

ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y - DƯỢC

NGUYỄN THỊ HIỆP TUYẾT

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG
CỦA PHÂN MẢNH DNA TINH TRÙNG
VÀ KỸ THUẬT CHỌN LỌC TINH TRÙNG
ĐẾN KẾT QUẢ THỤ TINH TRONG ỐNG NGHIỆM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HUẾ - 2023

ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y - DƯỢC

NGUYỄN THỊ HIỆP TUYẾT

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG
CỦA PHÂN MẢNH DNA TINH TRÙNG
VÀ KỸ THUẬT CHỌN LỌC TINH TRÙNG
ĐẾN KẾT QUẢ THỤ TINH TRONG ỐNG NGHIỆM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Ngành: KHOA HỌC Y SINH

Mã số: 9720101

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS LÊ MINH TÂM

PGS.TS. ĐẶNG CÔNG THUẬN

HUẾ - 2023

Lời Cảm Ơn

Để hoàn thành khóa học và luận án này, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc đến:

- Ban Giám đốc Đại học Huế, Ban Đào tạo Sau Đại học, Đại học Huế
- Ban Giám hiệu Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế
- Ban Giám đốc Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế
- Phòng Đào tạo Sau Đại học, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế
- Viện Y sinh học, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế
- Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế.

Đặc biệt tôi xin gửi lời biết ơn, lời cảm ơn chân thành và sâu sắc nhất đến:

- PGS.TS Lê Minh Tâm - Người Thầy đáng kính - Người Thầy truyền cảm hứng. Thầy đã trực tiếp hướng dẫn với tấm lòng nhiệt tình, tận tụy, đóng góp những ý kiến vô cùng quý báu, hỗ trợ tôi rất nhiều trong chuyên môn, trong nghiên cứu khoa học, cũng như đã dạy bảo tôi những bài học quý giá trong cuộc sống.

- PGS.TS Đặng Công Thuận, cảm ơn Thầy đã trực tiếp dạy tôi trong nghiên cứu khoa học, hướng dẫn tôi thực hiện đề tài.

- GS.TS. Cao Ngọc Thành, Người Thầy đáng kính đã tạo nhiều điều kiện thuận lợi, giúp đỡ tôi trong quá trình học; Thầy đưa ra những góp ý quý báu để tôi hoàn thành luận án. Thầy đã dạy bảo tôi những điều quý giá trong công việc và trong cuộc sống.

Tôi xin trân trọng cảm ơn đến Thầy/Cô: PGS.TS. Hà Thị Minh Thi, TS.BS. Hoàng Thị Mai Thanh, PGS.TS. Phan Thị Minh Phương, TS.BS. Nguyễn Phương Thảo Tiên, TS.BS Lê Phan Minh Triết, cùng quý Thầy Cô các bộ môn ngành Khoa học Y sinh; Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế. Tôi cũng xin trân trọng cảm ơn đến tập thể chuyên viên phối hợp, bác sĩ, điều dưỡng tại Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế đã tạo điều kiện thuận lợi và hỗ trợ tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn Ban Giám hiệu trường Đại học Y Dược, Đại học Thái Nguyên; Khoa Y học cơ sở; Bộ môn Mô – Phôi thai học trường Đại học Y Dược Thái Nguyên nơi tôi đang công tác, đã tạo mọi điều kiện để tôi được học tập và nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời tri ân đến các cặp vợ chồng vô sinh đã tham gia nghiên cứu.

Con xin gửi những tình cảm yêu thương và lòng biết ơn vô hạn đến Bố Mẹ hai bên đã luôn hỗ trợ và động viên con vượt qua mọi khó khăn; xin gửi lời cảm ơn các anh, chị, em trong gia đình đã luôn tin yêu và hỗ trợ. Xin đặc biệt cảm ơn chồng và hai con Khánh và Hà, đã luôn bên cạnh, cùng chia sẻ với tôi, là động lực của tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu, công việc, và trong cuộc sống.

Xin được kính chúc các Thầy, Cô luôn mạnh khỏe và hạnh phúc.

Xin chân thành cảm ơn!

Huế, tháng 4 năm 2023
Nguyễn Thị Hiệp Tuyết



LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu nghiên cứu là trung thực và chính xác, các kết quả nghiên cứu chưa được công bố trong bất kỳ tài liệu khoa học nào và bởi tác giả nào khác. Nếu có gì sai sót tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Tác giả luận án

Nguyễn Thị Hiệp Tuyết

DANH MỤC VIẾT TẮT

AMH	: Anti-Mullerian Hormone – Hormone kháng ống Muller
BMI	: Body Mass Index - Chỉ số khối cơ thể
DNA	: Deoxyribonucleic acid
DFI	: DNA fragmentation Index – Chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng
FSH	: Follicle-stimulating hormone – Hormone kích thích nang noãn
HBA	: Hyaluronic acid binding assay – Kỹ thuật tinh trùng gắn acid hyaluronic
HTSS	: Hỗ trợ sinh sản
hCG	: Human Chorionic Gonadotropin - Hormone hướng sinh dục rau thai người
IVF	: In vitro fertilization – Thụ tinh trong ống nghiệm
ICSI	: IntraCytoplasmic Sperm Injection – Tiêm tinh trùng vào bào tương của noãn
PICSI	: Physiological ICSI – Kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý thực hiện ICSI
MII	: Meiosis II - Giảm phân II
MACS	: Magnetic-activated cell sorting - Phương pháp phân tách tế bào bằng từ tính
NST	: Nhiễm sắc thể
ROS	: Reactive oxygen species – Các gốc oxy hoá hoạt động
TUNEL	: Phương pháp đánh dấu phân mảnh DNA bằng các dUTP

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Đánh giá khả năng sinh sản nam giới	3
1.2. Đặc điểm phát triển phôi thụ tinh trong ống nghiệm	19
1.3. Kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý	32
1.4. Các nghiên cứu liên quan	35
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	44
2.1. Đối tượng nghiên cứu	44
2.2. Phương pháp nghiên cứu	45
2.3. Đạo đức trong nghiên cứu	62
2.4. Sơ đồ nghiên cứu	63
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	66
3.1. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng với các chỉ số tinh dịch đồ, chất lượng phôi và kết quả thụ tinh trong ống nghiệm	66
3.2. Tác động của kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý đến kết quả tạo phôi thụ tinh trong ống nghiệm	82
Chương 4. BÀN LUẬN	93
4.1. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng với các chỉ số tinh dịch đồ, chất lượng phôi và kết quả thụ tinh trong ống nghiệm	93
4.2. Tác động của kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý đến kết quả tạo phôi thụ tinh trong ống nghiệm	110
4.3. Ưu điểm và hạn chế của đề tài	116
KẾT LUẬN	118
KIẾN NGHỊ	120
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	121
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Ngưỡng giá trị tham khảo các thông số tinh dịch đồ theo WHO	5
Bảng 1.2.	Đánh giá tiền nhân của đồng thuận Alpha	20
Bảng 1.3.	Đánh giá phân loại phôi ngày 2 và 3 của đồng thuận Alpha	24
Bảng 1.4.	Đánh giá phôi ngày 4 theo tiêu chuẩn đồng thuận Alpha	25
Bảng 1.5.	Hệ thống đánh giá phôi nang theo tiêu chuẩn đồng thuận Alpha	27
Bảng 2.1.	Đánh giá phân loại phôi nang	59
Bảng 2.2.	Phân loại chất lượng phôi nang	61
Bảng 3.1.	Đặc điểm chung của người vợ	66
Bảng 3.2.	Đặc điểm và nguyên nhân vô sinh	67
Bảng 3.3.	Đặc điểm chung của người chồng	68
Bảng 3.4.	Đặc điểm chỉ số tinh dịch đồ	69
Bảng 3.5.	Đặc điểm phân mảnh DNA tinh trùng	70
Bảng 3.6.	Đặc điểm phân mảnh DNA tinh trùng với một số yếu tố liên quan	71
Bảng 3.7.	Đặc điểm phân mảnh DNA tinh trùng theo nguyên nhân vô sinh	71
Bảng 3.8.	Mối liên quan giữa các chỉ số tinh trùng trong các nhóm phân mảnh DNA tinh trùng	72
Bảng 3.9.	Mối liên quan giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và mật độ tinh trùng	73
Bảng 3.10.	Mối liên quan giữa mức độ phân mảnh DNA và khả năng di động	74
Bảng 3.11.	Mối liên quan giữa mức độ phân mảnh DNA và hình dạng tinh trùng	74
Bảng 3.12.	Mối tương quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và các chỉ số tinh trùng	75
Bảng 3.13.	Mối liên quan giữa phân mảnh DNA và kết quả thụ tinh, phôi ngày 2	76
Bảng 3.14.	Mối tương quan giữa DFI và kết quả thụ tinh và phôi phân chia ngày 2	78
Bảng 3.15.	Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả phôi nang	79
Bảng 3.16.	Mối tương quan giữa DFI và kết quả phôi nang	80
Bảng 3.17.	Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và các nhóm kết quả phôi	80
Bảng 3.18.	Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả chuyển phôi	82
Bảng 3.19.	Đặc điểm chung của người vợ ở kỹ thuật PICSI-ICSI	83
Bảng 3.20.	Đặc điểm chung của người chồng ở kỹ thuật PICSI-ICSI	84

Bảng 3.21.	Đặc điểm mẫu tinh trùng ở kỹ thuật PICSI-ICSI	85
Bảng 3.22.	Đặc điểm của tinh trùng ở mẫu sau lọc rửa	86
Bảng 3.23.	Mối liên quan giữa các chỉ số tinh trùng với khả năng gắn kết acid hyaluronic	86
Bảng 3.24.	Đánh giá mối tương quan giữa khả năng gắn kết acid hyaluronic và các đặc điểm tinh trùng	87
Bảng 3.25.	So sánh kết quả nuôi cấy phôi giữa hai kỹ thuật PICSI và ICSI	88
Bảng 3.26.	So sánh kết quả nuôi cấy phôi giữa hai kỹ thuật PICSI và ICSI ở nhóm hình dạng tinh trùng	89
Bảng 3.27.	So sánh kết quả nuôi cấy phôi giữa hai kỹ thuật PICSI và ICSI ở nhóm tinh trùng di động nhanh – chậm	90
Bảng 3.28.	So sánh kết quả nuôi cấy phôi giữa hai kỹ thuật PICSI và ICSI ở nhóm tinh trùng có phân mảnh DNA thấp - cao	91
Bảng 3.29.	So sánh kết quả nuôi cấy phôi giữa hai kỹ thuật PICSI và ICSI ở nhóm tinh trùng có khả năng gắn kết acid hyaluronic thấp - cao	92
Bảng 4.1.	Một số nghiên cứu về mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và các chỉ số tinh trùng	95
Bảng 4.2.	Tổng hợp kết quả một số nghiên cứu đánh giá mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng kết quả thụ tinh trong ống nghiệm	107

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1.	Đặc điểm phân loại bất thường chỉ số tinh trùng.....	70
Biểu đồ 3.2.	Phân nhóm mức độ phân mảnh DNA tinh trùng	71
Biểu đồ 3.3.	Tỉ lệ mức độ phân mảnh DNA tinh trùng trong nhóm tinh trùng bình thường và bất thường	73
Biểu đồ 3.4.	Kết quả sau chuyển phôi ở các nhóm phân mảnh DNA tinh trùng	81

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Đánh giá tinh trùng sống/chết bằng phương pháp nhuộm eosin – nigrosin	6
Hình 1.2.	Các đặc điểm hình dạng bất thường của tinh trùng	7
Hình 1.3.	Sơ đồ cấu trúc DNA tinh trùng	9
Hình 1.4.	Tinh trùng không phân mảnh và phân mảnh trong các xét nghiệm Alkaline Comet và Neutral Comet	16
Hình 1.5.	Hình ảnh mô tả nguyên lý của phương pháp khảo sát cấu trúc chất nhuộm sắc tinh trùng	17
Hình 1.6.	Hình ảnh mô tả nguyên lý phương pháp TUNEL	18
Hình 1.7.	Hình ảnh tinh trùng trong phương pháp khảo sát sự phân tán chất nhuộm sắc	19
Hình 1.8.	Đánh giá sự thụ tinh với các hình thái của hợp tử	21
Hình 1.9.	Phôi phân chia ngày 3 chất lượng tốt	23
Hình 1.10.	Phôi ngày 4	25
Hình 1.11.	Hình thái phôi nang	28
Hình 1.12.	Tinh trùng trưởng thành có thụ thể gắn acid hyaluronic ở màng và tinh trùng chưa trưởng thành	33
Hình 1.13.	Minh họa sự gắn kết acid hyaluronic của tinh trùng ở đĩa PICSI	34
Hình 2.1.	Bộ Kit Halosperm.....	52
Hình 2.2.	Hình ảnh tinh trùng trong xét nghiệm phân tán chất nhuộm sắc.....	54
Hình 2.3.	Vị trí các vi điểm acid hyaluronic và sơ đồ giọt môi trường trong PICSI	57
Hình 2.4.	Đánh giá hình ảnh phôi giai đoạn phân chia	58
Hình 2.5.	Các hình thái phôi nang.....	60

DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 2.1.	Sơ đồ nghiên cứu mục tiêu 1	63
Sơ đồ 2.2.	Sơ đồ kết quả theo dõi sau chuyển phôi	64
Sơ đồ 2.3.	Sơ đồ kết quả nuôi cấy phôi của kỹ thuật PICSI và ICSI	65

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, hơn 15% các cặp vợ chồng trên toàn thế giới gặp vấn đề về khả năng sinh sản và 50% các trường hợp này liên quan đến yếu tố nam [22]. Chẩn đoán vô sinh nam chủ yếu dựa vào kết quả tinh dịch đồ do Tổ chức Y tế thế giới đưa ra, nhưng các tiêu chuẩn này có giá trị chẩn đoán hạn chế vì tỷ lệ lớn nam giới có chất lượng tinh dịch đồ bình thường nhưng vẫn bị vô sinh do bất thường chức năng tinh trùng [13]. Điều này cho thấy sự hiện diện của các yếu tố bên trong tế bào không thể xác định bằng phân tích tinh dịch thông thường và yếu tố này có vai trò quan trọng trong khả năng sinh nam [8].

