảng khối lượng (g)/thể tích (mL) của sucroza/nước cất là khoảng 3,42/100.

Theo phương án khác nữa, trong bước iv) tốt hơn nếu tỷ lệ theo thể tích của dung dịch bảo quản/ phần cặn tinh trùng là khoảng 7/10.

Trong bước v) hỗn hợp thu được trong bước iv) được chia vào trong các ống PCR.

Cần lưu ý rằng, các tỷ lệ và giá trị số trên đây được xem là tỷ lệ và giá trị số cụ thể được ưu tiên theo giải pháp hữu ích. Tuy nhiên, giải pháp hữu ích không chỉ giới hạn các tỷ lệ và giá trị số này. Cụ thể, tỷ lệ và giá trị nằm trong khoảng $\pm 10\%$ là tỷ lệ và giá trị số cụ thể này đều được xem là thích hợp sử dụng theo giải pháp hữu ích.

Ống PCR

Giải pháp hữu ích theo một phương án cụ thể sử dụng loại ống PCR. Ống này có màu trắng đục, được làm từ nhựa polypropylen. Đây là loại nhựa an toàn, có độ bền với nhiệt cao, có thể sử dụng trong công nghệ thực phẩm. Ống PCR có thân hình trụ đáy nhọn, có nắp phẳng, có thể dễ dàng ghi thông tin lên trên vỏ. Các ống này chịu được nhiệt độ âm sâu -196°C , không bị nứt vỡ và đục. Các ống này chủ yếu được sử dụng trong sinh học phân tử trong kỹ thuật PCR để chứa đựng các mảnh ADN.

Loại ống PCR này có thể tích nhỏ, chất liệu an toàn, đáy nhọn được sử dụng để lưu trữ thể tích tinh trùng số lượng nhỏ.

Theo một phương án cụ thể được ưu tiên, giải pháp hữu ích lựa chọn sử dụng giọt có thể tích 5 μ l vì đây là dạng vi giọt phù hợp với thể tích ống PCR và phương pháp thủy tinh hóa theo giải pháp hữu ích.

Theo phương án khác, trong bước vi), sau khi xếp các ống PCR trên đây vào giá đỡ, tiến hành nhúng $\frac{1}{2}$ phần đáy vào trong môi trường nitơ lỏng trong thời gian khoảng 10 giây. Cần lưu ý rằng, chỉ cần nhúng $\frac{1}{2}$ đáy ống PCR để mức dịch chứa tinh trùng trong ống thấp hơn so với mức nitơ lỏng bên ngoài ống trong 10 giây đủ để mẫu tinh trùng chuyển sang trạng thái rắn đảm bảo nitơ lỏng không tràn vào trong ống PCR.

Theo phương án khác, trong bước vii) ống Cryotube trữ lạnh được dùng để tiến hành bảo quản.

Ống Cryotube (Nunc - ThermoFisher Scientific)

Ống Nunc sử dụng theo giải pháp hữu ích là ống được thiết kế sử dụng trong IVF cho việc bảo quản và lưu trữ mẫu tinh trùng từ tinh dịch hoặc từ phẫu thuật. Có thể trữ trong các tủ đông sâu.

Đặc tính kỹ thuật của ống Nunc 1,8mL trữ lạnh:

- Nắp đáy thiết kế kiểu ren vặn xoay với đệm silicone, giúp ống được đóng chặt đảm bảo an toàn tuyệt đối cho mẫu được lưu trữ bên trong
- Thiết kế có vùng ghi dữ liệu trên thân ống
- Thiết kế dễ dàng dùng một tay để mở và đóng nắp
- Chân ống thiết kế hình sao giúp dễ dàng đặt ống thẳng đứng trên bề mặt thao tác
- Thiết kế có vạch làm dấu 1,8mL, tạo thuận lợi cho người thao tác
- Chứng nhận không chứa DNase, RNase, ATP và Pyrogen
- Thiết kế chịu nhiệt xuống đến -196°C

Thông số kỹ thuật

- Thể tích: 1,8 mL
- Chất liệu: Polypropylen
- Đường kính ngoài: 13mm
- Chiều cao: 49mm

Theo một phương án, trong bước vii), 3 ống PCR được cho vào 1 ống Cryotube đầy nắp kín, ghi mã số lưu trữ vào sổ lưu trữ và trên bề mặt ống. Các ống lưu trữ vào bình trữ tinh trùng có chứa nitơ lỏng.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích còn mô tả quy trình rã đông tinh trùng, sau khi được lưu trữ bằng quy trình theo khía cạnh thứ nhất, quy trình này bao gồm các bước:

i) lấy ống lưu trữ tinh trùng đã được lưu trữ trong nitơ lỏng, cho ngay 20µL dung dịch Sperm Rinse vào và trộn đều;

ii) hút trộn mẫu được chứa trong ống PCR của khía cạnh thứ nhất trên đây vào môi trường Sperm Rinse, sau đó tiến hành ly tâm ở tốc độ khoảng 1000 vòng/phút trong khoảng 10 phút, trong đó:

tỷ lệ thể tích của mẫu trong ống PCR/môi trường Sperm Rinse là khoảng 1/50;

iii) bỏ dịch nổi, thu lấy cặn lắng.

Sperm Rinse – Vitrolife – Thụy Điển

Sperm Rinse là môi trường được sử dụng theo giải pháp hữu ích. Môi trường này thường dùng để chuẩn bị tinh trùng trong các phương pháp IUI/IVF. Môi trường này chứa đệm bicarbonat, HEPES, albumin huyết thanh người (Human Serum albumin - HSA) và gentamicin. Bảo quản ở 2 đến 8°C, tránh ánh sáng. Cân bằng trong tủ cấy ở 37°C, 6% CO₂ hoặc ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng. Thời hạn sử dụng từ khi mở chai môi trường: 14 ngày.

Hóa chất này có thể thu mua từ các nguồn có bán sẵn trên thị trường.

Theo một phương án của khía cạnh thứ hai, quy trình rã đông tinh trùng còn bao gồm bước:

iv) trộn đều sản phẩm thu được trong bước iii), sau đó tiến hành đánh giá mật độ và chất lượng tinh trùng sau rã đông.

Theo phương án khác nữa, trong bước ii) 25µl trong các ống PCR được hút cho vào ống Falcon-BD 5mL có sẵn 2mL môi trường Sperm Rinse.

Theo phương án khác nữa, trong bước iii) lượng cặn lắng thu được là khoảng 100µl.

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép trữ đông mẫu tinh trùng số lượng ít (thiểu tinh), cụ thể là cho phép trữ đông mẫu tinh trùng có mật độ nhỏ hơn so với mẫu tinh trùng thông thường theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới 2010 (WHO 2010), cụ thể là cho phép lưu trữ tinh trùng với mật độ nhỏ hơn

$15 \times 10^6/\text{mL}$, với kết quả sau đã đồng cải thiện tỷ lệ tinh trùng di động và sống so với quy trình thông dụng hiện hành mà sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Ngoài ra, quy trình theo giải pháp hữu ích không cần thiết bị hạ nhiệt độ, tiết kiệm nitor lỏng, tiết kiệm (rút ngắn) thời gian, cho phép sử dụng môi trường tự pha đảm bảo chất lượng và tiết kiệm chi phí, từ đó tăng hiệu quả trong các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích còn được mô tả thông qua các ví dụ cụ thể chỉ với mục đích minh họa chi tiết hơn nữa cho giải pháp hữu ích mà không làm giới hạn giải pháp hữu ích theo bất kỳ cách nào.

Ví dụ 1: Pha chế dung dịch bảo quản

Cần lưu ý rằng, giải pháp hữu ích hướng đến việc chủ động tạo ra dung dịch bảo quản từ các hóa chất bằng cách tự pha chế.