Thành phần hạt nhân của tinh trùng, đặc biệt là DNA (Deoxyribonucleic acid) của tinh trùng, rất cần thiết cho sự thụ tinh bình thường, làm tổ, mang thai và phát triển của bào thai. Xét nghiệm đánh giá mức độ phân mảnh DNA tinh trùng có ý nghĩa trong chẩn đoán, xác định nguyên nhân vô sinh nam. Trong số những nam giới vô sinh không rõ nguyên nhân, tỉ lệ phân mảnh DNA tăng cao được tìm thấy ở 20% trường hợp [50], [53], [65] ... Một số nghiên cứu cho thấy phân mảnh DNA tinh trùng có liên quan đến chất lượng phôi, sự phát triển thai sau chuyển phôi [29], [31], [110], [169], ... Tuy nhiên, có báo cáo không tìm thấy mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng với tỉ lệ phôi phân chia giai đoạn ngày 2 ngày 3, tỉ lệ hình thành phôi chất lượng tốt [162]; Phân mảnh DNA tinh trùng không ảnh hưởng đáng kể đến tỉ lệ thụ tinh, thai lâm sàng, sảy thai hoặc thai tiến triển, phân mảnh DNA tinh trùng không làm tăng nguy cơ thai chết lưu hoặc tử vong sơ sinh [38]. Như vậy, có sự chưa thống nhất về sự ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng đến kết quả thụ tinh trong ống nghiệm. Ở Việt Nam, còn ít nghiên cứu đánh giá mối tương quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và chất lượng phôi thực hiện với kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn [4], [14], các nghiên cứu này thực hiện ở cỡ mẫu nhỏ và chưa có những đánh giá chi tiết về chất lượng của phôi. Do đó cần có nghiên cứu tiếp theo cung cấp thêm dữ liệu khoa học về mối liên quan của phân mảnh DNA tinh trùng đến chất lượng phôi theo từng giai đoạn phát triển, đánh giá ở cặp vợ chồng vô sinh tại Việt Nam.

Trong kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn việc lựa chọn tinh trùng còn mang tính chủ quan, không nhận biết và loại bỏ được tinh trùng bị phân mảnh

DNA dẫn đến nguy cơ ảnh hưởng đến kết quả thụ tinh trong ống nghiệm [82]. Chọn lọc tinh trùng sinh lý là kỹ thuật thu nhận được tinh trùng trưởng thành, dựa trên đặc điểm màng bào tương phần đầu tinh trùng trưởng thành có thụ thể đặc hiệu với acid hyaluronic (thành phần có ở chất nền tế bào hạt bao quanh noãn). Tinh trùng chưa trưởng thành không có khả năng gắn kết với acid hyaluronic, có hình dạng bình thường hoặc bất thường, dễ bị tác động bởi các yếu tố nguy cơ dẫn đến phân mảnh DNA [74]. Kỹ thuật chọn lọc tinh trùng có thể tối ưu hóa kết quả tiêm tinh trùng vào bào tương noãn bằng cách chọn được tinh trùng trưởng thành, không bị phân mảnh DNA giúp cải thiện kết quả phôi thụ tinh trong ống nghiệm [34], [36], [115]. Tuy nhiên, hiện nay chưa nhiều nghiên cứu phân tích hiệu quả giữa kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý và chọn lọc tinh trùng thường quy để tiêm tinh trùng vào bào tương noãn, ở Việt Nam hiện tại chỉ có 1 báo cáo về ứng dụng kỹ thuật này [3].

Tại trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế, trong quá trình khám và điều trị cặp vợ chồng vô sinh có nhiều mẫu tinh trùng có mức độ phân mảnh DNA cao. Chúng tôi thực hiện nghiên cứu với mong muốn tìm hiểu phân mảnh DNA tinh trùng ảnh hưởng như thế nào tới khả năng thụ tinh, chất lượng phôi qua các giai đoạn và kết quả chuyên phôi? Bên cạnh đó, với mong muốn mang đến kết quả điều trị tốt nhất cho các cặp vợ chồng vô sinh, chúng tôi áp dụng kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý để tiêm tinh trùng vào bào tương noãn. Nghiên cứu sẽ chứng minh kỹ thuật mới này tác động như thế nào đến khả năng tạo phôi? Kết quả của nghiên cứu sẽ bổ sung thêm dữ liệu khoa học trong lĩnh vực vô sinh nam cũng như ứng dụng kỹ thuật mới trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản. Với những câu hỏi nghiên cứu trên chúng tôi tiến hành đề tài: **“Nghiên cứu ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng và kỹ thuật chọn lọc tinh trùng đến kết quả thụ tinh trong ống nghiệm”**

Với mục tiêu:

- 1. Xác định mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng với các chỉ số tinh dịch đồ, chất lượng phôi và kết quả thụ tinh trong ống nghiệm.*
- 2. Đánh giá tác động của kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý đến kết quả tạo phôi thụ tinh trong ống nghiệm.*

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH SẢN NAM GIỚI

Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), một cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh sản, được gọi là vô sinh khi sống cùng nhau trên một năm, quan hệ tình dục đều đặn và không dùng biện pháp tránh thai mà vẫn không có thai. Khi người vợ trên 35 tuổi trở lên, khoảng thời gian này được quy ước là 6 tháng [10], [159]. Các dữ liệu thu được cho thấy khoảng 30 – 40% các trường hợp vô sinh do nguyên nhân nam giới đơn thuần, 40% do nữ giới, 10% do kết hợp cả nam và nữ, và 10% trường hợp không rõ nguyên nhân [10], [21]. Bất thường tinh trùng đóng vai trò là nguyên nhân trong 50% các trường hợp vô sinh. Hội niệu học Hoa Kỳ và Hiệp hội Sinh Sản Hoa Kỳ đều thống nhất rằng việc đánh giá tiền sử, thăm khám lâm sàng và chỉ định tinh dịch đồ trên nam giới của cặp vợ chồng vô sinh là rất quan trọng để xác định nguyên nhân từ nam giới [10].

Tinh dịch đồ là một xét nghiệm nhằm đánh giá chất lượng của tinh trùng, thông qua các chỉ số như số lượng, khả năng di động, hình dạng bình thường... mặc dù không cung cấp các thông tin về hoạt động chức năng của tinh trùng, dựa vào kết quả của một tinh dịch đồ, người ta có thể đánh giá một cách khái quát về khả năng sinh sản của nam giới [21]. Các trung tâm hỗ trợ sinh sản (HTSS) và các phòng xét nghiệm đánh giá tinh dịch đồ dựa theo cẩm nang của WHO, phiên bản đầu tiên được phát hành vào 1980, các trung tâm đang thực hiện theo hướng dẫn của phiên bản thứ năm (WHO, 2010) [161], và gần đây năm 2021 là phiên bản thứ 6, với hướng dẫn phân tích tinh dịch cơ bản giống phiên bản trước và có bổ sung thêm các hướng dẫn đánh giá chức năng tinh trùng [160].

1.1.1. Xét nghiệm tinh dịch đồ

Đây là phương pháp khảo sát chất lượng tinh trùng thường được áp dụng trong thực tế đánh giá khả năng sinh sản nam.

1.1.1.1. Đánh giá đại thể

Sự ly giải, độ nhót

Tinh dịch sau khi phóng tinh sẽ tự hoá lỏng ở nhiệt độ 37°C, hiện tượng này được gọi là sự ly giải. Thời gian ly giải bình thường trong khoảng 15 phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm hoặc tủ ấm 37°C, ít khi thời gian ly giải quá 60 phút. Hiện tượng ly giải chủ yếu do các men fibrinolysin và aminopeptidase của tuyến tiền liệt phân hủy fibrin, hoá lỏng tinh dịch để giải phóng tinh trùng. Thời gian ly giải lâu hoặc không ly giải thường do sự bất thường của tuyến tiền liệt. Độ nhót bình thường khi giọt tinh dịch nhỏ rời rạc từng giọt, độ nhót được xem là cao khi giọt tinh dịch kéo dài trên 2cm. Độ nhót cao thường là do bất thường những thành phần trong tinh dịch từ các tuyến phụ tiết ra [160], [161]

Thể tích

Trong mẫu sau khi xuất tinh sẽ bao gồm tinh trùng và tinh tương. Khoảng 90% tinh dịch là sản phẩm của các tuyến sinh dục, trong đó, chiếm phần lớn là từ túi tinh và tuyến tiền liệt, 1% còn lại là do tinh hoàn, mào tinh và tuyến hành niệu đạo tiết ra. Đo lường chính xác thể tích tinh dịch rất quan trọng vì số liệu này ảnh hưởng đến cách tính tổng số tinh trùng và tổng số tế bào lạ trong một lần xuất tinh.

Thể tích tinh dịch được tính bằng mL với giá trị theo chuẩn tối thiểu là 1,5mL. Thể tích tinh dịch nhiều thường thấy ở những người có thời gian kiêng xuất tinh lâu, trường hợp bán tắc đường dẫn tinh thường thấy thể tích tinh dịch rất ít, trường hợp không có tinh dịch, thường do tắc nghẽn hoặc do xuất tinh ngược dòng [160], [161].

pH tinh dịch

pH được đo vào thời điểm nhất định ở 30 phút đến không quá 1 giờ sau khi xuất tinh. Nhỏ 10µl tinh dịch lên giấy chỉ thị màu, so màu theo bảng mẫu và xác định pH của tinh dịch. Thời gian xác định pH nên tiến hành trong vòng 30 giây, vì tinh dịch có thể bị oxy hoá khi để ngoài không khí sẽ làm thay đổi độ pH. Ngoài ra, có thể đo pH bằng các loại máy hiện có trên thị trường (ví dụ máy HORIBA LAQUA PH1100). Phương pháp đo bằng máy có ưu điểm sẽ cho kết quả pH chính xác đến hàng thập phân và hạn chế nhiễm bẩn khi dùng giấy quỳ. Nhược điểm là máy đo pH có giá thành đắt hơn so với giấy quỳ, phải thường xuyên hiệu chỉnh và thời gian đo mẫu sẽ lâu hơn [12].

Hiện còn nhiều tham khảo về pH của tinh dịch, trong khi chờ đủ dữ liệu về giá trị ngưỡng thấp nhất, giá trị pH tối thiểu là 7,2 vẫn giữ như trước đây theo khuyến cáo của WHO (2010) [161]. pH thay đổi tùy thuộc vào dịch tiết của tiền liệt tuyến có tính acid và dịch tiết mang tính kiềm của túi tinh. pH dưới 7 thường thấy trong trường hợp không tinh trùng có thể do tắc hoặc không có ống dẫn tinh hai bên [160], [161].

Bảng 1.1. Ngưỡng giá trị tham khảo các thông số tinh dịch đồ theo WHO

Thông số	WHO 2010 [161]	WHO 2021 [160]
Thể tích (mL)	1,5	1,4
Mật độ ($\times 10^6/\text{mL}$)	15	16
Tổng số tinh trùng ($\times 10^6$)	39	39
Tỉ lệ tinh trùng di động (%)	40	42
Tỉ lệ tinh trùng di động tiến tới (%)	32	30
Tỉ lệ sống (%)	58	54
Tỉ lệ hình dạng bình thường (%)	4	4

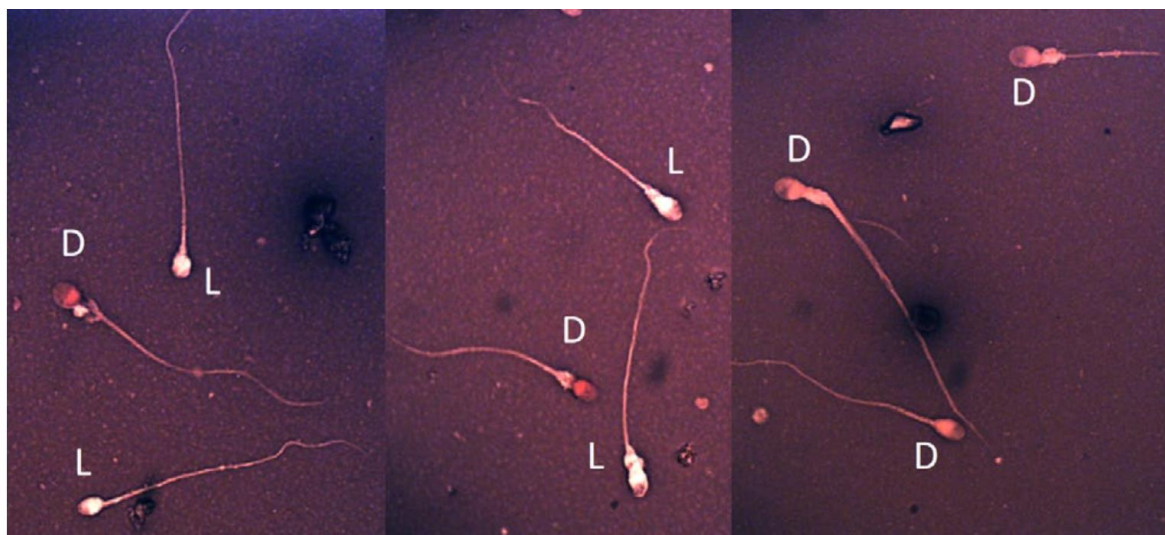
1.1.1.2. Đánh giá vi thể

Độ di động

Độ di động được khảo sát bằng cách quan sát sự di động tự nhiên của tinh trùng, sau đó tính tỉ lệ giữa tinh trùng di động trên tổng số tinh trùng quan sát và được thể hiện bằng phần trăm. Tỉ lệ di động tiến tới của tinh trùng được xác định có liên quan tới tỉ lệ có thai, do đó cần được đánh giá một cách chính xác. Khả năng di động của tinh trùng có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như tuổi và tình trạng sức khỏe của người nam. Các yếu tố như thời gian kiêng giao hợp, cách lấy mẫu, thời gian từ lúc xuất tinh đến khi thực hiện khảo sát cũng có thể ảnh hưởng đến kết quả. Di động của tinh trùng nên được đánh giá ngay sau khi tinh dịch ly giải hoàn toàn, trong vòng 30 phút nhưng không quá một giờ sau khi xuất tinh. Tinh trùng được chia thành 4 nhóm: Tinh trùng di động tiến tới nhanh (A) và chậm (B), (với tốc độ tiến tới $>25\mu\text{m}/\text{giây}$ cho tinh trùng loại A, tiến tới chậm hơn cho tinh trùng loại B); tinh trùng di động tại chỗ (C) và tinh trùng bất động (D) [160], [161].

Tỉ lệ sống của tinh trùng

Xác định tình trạng sống/chết của tinh trùng dựa vào các tinh trùng sống có màng tế bào còn nguyên vẹn. Sự toàn vẹn của màng tế bào sẽ ngăn cản sự xâm nhập của các thuốc nhuộm vào bên trong tinh trùng. Trong khi đó, những tinh trùng chết sẽ bị thấm màu của thuốc nhuộm. Nhiều phương pháp nhuộm có thể được sử dụng như nhuộm eosin đơn thuần, trypan blue hay eosin – nigrosin [160], [161].



Hình 1.1. Đánh giá tinh trùng sống/chết bằng phương pháp nhuộm eosin – nigrosin (*L* – tinh trùng sống; *D* – tinh trùng chết) [160]

Mật độ tinh trùng

Khả năng sinh tinh trùng của tinh hoàn cũng như sự thông suốt của ống dẫn tinh có thể được ước lượng thông qua tổng tinh trùng trong một lần xuất tinh. Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu cho thấy tổng tinh trùng trong một lần xuất tinh và mật độ tinh trùng liên quan đến tỉ lệ có thai và là cơ sở để tiên lượng khả năng có thai. Các loại buồng đếm có thể được sử dụng trong xác định mật độ tinh trùng là buồng đếm Neubauer, buồng đếm Makler hay Microcell [160], [161].

Hình dạng tinh trùng

Tinh trùng được xác định là có hình dạng bình thường khi đầu, cổ, phần giữa và đuôi đều bình thường. Đầu tinh trùng có hình bầu dục với đường nét rõ ràng, dài 4,5–5 μm , rộng 2,5–3,5 μm . Bên trong, cực đầu chiếm 40% -70% so với thể tích vùng đầu. Cực đầu không có không bào lớn hoặc không có nhiều hơn hai không bào nhỏ và không chiếm quá 20% thể tích vùng đầu, vùng sau cực đầu không chứa bất

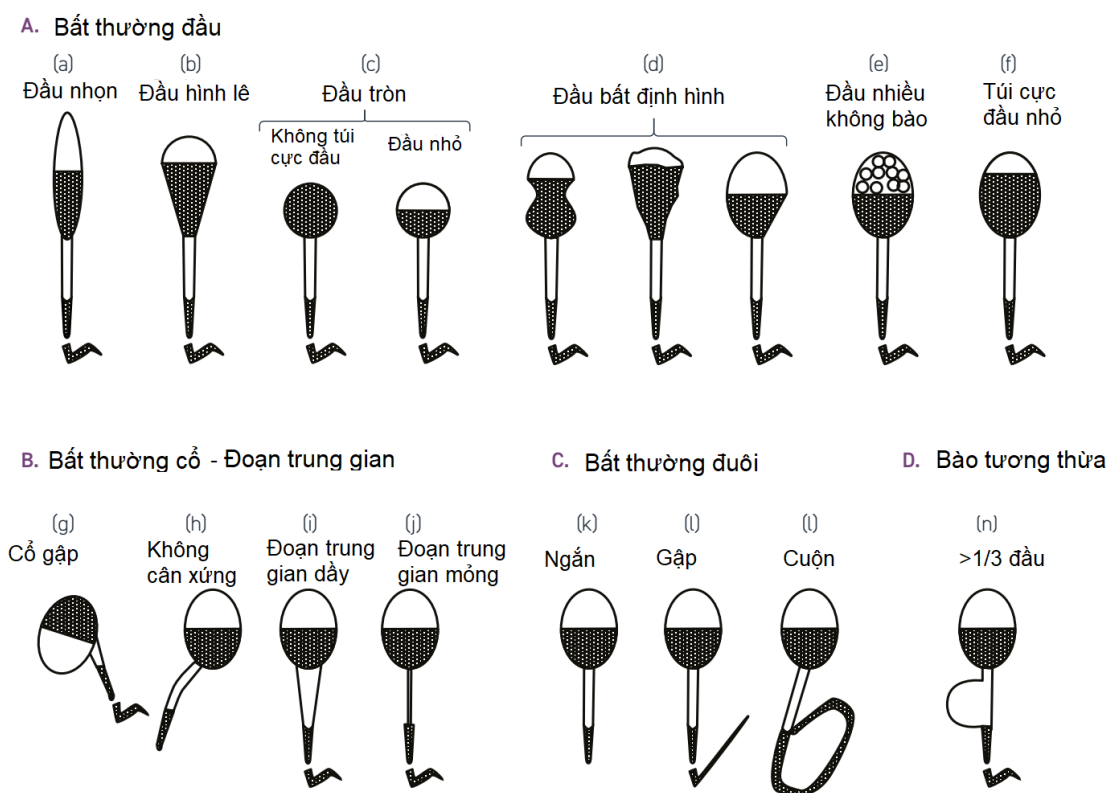
cứ không bào nào [12]. Phần giữa được xem là bình thường khi thon, bề ngang khoảng $0,5-0,7\mu\text{m}$, dài $3,3-5,2\mu\text{m}$, gắn thẳng trục với đầu. Tế bào chất dư thừa (giọt bào tương cổ) $<1/3$ so với kích thước đầu bình thường (tinh trùng trưởng thành không còn thấy phần tế bào chất dư thừa). Ngoài ra, đuôi phải thẳng, đều, thon hơn phần giữa, không cuộn, dài khoảng $45-50\mu\text{m}$ (gấp 10 lần chiều dài đầu) [160], [161]. Hình thái tinh trùng bất thường được mô tả như sau:

Bất thường đầu: Đầu to, đầu nhỏ, hình lê, hình nền, đầu tròn, đầu có hình dạng bất định, đầu có không bào (nhiều hơn hai không bào nhỏ hay một không bào lớn hơn 20% vùng đầu), hai đầu, không bào ở vùng sau cực đầu, cực đầu nhỏ hoặc quá lớn (nhỏ hơn 40% hoặc lớn hơn 70% vùng đầu)

Bất thường cổ và phần giữa: cổ gấp, phần giữa nối với đầu bị lệch, dày không đều.

Bất thường đuôi: đuôi ngắn, đuôi gãy, cong, đuôi hình kẹp tóc, nhiều đuôi, chiều dày đuôi không đều, đuôi cuộn.

Tế bào chất dư thừa (giọt bào tương cổ): bào tương còn sót lại nằm ở phần giữa, kích thước hơn hơn $1/3$ thể tích đầu [12], [161].



Hình 1.2. Các đặc điểm hình dạng bất thường của tinh trùng [160]

1.1.2. Xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng

Tinh trùng mang một nửa bộ nhiễm sắc thể (NST) của người nam, cùng kết hợp với noãn trong quá trình thụ tinh để tạo thành phôi. Do đó, việc đảm bảo tính nguyên vẹn vật chất di truyền của tinh trùng là vô cùng quan trọng [12]. Phương pháp phân tích tinh dịch thường quy chưa dự đoán chính xác khả năng sinh sản nam, do đó cần có các xét nghiệm nâng cao về chức năng của tinh trùng. Trong các xét nghiệm được đề xuất, đánh giá mức độ phân mảnh DNA của tinh trùng hiện đang được áp dụng phổ biến [159].

1.1.2.1. Cấu tạo DNA tinh trùng

Tinh trùng người là một đơn vị có tổ chức cao, NST tinh trùng được đóng gói rất chặt chẽ, kích thước nhỏ chỉ bằng 1/6 kích thước NST ở tế bào sinh dưỡng và trợ về mặt hóa học để bảo toàn cấu trúc cũng như chức năng trong suốt quá trình tạo tinh trùng trưởng thành và di chuyển trong cơ quan sinh dục nam và nữ. NST của tinh trùng được cấu tạo thành 3 vùng cấu trúc: (1) phần lớn DNA tinh trùng xoắn cuộn và liên kết với protamine tạo thành cấu trúc toroid, mỗi toroid chứa khoảng 50kb DNA; (b) một phần nhỏ DNA liên kết với histone tạo cấu trúc lỏng lẻo hơn, (3) phần DNA còn lại liên kết với chất nền nhân tinh trùng [58].

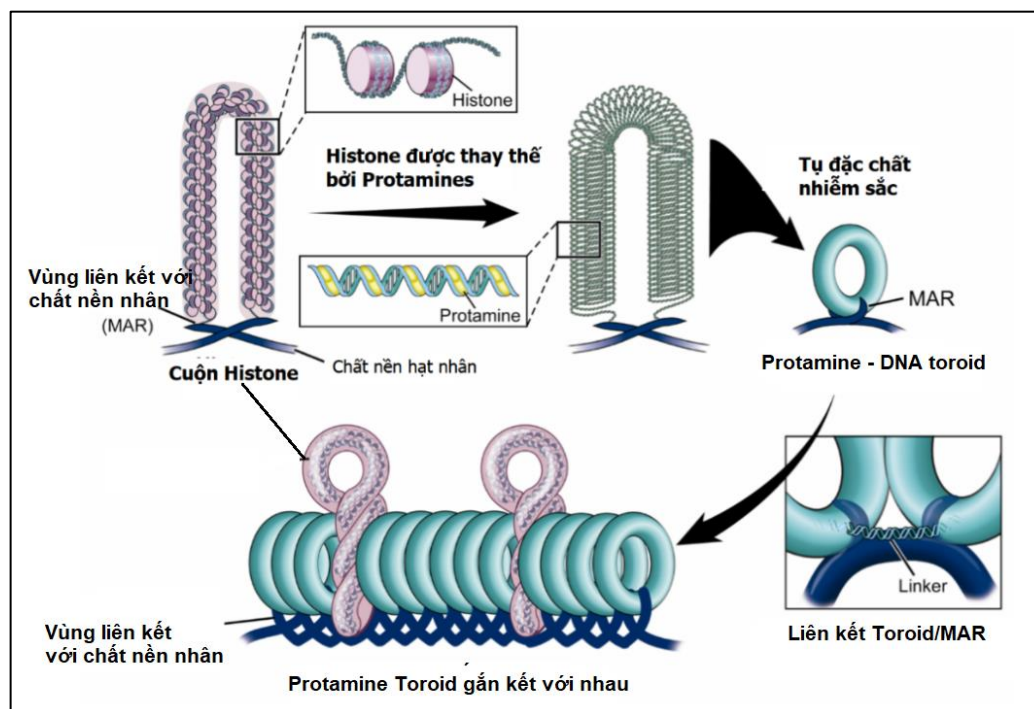
Liên kết giữa protamine với DNA – cấu trúc toroid

Điểm khác biệt lớn giữa đóng gói cấu trúc NST nhân tế bào sinh dưỡng và tinh trùng chính là các phân tử protamine chỉ hiện diện trong nhân tế bào tinh trùng. Giai đoạn chuyển đổi từ các histone thành protamine đóng vai trò quan trọng trong quá trình trưởng thành của tinh trùng, ở nhân tế bào tinh trùng có khoảng 85% histone chuyển thành protamine. Trong suốt quá trình trưởng thành của tinh trùng, hầu hết protein histone liên kết với DNA được thay thế bởi protamine. Protamine chứa gốc arginine mang điện tích dương sẽ trung hòa điện tích âm của gốc phosphate trên DNA. Liên kết ion sẽ làm giảm lực đẩy khung DNA, tăng cường lực liên kết giữa DNA và protamine, cho phép NST tinh trùng tăng gấp đôi sự gấp cuộn, xoắn cực đến cực đại, hình thành cấu trúc toroid, giúp DNA tinh trùng thoát khỏi tác động của enzyme nuclease. Tất cả sự sắp xếp này sẽ tạo ra một phức hợp trung tính, không bị hòa tan, và không dễ bị tổn thương [156]. Sự xoắn cuộn DNA được xem như một cơ chế kiểm soát sự biểu hiện của gene. Quá trình xoắn cuộn sẽ ngăn sự phiên mã, làm

cho các gene không biểu hiện suốt quá trình sinh tinh. Chỉ khi tinh trùng xâm nhập vào noãn, protamine được thay thế hoàn toàn bởi cấu trúc protamine toroid sẽ giúp bảo vệ DNA của tinh trùng khi di chuyển trong đường sinh dục nữ để thụ tinh thành công mà không đóng vai trò trong sự phát triển của phôi [143].