Các dung dịch bảo quản được pha chế từ các thành phần sau đây:

- a) Dung dịch F12;
- b) Đường sucroza dạng hạt;
- c) Albumin 20%; và
- d) Dung dịch glyxerol nồng độ 99,99%.

Các bước pha dung dịch chất bảo quản

Bước 1: Pha 100mL dung dịch sucroza 0,1M

Việc pha dung dịch này được thực hiện dựa trên công thức sau:

$$m = M \times V \times 0,1 = 342 \times 0,1 \times 0,1 = 3,42 \text{ g}$$

Do đó, tiến hành pha 3,42g sucroza vào 100mL nước cất để thu được dung dịch sucroza 0,1M mong muốn.

Bước 2: Pha chế 100mL dung dịch chất bảo quản

100mL dung dịch bảo quản được chuẩn bị từ 4 thành phần bao gồm dung dịch F12, sucroza 0,05M, albumin 20% và glyxerol 10%.

$$\text{Hệ số pha loãng của sucroza: } 0,1\text{M}/0,05\text{M} = 2$$

$$\text{Do đó, thể tích (mL) của sucroza 0,1M cần sẽ là } 100\text{mL}/2 = 50\text{mL}$$

$$\text{Hệ số pha loãng của Albumin: } 20\%/1\% = 20$$

$$\text{Do đó, thể tích (mL) của albumin 20% cần sẽ là } 100\text{mL}/20 = 5\text{mL}$$

Hệ số pha loãng của Glyxerol: $99,99\%/10\% = 9,99$

Do đó, thể tích (mL) của glyxerol 99,99% cần sẽ là $100\text{mL}/9,99 = 10,01\text{mL}$

Số mL của F12 cần sẽ là $= 100 - (50 + 5 + 10,01) = 34,9 \text{ mL}$

Như vậy, để pha được 100mL dung dịch chất bảo quản bao gồm: F12, sucroza 0,05M, albumin 1% và glyxerol 10%, quá trình được thực hiện như sau:

Cho 50mL sucroza 0,1M, 5mL albumin 20% và 10,01mL glyxerol 99,99% vào cốc thủy tinh 100mL vô trùng, bổ sung thêm 34,9mL dung dịch F12 vào cốc trên thu được dung dịch bảo quản cần pha.

Lưu ý

Trước khi xác định được tỷ lệ tối ưu trên đây, các tác giả giải pháp hữu ích đã thực hiện pha dung dịch chất bảo quản với các thành phần được khuyến cáo dựa trên các hãng sản xuất môi trường bảo quản và một số nghiên cứu khác đưa ra, cụ thể, nồng độ glyxerol 8% đến 15% được áp dụng pha trong một số môi trường chất bảo quản đã được sử dụng rộng rãi trên thị trường. Cụ thể, các tác giả đã pha môi trường với nồng độ glyxerol khác nhau ở các tỷ lệ lần lượt 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9% và 8% cùng với sucroza 0,1M và 0,05M sử dụng cùng 1 mẫu tinh trùng đông lạnh với 2 loại chất bảo quản đó là loại tự pha chế và một loại chất bảo quản có sẵn trên thị trường Spermfreeze để làm nhóm chứng.

Sau khi lưu trữ và rã đông, kiểm tra mẫu qua kính hiển vi và sử dụng phần mềm SCA để đánh giá tỷ lệ tinh trùng di động. Kết quả cho thấy dung dịch chất bảo quản chứa F12, sucroza 0,05M, Albumin 1% và glyxerol 10% cho tỷ lệ di động cao nhất.

Ví dụ 2: Lấy mẫu tinh trùng theo tiêu chuẩn của WHO 2010, trữ đông và rã đông theo quy trình sử dụng phương pháp đông lạnh chậm thông thường

Ví dụ này được tiến hành với các cặp vợ chồng hiếm muộn đến khám tại Viện Mô Phôi lâm sàng Quân đội. Sau khi thực hiện các bước khám theo quy trình khám bệnh thông thường. Trường hợp chồng có kết quả tinh dịch đồ: thiếu tinh (theo tiêu chuẩn của WHO 2010).