Liên kết giữa histone với DNA

Dạng cấu trúc DNA phổ biến thứ hai là DNA gắn với histone. Khoảng 4% DNA trong tinh trùng trưởng thành liên kết với histone. Các nghiên cứu gần đây chứng minh rằng các trình tự DNA liên kết với histone còn lại trong nhân tinh trùng trưởng thành bao gồm các vùng gene khởi động phiên mã, trình tự DNA vùng talomere, gene mã hóa cho chuỗi epsilon và gamma globin, các cụm gene phiên mã micro RNA và đặc biệt các gene điều hòa biểu hiện dịch mã cho các protein quan trọng trong giai đoạn phát triển sớm của phôi [68]. Toàn bộ các vùng gene đặc trưng cho quá trình sinh tinh và thụ tinh cũng được xác định là liên kết với histone trong NST của tinh trùng; những vùng gene này dễ bị ảnh hưởng bởi hoạt động của enzyme nuclease [25]. Hơn nữa, histone trong DNA tinh trùng không được thay thế bởi thành phần nào trong noãn sau thụ tinh, nên bất cứ tổn thương nào có liên quan đến histone sẽ được di truyền trực tiếp cho phôi mà không được phát hiện và không sửa chữa, gây ảnh hưởng lớn đến thế hệ sau [25], [153].



Hình 1.3. Sơ đồ cấu trúc DNA tinh trùng [143].

Liên kết giữa DNA với chất nền nhân tinh trùng

Hình thức thứ ba của cấu tạo DNA tinh trùng là vùng liên kết chất nền hạt nhân, là các đoạn DNA liên kết vùng xoắn cuộn của NST gắn các miền vòng lặp của chất nhiễm sắc vào chất nền nhân tinh trùng. Vùng này nằm giữa mỗi vòng protamine neo các vòng vào vị trí, được gọi là các liên kết hình xuyên [139]. Các liên kết này chứa histone và do đó nhạy cảm với hoạt động của enzyme nuclease. Ngoài vai trò liên kết giữa DNA và chất nền hạt nhân, vùng liên kết còn có chức năng như một điểm kiểm tra tính toàn vẹn DNA tinh trùng sau khi thụ tinh. Sự duy trì cấu trúc ổn định của chất nền nhân tinh trùng sau khi được thụ tinh và sự liên kết với DNA có vai trò quan trọng, giúp kích hoạt và thúc đẩy tiến trình tái hoạt hóa bộ gene di truyền cho chu kỳ sao chép DNA đầu tiên của tiền nhân tinh trùng ngay khi gặp tiền nhân của noãn trong giai đoạn thụ tinh. Các vùng DNA liên kết với chất nền nhân mã hóa cho các protein đóng vai trò thiết yếu trong quá trình điều hòa biểu hiện của gene, quá trình sao chép DNA và sắp xếp tổ chức lại thứ tự cấu trúc NST trong cả giai đoạn sinh tinh và giai đoạn sau thụ tinh [143].

1.1.2.2. Đặc điểm và nguyên nhân phân mảnh DNA tinh trùng

Sự phân mảnh DNA là sự đứt gãy mạch DNA đơn và mạch DNA đôi. Nguyên nhân của sự phân mảnh DNA tinh trùng là đa yếu tố và có thể được chia thành các yếu tố bên trong và bên ngoài [173]. Nguyên nhân đầu tiên xuất hiện từ cấp độ phân tử, một số nguyên nhân bệnh sinh hình thành trong quá trình sinh tinh dẫn đến sự phân mảnh DNA. Những nguyên nhân ngoại sinh có thể gây ra trực tiếp hoặc thúc đẩy hiện tượng đứt gãy. Có 3 nhóm nguyên nhân chính dẫn đến phân mảnh DNA tinh trùng, những nguyên nhân này có thể xảy ra trong quá trình sinh tinh hay trong khi tinh trùng di chuyển trong đường sinh dục nam và nữ [49], các nguyên nhân bao gồm:

Phân mảnh DNA trong quá trình sinh tinh

Quá trình biệt hóa trưởng thành tinh trùng và sự thay thế histone-protamine trong giai đoạn này là sự phá vỡ DNA sinh lý. Hầu hết cấu trúc NST tinh trùng được hình thành trong quá trình biệt hóa trưởng thành tinh trùng, do đó quá trình này rất quan trọng đối với tính toàn vẹn di truyền của các tinh trùng đang phát triển

[91]. Sự thay đổi cấu trúc và sự hình thành của các cuộn xoắn ở giai đoạn đặc biệt, áp lực tạm thời được giải phóng bằng phân mảnh DNA.

Những phân mảnh này dẫn đến thay thế các lõi histone của nucleosome bằng các protein chuyển tiếp và phân tán trong quá trình biệt hóa trưởng thành tinh trùng. Những phân mảnh được tạo ra bởi các nuclease nội sinh (topoisomerase II) và được tìm thấy trong các tinh tử và tinh tử đang kéo dài [69]. Do đó, các chuỗi DNA bị đứt trong quá trình sửa chữa NST là một phần của quá trình biệt hóa bình thường của tinh trùng. Bất kỳ sự thay đổi nào trong quá trình trao đổi protein dẫn đến việc tái cấu trúc NST có thể dẫn đến mất tính toàn vẹn của NST tinh trùng. Sự xuất hiện hiện tượng phá vỡ DNA nội sinh trong tinh trùng có thể chỉ ra sự bất thường trong quá trình sinh tinh và quá trình trưởng thành không hoàn chỉnh [91].

Chết tế bào theo chương trình không hoàn toàn của tế bào mầm sinh dục

Chết tế bào theo chương trình được định nghĩa là chết tế bào được lập trình và có sự kiểm soát cao, phổ biến trong mọi loại tế bào trong các sinh vật đa bào. Đó là một quá trình sinh lý và vai trò của nó là loại bỏ các tế bào bất thường và kiểm soát sự phát triển quá mức của tế bào. Nhờ chết theo chương trình, sự cân bằng giữa sinh sản tế bào và chết tế bào được thiết lập. Chết theo chương trình của tế bào mầm tinh hoàn xảy ra bình thường trong suốt cuộc đời và cần thiết để giới hạn số lượng tế bào mầm. Sự bất thường trong quá trình này có thể dẫn đến xuất hiện phân mảnh DNA ở những tinh trùng được hình thành từ tế bào mầm đã thoát khỏi quá trình chết theo chương trình [30].

Con đường chết theo chương trình sớm, bắt đầu từ tinh nguyên bào và tinh bào, có liên quan đến con đường tín hiệu chết theo chương trình đầu tiên. Các tế bào Sertoli chế tiết phối tử tín hiệu chết theo chương trình, bằng cách liên kết với thụ thể bắt đầu phản ứng xếp tầng dẫn đến kích hoạt các enzyme caspase và loại bỏ các tế bào dòng tinh được đánh dấu bằng thực bào [131]. Tuy nhiên, nếu cơ chế này hoạt động không hiệu quả, một số tế bào mầm bị lỗi có thể thoát khỏi chết theo chương trình và bước vào quá trình tạo tinh trùng sau đó vẫn được xuất tinh. Khi quá trình chết theo chương trình diễn ra không hoàn toàn hay không được diễn ra, tinh trùng mang dấu hiệu của quá trình chết theo chương trình như phân mảnh DNA vẫn có thể

tồn tại, tiếp tục trưởng thành, có hình thái hoàn toàn bình thường nhưng DNA tổn thương khi gặp noãn có thể dẫn đến các nguy cơ như không thụ tinh, phôi phát triển bất thường, sảy thai, và trẻ sau sinh mắc các bệnh do đột biến gene [132].

Hậu quả của việc tiếp xúc với các gốc oxy hóa hoạt động (Reactive oxygen species – ROS).

Yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của DNA tinh trùng là sự có mặt các chất oxy hóa dẫn đến tình trạng stress oxy hóa [12]. Ở mức độ thấp, ROS đóng một vai trò quan trọng trong sự trưởng thành của tinh trùng và các chức năng như hoạt hóa tinh trùng, giúp tinh trùng xảy ra phản ứng acrosome, và giúp bảo vệ DNA tinh trùng. Tuy nhiên, khi một lượng ROS quá mức được tạo ra vượt quá khả năng chống oxy hóa trong đường sinh sản nam, kết quả gây ra là tổn thương DNA tinh trùng. Mức độ tăng ROS đã được báo cáo trong tinh dịch của khoảng 25% nam giới vô sinh [155]. Cứ tăng 25% lượng ROS trong tinh dịch thì tỉ lệ phân mảnh DNA tinh trùng tăng 10%. Do đó, các nghiên cứu về sự phân mảnh DNA tinh trùng đều cho thấy nam giới vô sinh luôn có mức độ stress oxy hóa cao hơn so với nhóm có khả năng sinh sản bình thường [12].

Bào tương ở những tế bào thông thường khác chứa một lượng lớn các enzyme có khả năng chống chất oxy hóa, tuy nhiên phần bào tương trong tinh trùng rất ít dẫn đến tinh trùng rất dễ bị tấn công bởi các chất oxy hóa. Đặc biệt, lipid màng tinh trùng dễ bị mất cân bằng oxy hóa vì có rất nhiều axid béo không bão hòa đa nối đôi, dẫn đến gây ảnh hưởng đến các protein gắn noãn ở màng tinh trùng. Đặc tính dễ bị tác động bởi các chất oxy hóa hơn khi tinh trùng tự tạo ra các loại gốc tự do oxy hóa để thúc đẩy sự gia tăng phosphoryl tyrosine liên quan đến năng lực hóa tinh trùng. Tuy nhiên, vai trò tích cực này đối với ROS bị đảo ngược khi tinh trùng bị mất cân bằng oxy hóa. Để chống lại với mất cân bằng oxy hóa, tinh trùng chỉ có enzyme đầu tiên trong con đường sửa chữa cắt bỏ base, DNA glycosylase 8-oxoguanine, enzyme này xúc tác cho sự hình thành các vị trí cơ sở, do đó làm mất ổn định khung dọc DNA và tạo ra các phân mảnh sợi DNA [24].

Các nguồn chính của ROS trong tinh dịch là bạch cầu và tinh trùng, đặc biệt là tinh trùng chưa trưởng thành và đầu bất thường được đặc trưng bởi tế bào chất còn

sót lại. Tinh tử trước khi biệt hóa thành tinh trùng trưởng thành phải loại bỏ túi bào tương dư thừa ở vùng cổ, ROS sẽ được tạo thành trong quá trình này. Những tinh trùng dị dạng hoặc tinh trùng non thường vẫn còn bào tương ở vùng cổ. Cả tăng bạch cầu và phân tế bào chất còn sót lại ở tinh trùng đều có liên quan đến việc gia tăng tổn thương thứ phát DNA tinh trùng [130]. Các yếu tố sau đây làm tăng lượng ROS trong cơ thể và sau đó dẫn đến tổn thương DNA tinh trùng:

- Tuổi: quá trình sinh tinh diễn ra trong suốt cuộc đời trưởng thành của người nam giới. Tuy nhiên, chất lượng tinh trùng và khả năng thụ tinh dần suy giảm. Điều này cũng liên quan đến tính toàn vẹn DNA tinh trùng, các phân mảnh DNA tinh trùng xuất hiện nhiều hơn [64], [117].

- Thừa cân, béo phì: béo phì ở nam giới có liên quan đến việc tăng nguy cơ tổn thương DNA và giảm khả năng di chuyển của tinh trùng, do đó làm giảm chất lượng tinh trùng, tác động tiêu cực đối với tính toàn vẹn DNA tinh trùng. Những nghiên cứu gần đây đã chứng minh có mối liên quan giữa chỉ số khối cơ thể, hội chứng chuyển hóa và sự phân mảnh DNA tinh trùng [11], [146].

- Nhiễm trùng: nhiễm vi khuẩn đường sinh dục nam dẫn đến sản sinh quá mức bạch cầu để chống lại sự nhiễm trùng. Sự gia tăng số lượng bạch cầu có thể làm giảm khả năng sinh sản của nam giới thông qua việc giảm khả năng di động, hình thái và gây tổn thương DNA tinh trùng [46].

- Giãn tĩnh mạch thừng tinh: là nguyên nhân dẫn đến ¼ các trường hợp vô sinh nam. Hậu quả của việc ứ trệ tuần hoàn trong hệ tĩnh mạch tinh cũng gây nên tình trạng mất cân bằng oxy hoá, từ đó dẫn đến sự phân mảnh DNA tinh trùng. Đây được coi là một trong những cơ chế quan trọng giải thích ảnh hưởng của giãn tĩnh mạch tinh lên chức năng sinh sản của nam giới. Tăng nhiệt độ bìu, rối loạn nội tiết tố, giảm tưới máu tinh hoàn và thiếu oxy cũng như xuất hiện các chất chuyển hóa bất lợi được coi là những yếu tố gây vô sinh trong giãn tĩnh mạch thừng tinh [19]. Mức độ ROS tương quan thuận với mức độ của bệnh lý này và bệnh nhân vô sinh kèm theo giãn tĩnh mạch thừng tinh có phân mảnh DNA tăng đáng kể [27]. Một số nghiên cứu đã chứng minh giãn tĩnh mạch thừng tinh liên quan đến các giọt tế bào chất dư thừa của tinh trùng [56]. Tính toàn vẹn DNA tinh trùng đã được chứng minh là cải thiện sau điều trị giãn tĩnh mạch thừng tinh [1], [145].

- Tác động của nhiệt độ: quá trình sinh tinh tối ưu ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ cơ thể. Nhiệt độ tinh hoàn cao hơn được báo cáo ở các nam giới có tình trạng giãn mạch thừng tinh, những người mặc quần áo quá chật, lái xe trong thời gian dài, thường xuyên tắm bồn nước nóng, tới phòng xông hơi, thậm chí để máy tính xách tay trên đùi. Có rất nhiều báo cáo về ảnh hưởng của nhiệt lên tinh hoàn làm tăng sự phân mảnh DNA tinh trùng. Tác động của nhiệt độ gây ra những thay đổi trong chu kỳ sinh tinh và phá vỡ cân bằng nội môi oxy hoá dẫn đến phân mảnh DNA tinh trùng [89].

- Hút thuốc: các độc tố thuốc lá có thể làm tăng số lượng DNA bị phân mảnh, hút thuốc có liên quan đến mức tăng đáng kể của lượng ROS tinh dịch và hậu quả của mất cân bằng oxy hóa. ROS trong tinh dịch của người hút thuốc có thể có ba nguồn gốc chính: tăng bạch cầu gây ra do viêm mãn tính ở đường sinh dục, mất cân bằng giữa khả năng chống oxy hóa của tinh trùng và tăng lượng ROS [137]. Điều này làm tăng hoạt động của ROS dẫn đến chết theo chương trình và sau đó dẫn đến sự phân mảnh DNA tăng cao.

- Rượu: mặc dù một số nghiên cứu chỉ ra rằng một số loại đồ uống có cồn (chẳng hạn như rượu vang đỏ) có thể có tác dụng chống oxy hóa, nhưng cũng có bằng chứng cho thấy tiêu thụ quá nhiều loại đồ uống này quá nhiều có tác động gây hại đến DNA tinh trùng. Trong nghiên cứu của Pourmasumi và cộng sự (2017) cho thấy uống rượu có thể không làm tăng tỉ lệ histone còn sót lại của tinh trùng và thiếu hụt protamine, tuy nhiên, nó làm tăng tỉ lệ tinh trùng bị phân mảnh DNA và quá trình chết theo chương trình [119].

- Ma túy: một số loại thuốc bất hợp pháp có liên quan đến vô sinh bao gồm: cocaine, cần sa, ma túy, thuốc lắc, thuốc phiện... sử dụng các chất này có khả năng làm giảm số lượng, độ di động, khả năng phản ứng cực đầu và tăng phân mảnh DNA tinh trùng [134].

- Ô nhiễm, độc tố và bức xạ: môi trường tiếp xúc với các chất ô nhiễm như dioxin, thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, khí đốt tự nhiên, dầu mỏ, ô nhiễm không khí, tiếp xúc nghề nghiệp với bức xạ, kim loại nặng, dung môi, các hợp chất nhựa và các chất gây rối loạn nội tiết khác... sẽ gây tổn thương DNA tinh trùng [89].

1.1.2.3. Ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng đến khả năng sinh sản

Người nam giới vô sinh có mức độ phân mảnh DNA tinh trùng cao hơn so với những người có khả năng sinh sản bình thường, tinh trùng bị phân mảnh DNA giảm khả năng thụ tinh, tăng nguy cơ sảy thai hoặc có thể làm tăng nguy cơ mắc các bệnh di truyền ở thế hệ sau [11], [171]. Hiện nay, các xét nghiệm về mức độ phân mảnh DNA tinh trùng vẫn còn gây tranh cãi về mối liên quan của phân mảnh DNA tinh trùng đến khả năng có thai. Theo tác giả Aitken, R.J và Bakos, H.W (2021) các bệnh nhân nam trước khi bắt đầu thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm nên được đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng. Việc xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng không chỉ dùng để đánh giá khả năng sinh sản tại thời điểm hiện tại, mà còn giúp dự phòng các vấn đề ảnh hưởng đến sức khỏe của con sau này. Sự suy giảm chất lượng DNA tinh trùng, đặc biệt khi tuổi của cha cao có liên quan đến việc gia tăng các đột biến và bệnh lý ở trẻ [23].

Khi chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng (DNA fragmentation index - DFI) lớn hơn 30%, cơ hội để thụ tinh tự nhiên, IVF cổ điển (In vitro fertilization – Thụ tinh trong ống nghiệm), hoặc bơm tinh trùng vào buồng tử cung rất thấp. Thay vào đó nên lựa chọn phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (IntraCytoplasmic Sperm Injection – ICSI). Xác định khả năng sinh sản của nam giới đang được đánh giá chủ yếu bởi chỉ số tinh dịch đồ như hình dạng tinh trùng, mật độ, độ di động. Điều này giải thích vì sao bệnh nhân với kết quả tinh dịch đồ bình thường vẫn có khả năng vô sinh cũng như tỉ lệ có thai sau điều trị HTSS còn thấp [113].

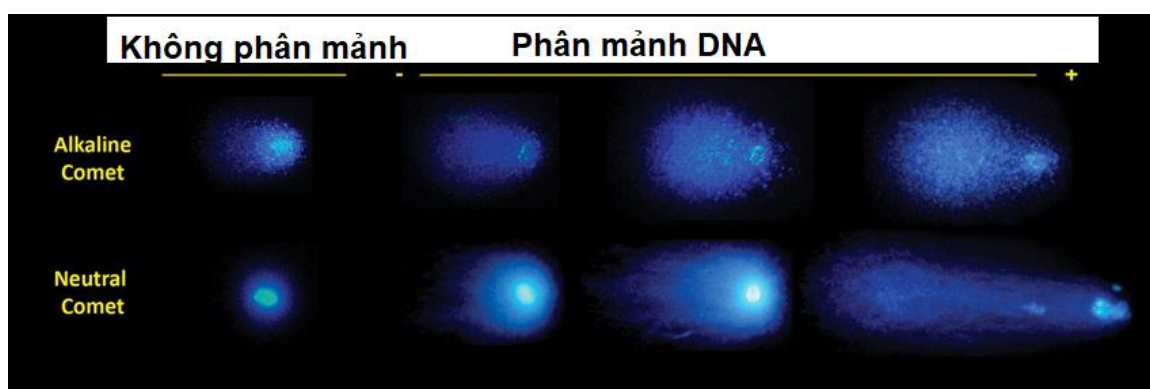
Bằng chứng hiện tại chỉ ra rằng DFI có tương quan thuận với sảy thai liên tiếp, không phụ thuộc vào yếu tố người nữ. Phân tích gộp của tác giả Mcqueen (2019) báo cáo nam giới có vợ sảy thai liên tiếp trước đó có DFI cao hơn đáng kể so với nhóm chứng [99]. Nghiên cứu tổng quan của Rilcheva (2016) cũng chỉ ra mối liên quan giữa DFI cao với tăng nguy cơ sảy thai sau IVF và ICSI (OR 2,48; 95% CI 1,52 – 4,04) [128]. Cho đến nay, các cơ chế gây sảy thai liên tiếp bởi phân mảnh DNA tinh trùng vẫn chưa được hiểu rõ. Tác giả Tan và cộng sự (2019) cho rằng noãn không thể sửa chữa sai hỏng của DNA tinh trùng, do đó có thể góp phần vào sự phát triển kém của phôi nang, thất bại làm tổ hoặc sảy thai [149].

Tính toàn vẹn của DNA tinh trùng có thể liên quan đến nguyên nhân vô sinh, gây sảy thai. Vì vậy, các xét nghiệm đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng ngày càng được nghiên cứu nhiều, giúp cung cấp thêm thông tin hữu ích để tiên lượng về khả năng sinh sản của nam giới. Theo khuyến cáo hiện nay, những bệnh nhân chuẩn bị thực hiện kỹ thuật bơm tinh trùng vào buồng tử cung, thụ tinh trong ống nghiệm; vô sinh chưa rõ nguyên nhân hoặc có tiền sử sảy thai liên tiếp nên thực hiện xét nghiệm đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng, nhằm cung cấp thêm thông tin để bác sĩ chỉ định kỹ thuật điều trị phù hợp [20], [11].

1.1.2.4. Các phương pháp phổ biến trong đánh giá sự phân mảnh DNA tinh trùng

Phương pháp Comet

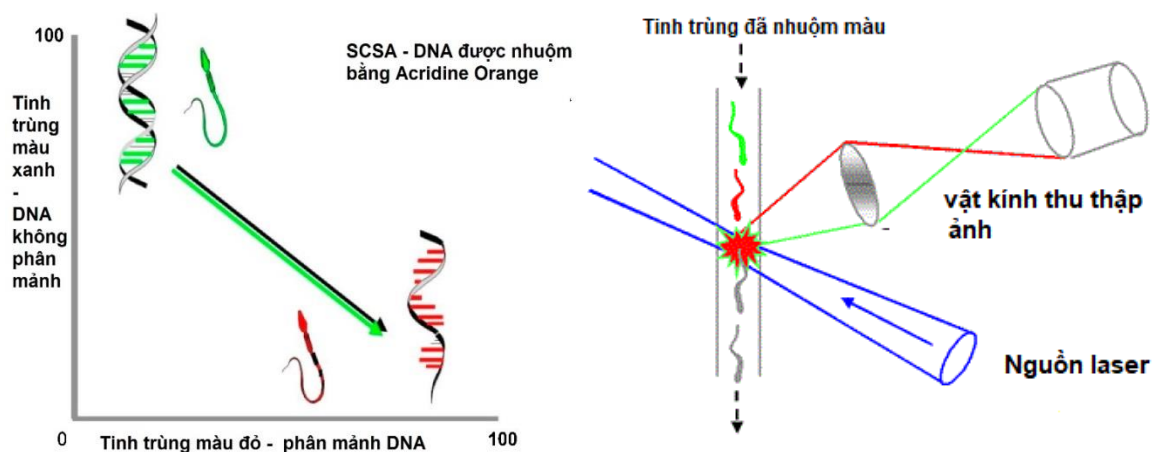
Hình ảnh tinh trùng bị phân mảnh DNA thu được dưới kính hiển vi huỳnh quang có dạng giống hình sao chổi (Comet), nên còn được gọi là phương pháp Comet. Comet là xét nghiệm đơn giản và có độ nhạy cao, định tính phân mảnh DNA mạch đôi và mạch đơn dựa trên điện di. Hình ảnh DNA phân mảnh có hình dạng như sao chổi với phần đầu là những DNA nguyên vẹn và phần đuôi là những DNA phân mảnh. Lượng DNA phân mảnh càng cao thì phần đuôi điện di hình sao chổi càng sáng và càng dài. Kỹ thuật Alkaline Comet được dùng để phát hiện đứt gãy DNA mạch đơn và mạch đôi, trong khi kỹ thuật Neutral Comet chỉ có thể phát hiện đứt gãy DNA mạch đôi, hai kỹ thuật này chủ yếu khác biệt về dung dịch đệm được sử dụng là Neutral và Alkaline. Ngoài ra, kỹ thuật Alkaline Comet có thể sử dụng để đánh giá tất cả các loại tế bào [123].



Hình 1.4. Tinh trùng không phân mảnh và phân mảnh trong các xét nghiệm Alkaline Comet và Neutral Comet [124]

Phương pháp khảo sát cấu trúc chất nhuộm sắc tinh trùng

Dựa vào sự thay đổi màu sắc của Acridin orange từ màu xanh khi liên kết với DNA mạch đôi không bị biến tính sang màu đỏ khi liên kết với DNA bị phân mảnh mạch đơn bằng máy đo dòng chảy tế bào. Chất nhuộm chuyên dụng sử dụng trong phương pháp này là Acridine orange, có khả năng phát màu khác nhau khi bám lên mạch đôi hay mạch đơn DNA. Dưới ánh sáng laser kích thích màu xanh dương có bước sóng 488 nm của máy đếm dòng chảy tế bào, Acridine orange bám vào DNA mạch đôi sẽ phát huỳnh quang màu xanh lá cây có bước sóng 515-530 nm và Acridine orange bám vào mạch đơn sẽ phát huỳnh quang màu đỏ có bước sóng 630 nm. Như vậy ánh sáng huỳnh quang màu đỏ chính là dấu hiệu để nhận biết DNA phân mảnh. DFI trong phương pháp này được xác định bằng tỉ số của tín hiệu huỳnh quang màu đỏ trên tổng số tín hiệu huỳnh quang xanh và đỏ, hay nói cách khác, DFI được tính dựa trên tỉ lệ của tinh trùng bị phân mảnh trên tổng số tinh trùng [51]. Ưu điểm của phương pháp là có thể định lượng được tinh trùng phân mảnh DNA hoặc tinh trùng có chất nhuộm sắc cô đặc chưa hoàn chỉnh. Tuy nhiên máy đo dòng chảy tế bào và phần mềm đọc kết quả chuyên dụng có giá thành cao.