Sau đó, được chỉ định thực hiện kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm IVF/ICSI.

Người chồng khó thực hiện lấy mẫu tinh dịch có chỉ định trữ lạnh tinh trùng ở lần lấy được mẫu. Tinh trùng được lưu trữ theo phương pháp đông lạnh chậm, cụ thể như sau.

Chồng: 30 tuổi;

Vợ: 28 tuổi.

Cặp đôi tượng này được khám, xét nghiệm, chẩn đoán: vô sinh I (2 năm) do chồng thiếu năng tinh trùng. Tiền sử khó lấy mẫu tinh dịch. Có chỉ định lưu mẫu tinh trùng để thực hiện kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm (IVF/ICSI).

Kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ được thể hiện trong Bảng 2 sau đây.

Bảng 2 – Kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ

Thông số	Kết quả	WHO 2010
Thời gian ly giải	30 phút	15 – 60 phút
Thể tích tinh dịch	1,2ml	$\geq 1,5\text{mL}$
Độ pH	7,5	$\geq 7,2$
Mật độ tinh trùng	10×10^6	$\geq 15 \times 10^6$
Tổng số tinh trùng	12×10^6	$\geq 39 \times 10^6$
Độ di động	15% 30%	PR $\geq 32\%$ (PR+NP) $\geq 40\%$
Hình thái bình thường	10%	$\geq 4\%$
Tỷ lệ sống	50%	$\geq 58\%$
Tế bào lạ	0,66	< 1 triệu tế bào/mL

Mẫu tinh dịch được lưu trữ theo phương pháp đông lạnh chậm sử dụng môi trường bảo quản Spermfreeze – Vitrolife – Thụy Điển.

Các bước lưu trữ như sau.

- Mẫu tinh dịch và môi trường bảo quản Spermfreeze được cho vào ống Nunc (tube Nunc) theo tỷ lệ: 1ml tinh dịch/0,7ml Spermfreeze, để cân bằng trong 10 phút;
- Đặt tube Nunc đựng mẫu vào giá inox của máy Nikool có nitơ lỏng;
- Đặt số 5 trong 5 phút, số 10 trong 20 phút;
- Quay về số 0, rồi cất mẫu vào bình lưu có nitơ lỏng;
- Sau 1 tháng mẫu được rã đông để thực hiện kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm IVF/ICSI.

Các bước rã đông như sau.

- Mẫu sau khi lấy ra khỏi bình nitơ lỏng được để rã đông ở nhiệt độ phòng cho tới khi tan hoàn toàn và được soi trên lam kính, đánh giá kết quả ở phần mềm SCA (cùng phần mềm trước trữ);
- Kết quả mẫu tinh dịch ghi nhận ở các thời điểm trước trữ, sau rã dựa trên các chỉ số được xác định theo các công thức sau đây:

$$CSF_{\text{đi động}} (\%) = \frac{\% \text{ độ di động của tinh trùng sau rã đông}}{\% \text{ độ di động của tinh trùng trước trữ}} \times 100$$

$$CSF_{\text{sống}} (\%) = \frac{\% \text{ tinh trùng sống sau rã đông}}{\% \text{ tinh trùng sống trước trữ}} \times 100$$

$$CSF_{\text{hình thái}} (\%) = \frac{\% \text{ hình thái tinh trùng bình thường sau rã đông}}{\% \text{ hình thái tinh trùng bình thường trước trữ}} \times 100$$

trong đó, CSF: hệ số sống sót sau trữ lạnh (Cryosurvival factor).

Quá trình đánh giá tinh trùng sống dựa trên hình thái: tỷ lệ tinh trùng bắt màu trắng sau khi nhuộm bằng Eosin-Nigrosin theo tiêu chuẩn đánh giá của WHO 2010.

Quá trình đánh giá hình thái tinh trùng bình thường dựa trên phương pháp nhuộm Papanicolaou.