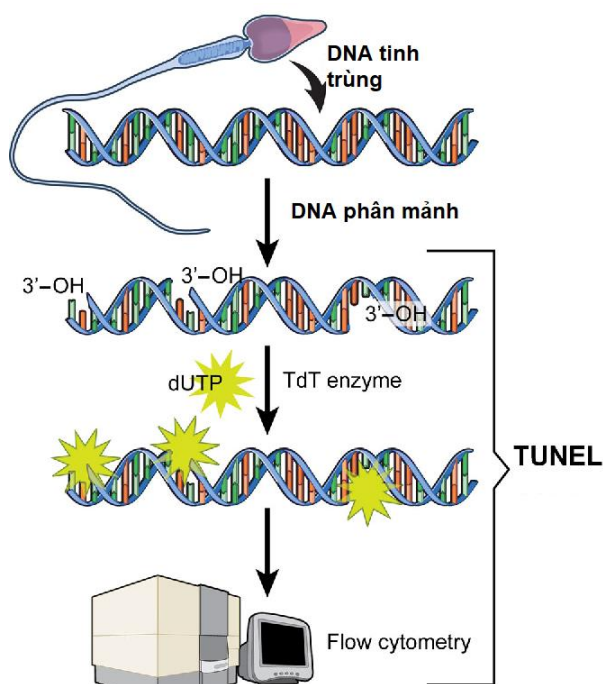


Hình 1.5. Hình ảnh mô tả nguyên lý của phương pháp khảo sát cấu trúc chất nhuộm sắc tinh trùng [51]

Phương pháp đánh dấu phân mảnh DNA bằng các dUTP (TUNEL)

TUNEL là phương pháp đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng trực tiếp thông qua dUTP (deoxyuridine triphosphate) gắn lên mạch đơn và mạch đôi của DNA đứt gãy bằng terminal deoxynucleotidyl transferase. Phân mảnh DNA được định lượng

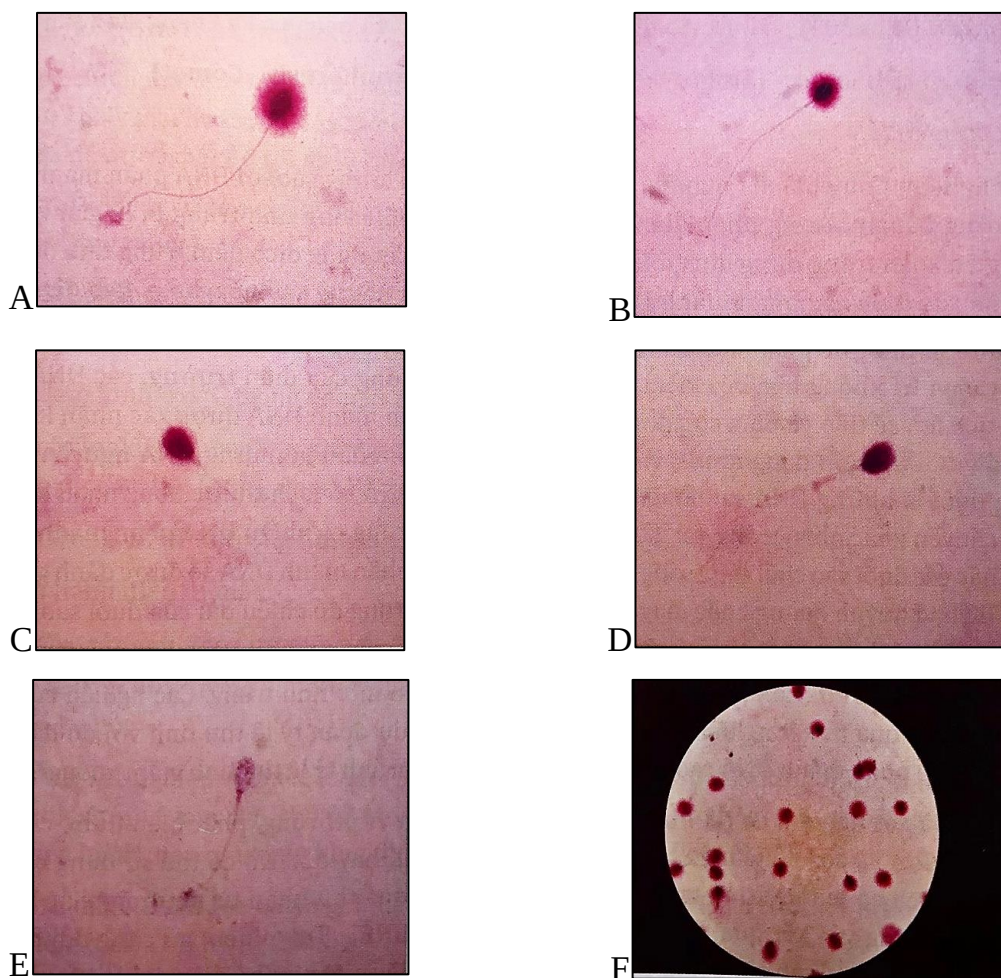
thông qua máy đếm dòng chảy tế bào và phân tích định tính thông qua tín hiệu phát huỳnh quang hoặc kính hiển vi quang học. Xét nghiệm này có thể thực hiện trên một lượng nhỏ tinh trùng (≤ 200 tinh trùng), tinh trùng thu nhận từ tinh hoàn cũng có thể được đánh giá phân mảnh DNA bằng kỹ thuật này. TUNEL có những ưu điểm về độ nhạy nhưng có những khuyết điểm về thời gian, ngưỡng giá trị cũng như hạn chế về đánh giá những tinh trùng chưa trưởng thành [51].



Hình 1.6. Hình ảnh mô tả nguyên lý phương pháp TUNEL [140]

Phương pháp khảo sát sự phân tán chất nhiễm sắc tinh trùng

Mẫu tinh dịch được cố định trên thạch chuyên dụng và xử lý bằng dung dịch acid và muối để loại bỏ màng tế bào và các protein nhân. Khi đó DNA tinh trùng không bị phân mảnh sẽ bung đều các sợi chromatin xung quanh lõi nhân. DNA được nhuộm Giemsa sẽ tạo quầng halo xung quanh lõi nhân khi quan sát dưới kính hiển vi quang học. Ngược lại các tế bào có DNA bị phân mảnh sẽ không tạo quầng [7], [54]. Ưu điểm của phương pháp là giá thành hợp lý và thao tác đơn giản. Nhược điểm của kỹ thuật là cho kết quả mang tính chủ quan phụ thuộc vào đánh giá của chuyên viên, khắc phục nhược điểm với kết quả được ghi nhận từ 2 chuyên viên đọc mẫu khác nhau. Hiện nay, khảo sát sự phân tán chất nhiễm sắc là phương pháp được sử dụng phổ biến để xác định tỉ lệ phân mảnh DNA vì có độ chính xác, tiện lợi, dễ áp dụng, kinh tế vì không đòi hỏi các trang thiết bị đắt tiền.



Hình 1.7. Hình ảnh tinh trùng trong phương pháp khảo sát sự phân tán chất nhuộm sắc [12]

A: tinh trùng có quầng lớn (loại A); B: tinh trùng có quầng trung bình (loại B); C: tinh trùng có quầng nhỏ (loại C); D: tinh trùng không có quầng (loại D); E: tinh trùng thoái hóa (loại E); F: tập hợp các tinh trùng trên vi trường vật kính 100X.

1.2. ĐẶC ĐIỂM PHÁT TRIỂN PHÔI THỤ TINH TRONG ỐNG NGHIỆM

1.2.1. Đặc điểm thụ tinh

Trong sinh lý tự nhiên và trong IVF cổ điển, quá trình thụ tinh thường trải qua các giai đoạn: (1) tinh trùng xâm nhập qua lớp tế bào hạt, (2) tinh trùng thực hiện phản ứng cực đầu, (3) tinh trùng vượt qua màng trong suốt, (4) tinh trùng tiếp xúc với màng bào tương noãn, bắt đầu kích hoạt noãn để thực hiện phản ứng hòa màng, (5) phản ứng vỏ xảy ra dẫn đến phản ứng màng trong suốt và (6) sự hình thành hai tiền

nhân. Trong kỹ thuật ICSI, quá trình thụ tinh không diễn ra tự nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy sự hình thành tiền nhân có thể xảy ra sớm hơn so với IVF cổ điển.

Trong môi trường nuôi cấy, noãn được xem là thụ tinh bình thường khi xuất hiện hai tiền nhân. Tiền nhân là dấu hiệu đầu tiên nhưng cần phân biệt với không bào hoặc những bất thường khác trong bào tương. Thông thường cả hai tiền nhân xuất hiện cùng thời gian trong khoảng 16 – 18 giờ sau khi thụ tinh với noãn trưởng thành. Tiền nhân có thể xuất hiện sớm hơn ở phôi được thực hiện ICSI so với phôi thực hiện IVF. Nếu tiền nhân không xuất hiện ở thời điểm 16 – 18 giờ sau thụ tinh, thì nguyên nhân có thể rối loạn trong việc hình thành thể sao và vi ống, sẽ dẫn đến sự phát triển bất thường [12].

Tiền nhân đực và tiền nhân cái thường hình thành cùng một lúc. Tiền nhân đực hình thành gần vị trí tinh trùng xâm nhập và tiền nhân cái hình thành ở cực bào tương có thoi phân bào. Khoảng 4 giờ sau khi tiêm tinh trùng vào bào tương của noãn hoặc 5 - 6 giờ sau cấy noãn với tinh trùng có thể nhìn thấy hình ảnh các tiền nhân có kích thước nhỏ và mờ. Khoảng 15 giờ sau khi thụ tinh, hai tiền nhân nằm sát nhau và có hình số 8, và phần tiếp xúc sát nhau tạo thành một mặt phẳng, đồng thời các hạt nhân sẽ di chuyển và xếp hàng cạnh vùng tiếp xúc hai tiền nhân. Mỗi tiền nhân có khoảng 1 đến 9 hạt nhân, tiền nhân nhỏ có ít hạt nhân hơn. Hình thái hợp tử được chứng minh là có liên quan đến tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ làm tổ của phôi. Các tiêu chuẩn để đánh giá hợp tử bao gồm: kích thước và vị trí của hai tiền nhân, số lượng và sự phân bố của các hạt nhân và hình thái của bào tương [135].

Bảng 1.2. Đánh giá tiền nhân của đồng thuận Alpha [28]

Thang điểm	Phân loại	Mô tả
1	Đối xứng	2 tiền nhân có kích thước tương đối đều; kích thước và số hạt nhân như nhau (3-7); các hạt nhân nằm song song với đường tiếp xúc giữa 2 tiền nhân hay phân bố rải rác
2	Không đối xứng	Những cách sắp xếp khác của tiền nhân như nằm ở vùng ngoại vi của hợp tử
3	Bất thường	Tiền nhân có 1 hoặc không có hạt nhân

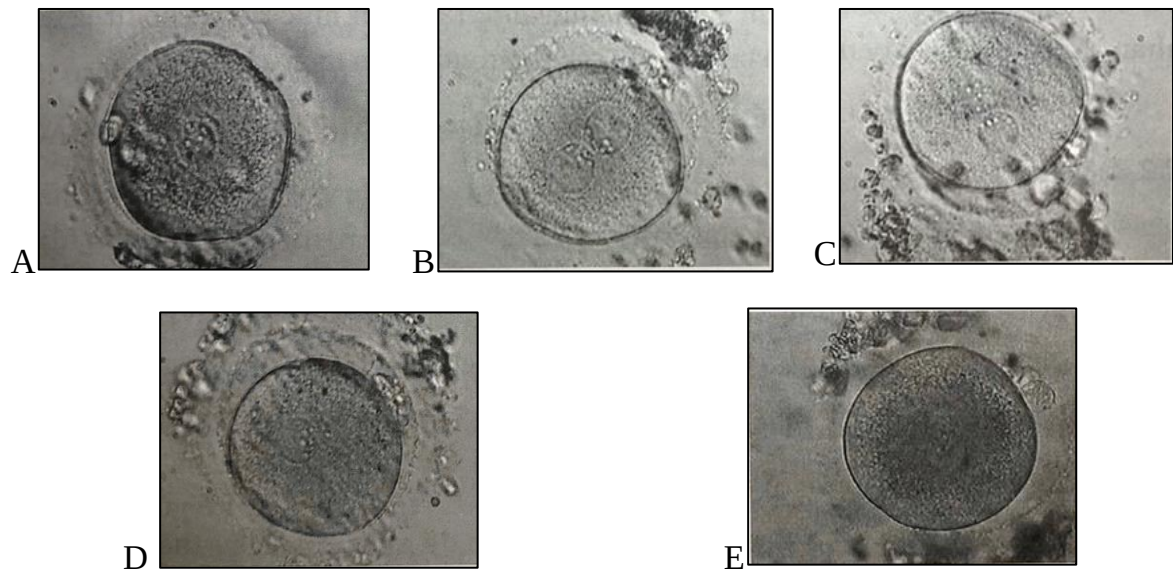
Đánh giá tiền nhân theo hệ thống Z:

Z1: tiền nhân có số lượng từ 3 – 7 hạt nhân tương đồng, xếp thẳng hàng ở vị trí tiếp giáp 2 tiền nhân

Z2: Số lượng hạt nhân tương đồng, xếp không thẳng hàng ở vị trí tiếp giáp

Z3: 2 tiền nhân không tương đồng, các hạt nhân có số lượng và kích thước không giống nhau. Các hình thái có thể gặp như: chỉ có 1 hoặc 2 hạt nhân trong 1 tiền nhân, tiền nhân còn lại có 4 – 6 hạt nhân; hạt nhân xếp thẳng hàng ở 1 tiền nhân và phân tán ở tiền nhân thứ 2; có nhiều hơn 8 hạt nhân trong 1 tiền nhân.

Z4: tiền nhân có kích thước không tương đồng hoặc các hạt nhân không xếp thẳng hàng [12].



Hình 1.8. Đánh giá sự thụ tinh với các hình thái của hợp tử [12]

A. Hợp tử 2PN với quang sáng halo; B. Hợp tử 2PNZ1; C. Hợp tử 2PNZ1 có nguồn gốc từ noãn có màng trong suốt bất thường; D. Hợp tử 2PNZ3 với hai tiền nhân kích thước không đồng đều nhau; E. Thụ tinh bất thường 3PN sau IVF

Tỉ lệ thụ tinh thường dao động trong khoảng 80 – 85%, trong đó có các chu kỳ thất bại thụ tinh hoàn toàn. Nguyên nhân thất bại IVF cổ điển có thể do các yếu tố: không có tinh trùng xâm nhập vào bào tương noãn, noãn chưa trưởng thành vào thời điểm đồng nuôi cấy noãn và tinh trùng, noãn có bất thường về NST và tình trạng noãn cô đặc NST xảy ra sớm. Trong các chu kỳ ICSI, lý do có thể có là noãn không được hoạt hóa hay bất thường NST của noãn hoặc tinh trùng [12].

1.2.2. Đặc điểm phôi giai đoạn phân chia (ngày 2 - 3)

Sau giai đoạn 2 tế bào, hợp tử có thêm nhiều lần nguyên phân làm tăng số lượng tế bào được gọi là sự phân chia với các tế bào có kích thước nhỏ dần sau mỗi lần phân chia, được gọi là các phôi bào, và tổng kích thước khối các tế bào không thay đổi. Ngày thứ 2, có 4 phôi bào, và ngày thứ 3 có 8 phôi bào. Tốc độ phân chia có liên quan đến khả năng sống của phôi. Phôi phân chia chậm thường có khả năng làm tổ kém hơn [106]. Trong đánh giá phôi giai đoạn phân chia, các mốc thời gian quan sát tốt nhất được thống nhất theo đồng thuận Alpha (2011) [28] như sau:

Ngày 1: (26 ± 1) giờ sau ICSI, (28 ± 1) giờ sau IVF: 2 tế bào

Ngày 2: (44 ± 1) giờ, 4 tế bào

Ngày 3: (68 ± 1) giờ, 8 tế bào

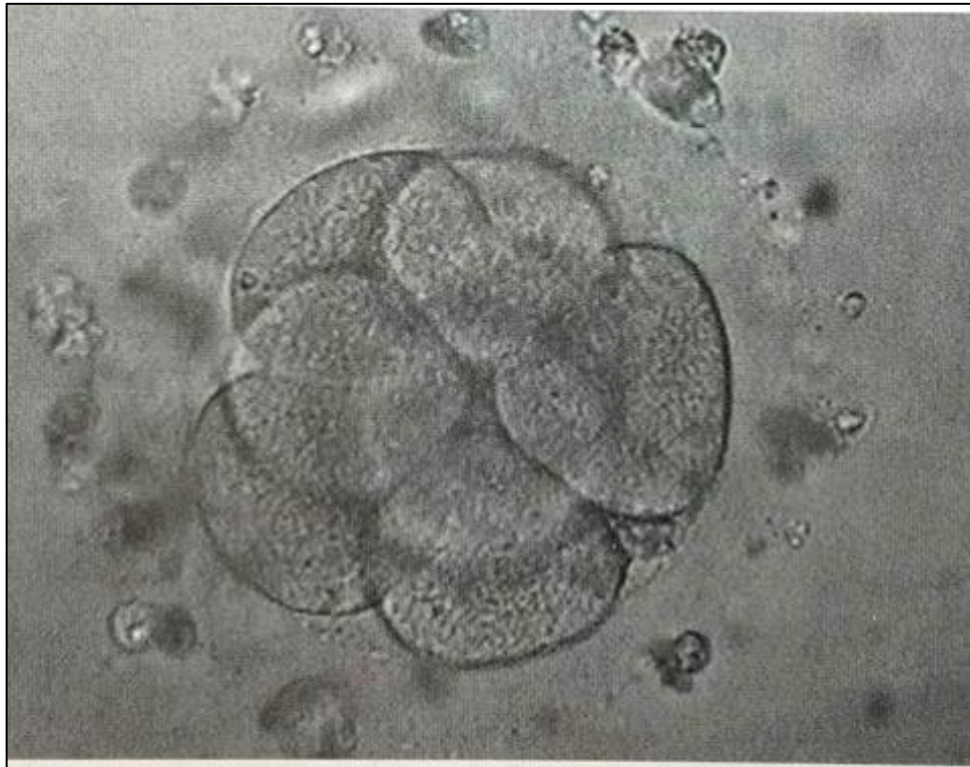
Đối với hợp tử thụ tinh bình thường, nếu không phân chia trong vòng 24 giờ thường dẫn đến giảm khả năng sống, nhưng nếu phân chia nhanh quá (phân chia trong vòng 12 giờ) cũng không phải là dấu hiệu phôi tốt [92].

Khi đánh giá lựa chọn phôi, thường kết hợp các yếu tố: tốc độ phát triển phôi, hình thái của phôi như số lượng mảnh vỡ, độ dày của màng trong suốt, độ phát triển của phôi bào, và số lượng nhân tế bào. Một số đặc điểm bất thường của phôi xảy ra trong quá trình phát triển của phôi: sự phân mảnh phôi bào, phôi bào đa nhân, kích thước phôi bào không đều, phôi có kích thước lớn bất thường, phôi có một phôi bào to nổi trội, phôi có bào tương không đều, phôi có hình thon dài.

Số lượng phôi bào xuất hiện tại thời điểm đánh giá phôi đóng vai trò quan trọng trong dự đoán khả năng phát triển phôi. Các nghiên cứu cho thấy số lượng phôi bào chẵn có khả năng mang lại kết quả có thể cao hơn so với các phôi bào có số phôi bào lẻ. Một phôi bào có 2 tế bào khi bắt đầu phân chia thành 3 tế bào phải nhanh chóng phân chia để đạt 4 phôi bào. Nếu khoảng thời gian phân chia từ 3 phôi bào quá dài có thể xem là bất thường trong sự phân chia tế bào. Những phôi phát triển nhanh với số lượng phôi bào lớn hơn 4 thể hiện một mức độ lệch bội cao hơn so với những phôi có sự phân bào đồng bộ. Lưu ý một số phôi bào có thể bị nhầm

lẫn với các mảnh vỡ tế bào có kích thước lớn, dẫn đến nhận diện sai về số lượng phôi bào thực tế [12].

Ở phôi đang phân chia, quá trình nguyên phân thường tạo ra các mảnh tế bào chất, không chứa nhân được bao quanh bởi một màng plasma, gọi là mảnh vỡ bào tương. Kích thước và sự phân bố các mảnh vỡ bào tương trong khoảng bao quanh màng trong suốt thường rất khác nhau. Những phôi có nhiều mảnh vỡ có mức độ bất thường NST và tỷ lệ khả năng cao. Những mảnh vỡ bào tương cũng có thể do tế bào giải phóng các chất độc, nên có thể ảnh hưởng đến các phôi bào xung quanh. Hơn nữa, sự hiện diện của các mảnh vỡ xung quanh phôi bào sẽ ảnh hưởng đến sự tương tác giữa các phôi bào với nhau [12].



Hình 1.9. Phôi phân chia ngày 3 chất lượng tốt [12]

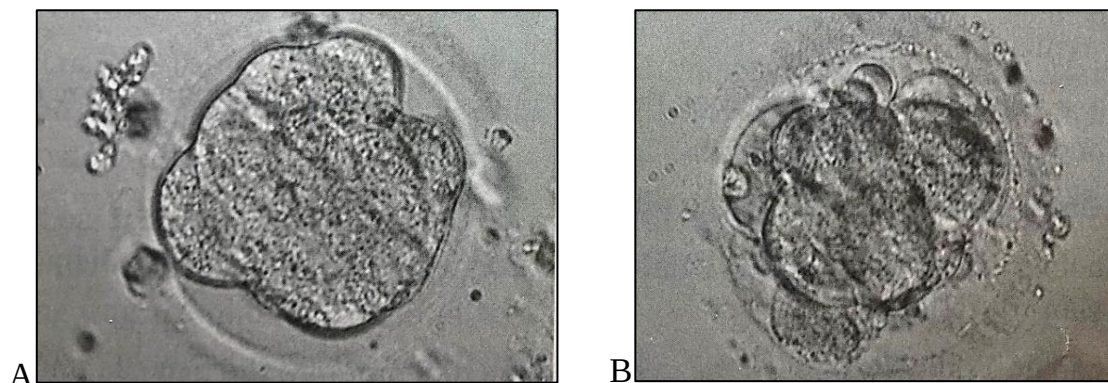
Bảng 1.3. Đánh giá phân loại phôi ngày 2 và 3 của đồng thuận Alpha [28]

Mức độ	Đánh giá chất lượng phôi	Mô tả
1	Tốt	- Các phôi bào có kích thước tương đối đồng đều - Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương <10% - Không có phôi bào đa nhân
2	Trung bình	- Có ≤ 4 phôi bào đối với phôi ngày 2 và ≤ 8 phôi bào đối với phôi ngày 3 - Số phôi bào kích thước tương đối đều chiếm đa số - Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương 10 - 25% - Không có phôi bào đa nhân
3	Xấu	- Có ≤ 4 phôi bào đối với phôi ngày 2 và ≤ 8 phôi bào đối với phôi ngày 3 - Các phôi bào có kích thước không đồng đều - Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương >25 % - Có phôi bào đa nhân

1.2.3. Đặc điểm phôi dâu (phôi ngày 4)

Ở người, phôi dâu bắt đầu hình thành khi phôi ở giai đoạn 8 phôi bào và bắt đầu quá trình kết đặc. Quá trình phôi kết đặc là một quá trình hình thành các liên kết chặt chẽ giữa các phôi bào, phần phôi bào tiếp xúc với nhau tăng lên và dàn phẳng ra tạo thành một khối không nhìn rõ các ranh giới giữa các phôi bào. Các phôi bào hoặc mảnh vỡ tế bào không hình thành liên kết với các phôi bào khác sẽ bị đẩy ra ngoài khối phôi nhưng vẫn ở phía trong màng trong suốt cho tới khi phôi thoát màng. Khi phôi bắt đầu kết đặc lại, các phôi bào tương tác với nhau làm các phôi bào không còn đặc tính toàn năng nữa và đây là sự khởi đầu cho sự sao mã DNA của phôi. Dưới kính hiển vi, hình thái của phôi dâu được thể hiện bằng sự tăng tiếp xúc giữa các phôi bào, nhưng ranh giới giữa các phôi bào còn nhìn thấy. Khi quá trình kết đặc tăng dần, ranh giới giữa các phôi bào trở nên khó phân biệt do các phôi

bào dàn phẳng ra và kết liền với nhau. Phôi dâu lúc ở giai đoạn này hoàn toàn trông như một tế bào có nhiều nhân. Phôi dâu ở người có thể xuất hiện sớm khoảng 65 giờ sau thụ tinh, nhưng thường xuất hiện giữa ngày thứ 3 và thứ 4 sau thụ tinh [76].



Hình 1.10. Phôi ngày 4 [12]

A. Phôi ngày 4 chất lượng tốt với các phôi bào liên kết chặt chẽ với nhau; B. Phôi ngày 4 chất lượng xấu với chỉ một nhóm phôi bào liên kết chặt chẽ với nhau.

Bảng 1.4. Đánh giá phôi ngày 4 theo tiêu chuẩn đồng thuận Alpha [28]

Phân loại	Đặc điểm
Tốt	Đã bước vào lần phân bào thứ 4 (khoảng 16 phôi bào). Hiện tượng nén đã diễn ra ở toàn bộ thể tích phôi
Trung bình	Đã bước vào lần phân bào thứ 4 (khoảng 16 phôi bào). Hiện tượng nén đã diễn ra ở phần lớn của phôi
Xấu	Hiện tượng nén xảy ra ít hơn $\frac{1}{2}$ thể tích phôi, 2 - 3 phôi bào còn rời rạc. Hoặc hiện tượng nén xảy ra ở phôi trước khi phôi đạt đến 8 phôi bào.