Bảng 3- Kết quả đánh giá

Chỉ số	Trước trữ	Sau rã	Tỷ lệ
CSF _{đi động}	45	20	45%
CSF _{sống}	50	23	46%
CSF _{hình thái}	10%	10%	100%

Thảo luận

Từ kết quả bảng trên, có thể thấy rằng tỷ lệ sống sau rã đông chiếm 45% so với trước trữ, tỷ lệ sống chiếm 46% so với trước trữ đông. Tổng thời gian thực hiện quy trình từ lúc mẫu đã được xử lý để lưu trữ tinh trùng khoảng 40 phút cho một lần thực hiện trữ đông mẫu tinh trùng.

Ví dụ 3: Thực hiện trữ đông và rã đông theo quy trình của giải pháp hữu ích

Tương tự như ví dụ 2 ngoại trừ việc lưu trữ và rã đông được thực hiện theo các quy trình của giải pháp hữu ích như đã được mô tả trên đây.

Quy trình thực hiện khám và chẩn đoán tương tự ví dụ 2, kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ của bệnh nhân như trong bảng 4 sau.

Bảng 4

Thông số	Kết quả	WHO 2010
Thời gian ly giải	35 phút	15 – 60 phút
Thể tích tinh dịch	1,0ml	$\geq 1,5\text{mL}$
Độ pH	7,3	$\geq 7,2$
Mật độ tinh trùng	9×10^6	$\geq 15 \times 10^6$
Tổng số tinh trùng	9×10^6	$\geq 39 \times 10^6$
Độ di động	14% 28%	PR $\geq 32\%$ (PR+NP) $\geq 40\%$
Hình thái bình thường	9%	$\geq 4\%$
Tỷ lệ sống	48%	$\geq 58\%$
Tế bào lạ	0,86	< 1 triệu tế bào/mL

Quy trình trữ và rã đông được thực hiện theo giải pháp hữu ích này, kết quả thu được kết quả như được thể hiện trong bảng 5 sau đây.

Bảng 5

Chỉ số	Trước trữ	Sau rã	Tỷ lệ
CSF _{đi động}	42%	25%	59%
CSF _{sống}	48%	28%	58%
CSF _{hình thái}	9%	9%	100%

Thảo luận

Tiến hành so sánh với kết quả trong Bảng 4 của Ví dụ 2, có thể thấy rằng giải pháp hữu ích không chỉ cho phép lưu trữ mẫu tinh trùng với mật độ thấp hơn, mà tỷ lệ tinh trùng và tỷ lệ tinh trùng di động theo giải pháp hữu ích là cao hơn, cụ thể tỷ lệ tinh trùng di động chiếm 59% so với trước trữ lạnh, chỉ số sống

chiếm 58% so với trước trữ đông. Thời gian thực hiện quy trình trữ đông tính từ thời điểm mẫu đã được xử lý và môi trường đã có sẵn theo giải pháp hữu ích là khoảng 15 phút, thời gian ngắn hơn so với quy trình trữ lạnh bằng đông lạnh chậm. Lượng nitơ lỏng cần để thực hiện quy trình giảm so với quy trình đông lạnh chậm. Bên cạnh đó, thể tích môi trường bảo quản cần sử dụng cũng ít hơn so với phương pháp đông lạnh chậm.

Do đó, có thể thấy rằng, giải pháp hữu ích đã tạo ra hiệu quả kỹ thuật bất ngờ ở việc cho phép trữ đông mẫu tinh trùng có mật độ nhỏ hơn so với mẫu tinh trùng thông thường theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới 2010 (WHO 2010) với kết quả sau rã đông cải thiện tỷ lệ tinh trùng di động và sống so với quy trình thông thường hiện hành.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép trữ đông mẫu tinh trùng số lượng ít (thiểu tinh), cụ thể là cho phép trữ đông mẫu tinh trùng có mật độ nhỏ hơn so với mẫu tinh trùng thông thường theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới 2010 (WHO 2010) với kết quả sau rã đông cải thiện tỷ lệ tinh trùng di động và sống.

Ngoài ra, quy trình theo giải pháp hữu ích không cần thiết bị hạ nhiệt độ, tiết kiệm nitơ lỏng, tiết kiệm (rút ngắn) thời gian, cho phép sử dụng môi trường tự pha đảm bảo chất lượng và tiết kiệm chi phí, từ đó tăng hiệu quả trong các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình bảo quản mẫu tinh trùng số lượng ít bằng phương pháp thủy tinh hóa, không nhằm mục đích phòng ngừa, chẩn đoán, điều trị bệnh, quy trình này bao gồm các bước:

i) chuẩn bị mẫu tinh trùng trước khi bảo quản, trong đó:

tiến hành thu nhận mẫu tinh trùng,

đánh giá chất lượng mẫu tinh trùng để chọn mẫu trước khi tiến hành bảo quản, trong đó mẫu tinh trùng được chọn là mẫu tinh trùng có mật độ nhỏ hơn $15 \times 10^6/\text{mL}$ ($< 15 \times 10^6/\text{mL}$);

ii) xử lý ly tâm mẫu tinh trùng, trong đó:

tiến hành ly tâm mẫu tinh trùng với tốc độ ly tâm là khoảng 1500 vòng/phút trong thời gian khoảng 10 phút, và

loại bỏ dịch nổi để thu được phần cặn tinh trùng đã được ly tâm;

iii) chuẩn bị dung dịch bảo quản, trong đó:

dung dịch bảo quản được chuẩn bị từ các thành phần bao gồm dung dịch F12, glyxerol nồng độ 99,99% theo khối lượng, albumin nồng độ 20% theo khối lượng và dung dịch sucroza 0,1M; và

tỷ lệ thể tích của dung dịch sucroza 0,1M/albumin 20%/glyxerol 99,99%/dung dịch F12 là khoảng 50/5/10,01/34,9;

iv) bổ sung dung dịch bảo quản trong bước iii) vào phần cặn tinh trùng đã được ly tâm trong bước ii), trong đó:

tỷ lệ theo thể tích của phần dung dịch bảo quản/cặn tinh trùng đã ly tâm là khoảng 7/10, và

tiến hành trộn đều, sau đó để ở nhiệt độ phòng trong khoảng 10 phút;

v) chia hỗn hợp thu được trong bước iv) vào trong các ống PCR;

vi) xếp các ống PCR trong bước iv) vào giá đỡ, đặt cách bề mặt nitơ lỏng khoảng 3cm trong 2 phút, sau đó nhúng $\frac{1}{2}$ (nửa) phần đáy ống vào trong nitơ lỏng để tránh nitơ lỏng tràn vào ống trong thời gian khoảng 10 giây;

vii) cho các ống PCR vào ống Cryotube trữ lạnh, đậy nắp kín mà đã được ghi mã số lưu trữ, lưu trữ ống Cryotube trong bình bảo quản chứa nitơ lỏng.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó trong bước i) mẫu được bảo quản trong lọ đựng vô trùng.
3. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước ii) mẫu được chứa trong ống Falcon-BD đáy tròn vô trùng dung tích 5mL để tiến hành ly tâm.
4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước iii) dung dịch sucroza 0,1M được chuẩn bị bằng cách pha sucroza dạng hạt vào nước cất theo tỷ lệ khoảng khối lượng (g)/thể tích (mL) của sucroza/nước cất là khoảng 3,42/100.
5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước iii) dung dịch bảo quản được chuẩn bị từ các thành phần bao gồm dung dịch F12, albumin 20%, glyxerol nồng độ 99,99% và dung dịch sucroza 0,1M bằng cách pha trộn 50 mL của dung dịch sucroza 0,1M, 5mL albumin 20%, 10,01 mL glyxerol 99,99% và 34,9mL dung dịch F12.
6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước v) hỗn hợp thu được trong bước iv) được chia vào trong các ống PCR với lượng khoảng chứa 5µl hỗn hợp này.
7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước vii) ba ống PCR được cho vào một ống Cryotube trữ lạnh để tiến hành bảo quản.