1.2.4. Đặc điểm phôi nang (phôi ngày 5-6)

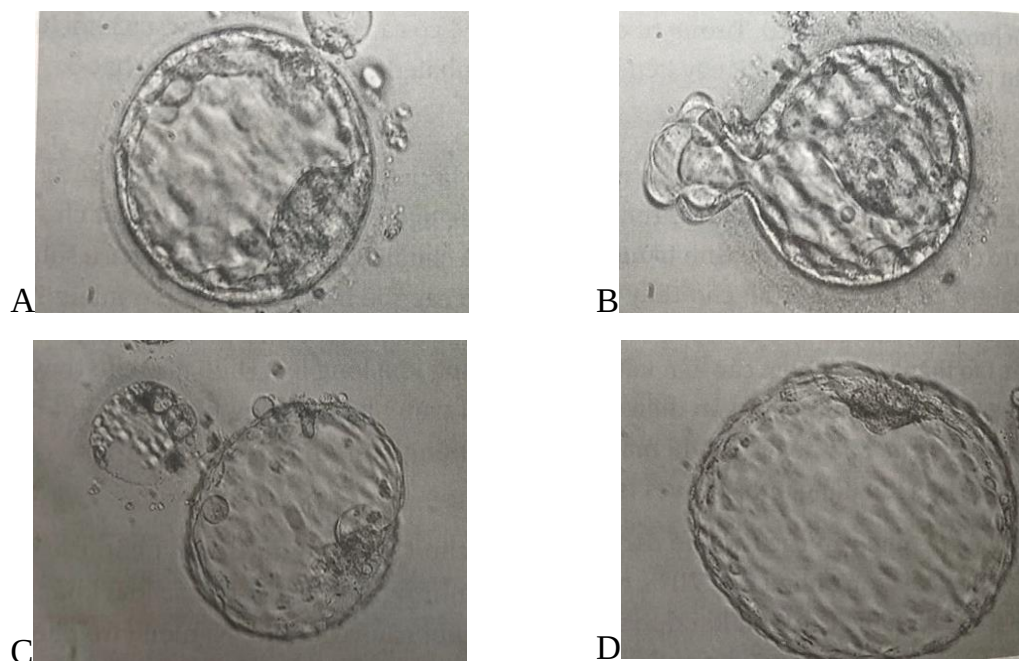
Phôi nang thường hình thành khoảng 100 giờ sau khi thụ tinh. Sau 5 - 6 ngày nuôi cấy, 26 - 65% phôi sẽ phát triển đến giai đoạn này. Sự phát triển còn tùy thuộc vào phương pháp nuôi cấy và thành phần của môi trường nuôi cấy.

Trong quá trình hình thành phôi nang, 2 loại phôi bào được hình thành là mầm phôi và nguyên bào lá nuôi. Hai loại phôi bào này ngày càng khác nhau khi chúng di chuyển tới các vị trí mới trong quá trình tạo phôi nang. Nguyên bào lá nuôi có hình bầu dục và phân cực trong khi đó nguyên bào phôi có vẫn giữ hình tròn và hình thái không thay đổi. Các nguyên bào lá nuôi nối với nhau qua những phần tiếp xúc bề mặt nhỏ, trong khi đó nguyên bào phôi tiếp xúc chặt chẽ với nhau tạo thành một khối. Vị trí và sự phát triển của nguyên bào lá nuôi và nguyên bào phôi phụ thuộc vào sự phân cực và sự hình thành trục phân bào của phôi được hình thành từ khi hợp tử mới bắt đầu được thụ tinh. Các nguyên bào phôi di chuyển về phía một cực của phôi gọi là cực phôi, các phôi bào này liên kết chặt với nhau và có đặc tính đa năng. Các nguyên bào lá nuôi tạo thành hàng rào bên ngoài bảo vệ mầm phôi và được biệt hóa để thực hiện chức năng này [136].

Thời điểm đánh giá phôi nang tốt nhất 154 giờ sau khi tiêm hCG (Human Chorionic Gonadotropin - Hormone hướng sinh dục rau thai người) hoặc 112 – 114 giờ sau khi thụ tinh. Chất lượng phôi của phôi nang sẽ được đánh giá thông qua thể tích của khoang phôi nang (độ nở của phôi), độ nén của của khối mầm phôi và trạng thái, kích thước của tế bào nguyên bào phôi. Phôi nang có khoang phôi chứa đầy dịch là kết quả của các kênh màng Na/K-ATPase làm tăng nồng độ muối trong phôi, dẫn nước vào trong khoang qua sự thẩm thấu. Do hoạt động của các kênh bơm, kích thước của khoang phôi giãn nở ra, và cuối cùng thoát màng trong suốt. Mức độ và thời điểm giãn nở là các đặc điểm chính khi đánh giá khoang phôi nang. Khối tế bào bên trong trở nên rõ ràng hơn khi khoang phôi nang nở rộng. Những tế bào này sẽ trở thành thai và được đánh giá thông qua cấu trúc các tế bào nén chặt và liên kết lỏng lẻo. Nguyên bào nuôi là các tế bào tiếp xúc trực tiếp với niêm mạc tử cung chịu trách nhiệm về vị trí, kết dính với niêm mạc tử cung và cuối cùng tham gia trở thành các phần phụ của thai. Nguyên bào nuôi được đánh giá bằng số lượng tế bào và sự gắn kết tương đối nhau [12].

Bảng 1. 5. Hệ thống đánh giá phôi nang theo tiêu chuẩn đồng thuận Alpha [28]

	Độ đánh giá	Xếp loại	Hình thái phôi
Tốc độ phát triển	1		Phôi nang sớm: thể tích khoang phôi < ½ thể tích của phôi (chưa lấp đầy)
	2		Phôi nang: khoang phôi hoàn toàn lấp đầy thể tích của phôi
	3		Phôi đã nở rộng: khoang phôi nở rộng với trong suốt mỏng dần
	4		Phôi đang/đã thoát màng
Mềm phôi	1	Tốt	Nổi lên trên, dễ dàng phân biệt, chứa nhiều tế bào nén chặt và liên kết với nhau
	2	Trung bình	Dễ dàng phân biệt, chứa nhiều tế bào tạo thành từng nhóm tế bào liên kết lỏng lẻo
	3	Xấu	Khó phân biệt, chứa ít tế bào
Nguyên bào nuôi	1	Tốt	Rất nhiều tế bào, hình thành lớp biểu mô bên ngoài
	2	Trung bình	Ít tế bào, hình thành nên lớp biểu mô lỏng lẻo.
	3	Xấu	Rất ít tế bào



Hình 1.11. Hình thái phôi nang [12]

A. Phôi chất lượng tốt, một nhóm nhỏ các tế bào mầm phôi thoát vị tại vị trí thực hiện ICSI; B. Phôi chất lượng tốt đang thoát màng trên 10%; C. Phôi ngày 6 đã thoát màng hoàn toàn với một số tế bào bị loại thải; D. Phôi ngày 6 thoát màng hoàn toàn với chất lượng tốt.

1.2.5. Một số phương pháp khác đánh giá sự phát triển của phôi

Đánh giá động học phát triển của phôi bằng hệ thống theo dõi phôi liên tục

Đánh giá phôi dựa trên đặc điểm hình thái của phôi trở thành tiêu chuẩn để đánh giá tiềm năng của phôi. Phôi phải đạt được các đặc điểm hình thái cụ thể tại các mốc thời gian cụ thể cho từng ngày kiểm tra sau quá trình thụ tinh. Một số nghiên cứu về hệ thống tính điểm cho thấy một hoặc nhiều thông số hình thái học có thể dự đoán sự phát triển của phôi, nhưng tỷ lệ làm tổ của phôi được chọn (phôi ngày 3) chỉ khoảng 40%. Như vậy việc lựa chọn phôi dựa vào hình thái tại một thời điểm hoặc nhiều thời điểm không phải lúc nào cũng phản ánh được sức sống phôi [12].

Hệ thống theo dõi phôi liên tục cung cấp hàng trăm hình ảnh về sự phát triển của phôi, cho chuyên viên phôi học biết chính xác những thời điểm phát triển quan trọng của phôi, tương tự như đánh giá phôi thông thường và cả hình thái phôi trong

suốt quá trình nuôi cấy. Không những vậy, hệ thống theo dõi phôi liên tục có thể kiểm soát được các bất thường của quá trình phân chia mà việc đánh giá hình thái phôi từng thời điểm thông thường không quan sát được.

Những yếu tố quan trọng trong hệ thống theo dõi phôi liên tục bao gồm một kính hiển vi có độ phân giải cao, đĩa nuôi cấy phôi đặc biệt để giảm thiểu sự di chuyển trong quá trình theo dõi, phần mềm ghi nhận hình ảnh và hệ thống theo dõi nuôi cấy phôi chuyên biệt. Hiện nay trên thị trường có nhiều loại hệ thống theo dõi phôi liên tục khác nhau, trong đó có thể kể đến bốn hệ thống phổ biến là PrimoVision (Vitrolife, Thụy điển), Eeva (Auxogyn, Mỹ), EmbryoScope (Fertilitech, Đan Mạch) và Miri (Esco, Đan Mạch).

Một số định nghĩa về động học của phôi:

- t_0 : thời điểm tiêm tinh trùng vào bào tương noãn
- PNF: thời điểm 2 tiền nhân biến mất
- t_2 : thời điểm phân bào lần đầu tiên
- t_3 : thời điểm hình thành 3 phôi bào
- t_n : thời điểm hình thành n phôi bào
- $ECC1 = t_2 - PNF$: chu kì phân bào thứ nhất
- $ECC2 = t_4 - t_2$: chu kì phân bào thứ hai
- $ECC3 = t_e - t_4$: chu kì phân bào thứ ba
- $S2 = t_2 - t_3$: sự đồng bộ của chu kì phân bào thứ hai
- $S3 = t_8 - t_5$: sự đồng bộ của chu kì phân bào thứ ba
- t_M : thời điểm hình thành phôi dâu
- t_{SB} : thời điểm bắt đầu tạo khoang
- t_B : thời điểm hình thành phôi nang hoàn chỉnh

Ngày càng nhiều nghiên cứu đưa ra các tham số về động học của phôi trong lựa chọn phôi chuyên. Nghiên cứu dõi nuôi cấy phôi liên tục tại Trung tâm Nội tiết sinh sản và vô sinh, Bệnh viện Đại học Y Dược Huế trên 846 phôi tổng số 106 chu kì điều trị bằng hệ thống PrimoVision. Kết quả chứng minh được tính hữu dụng của việc sử dụng hệ thống theo dõi phôi liên tục trong phát hiện các bất thường trong

quá trình phân chia phôi. Những phôi chất lượng tốt có thời gian xuất hiện hợp tử và dung hợp tiền nhân sớm hơn đồng thời các khoảng thời gian PNf và t2 ngắn hơn so với các phôi bào chất lượng kém hơn [15]. Phân tích tổng hợp của tác giả Pribenszky C và cộng sự năm 2017 chỉ ra sử dụng hệ thống theo dõi phôi liên tục trong lựa chọn phôi chuyển có thể cải thiện tỉ lệ thai, tỉ lệ sinh sống và giảm tỉ lệ sảy thai [120]. Một nghiên cứu khác cho thấy trong 48 giờ đầu tiên sau nuôi cấy, những phôi có sự phân bào đầu tiên sớm, thời gian phôi ở trạng thái 3 tế bào ngắn cũng như không có sự hiện diện của sự phân chia trực tiếp có tiềm năng phát triển lên phôi nang chất lượng tốt hơn [86]. Đặc biệt, hình thái động học của phôi giai đoạn phân chia phản ánh tình trạng bình thường về di truyền của những phôi này với độ chính xác lên tới 97% [108]. Ngoài ra, những cặp vợ chồng khi được áp dụng hệ thống theo dõi phôi liên tục trong đánh giá phôi cảm thấy có sự tham gia nhiều hơn trong quá trình điều trị cũng như sự hài lòng trong dịch vụ. Sử dụng hệ thống theo dõi phôi liên tục trong lựa chọn phôi chuyển đang là một xu hướng ngày càng nhận được nhiều ủng hộ bởi các trung tâm trên thế giới bởi độ chính xác cao và không gây xâm lấn phôi.

Đánh giá phôi dựa trên hoạt động sinh lý của phôi

Đánh giá phôi truyền thống dựa trên hình thái phôi đã được áp dụng từ những năm đầu tiên của thụ tinh trong ống nghiệm. Những hệ thống, tiêu chuẩn đánh giá đã được thống nhất bởi các chuyên viên phôi học trên toàn thế giới. Mặc dù những tiêu chuẩn đánh giá này đã ngày càng góp phần cải thiện tỉ lệ thành công trong điều trị nhưng người ta thấy rằng hình thái bên ngoài của phôi không phản ánh hết được hoạt động sinh lý của phôi. Các nghiên cứu của Katz-Jaffe (2006) và Gardner (2001) đều chỉ ra rằng những phôi có cùng chất lượng của cùng một bệnh nhân vẫn có sự khác biệt nhiều về những hoạt động sinh lý biến dưỡng của phôi. Những ghi nhận này góp phần mở ra một hướng mới trong phương thức đánh giá phôi. Đánh giá hoạt động sinh lý biến dưỡng của phôi có thể dựa trên sự trao đổi chất của phôi, sự tiết ra các phân tử đặc hiệu trong quá trình phát triển của phôi [80].

Proteomics

Proteome/secretome gồm hơn 1 triệu protein khác nhau, chịu trách nhiệm cho hoạt động chức năng của tế bào. Việc phân tích các protein này ngày càng được

hiện thực hoá nhờ sự phát triển của phương pháp khối phổ kế và phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân. Các protein thu nhận được trong môi trường nuôi cấy phôi sẽ được nhận dạng. Các phân tích về proteome/ secretome có giá trị trong việc chẩn đoán mức bội thể của phôi bởi các chất này phản ánh sự hoạt động của các gene trong phôi. Một nghiên cứu tiên phong trong hướng này của McReynolds và cộng sự (2011) đã chỉ ra rằng hàm lượng lipocalin-1 tăng lên ở những phôi nang bị lệch bội [100]. Việc áp dụng thường quy phương pháp này còn hạn chế bởi yêu cầu về trang thiết bị phân tích đắt tiền. Tuy nhiên, phương pháp này hứa hẹn sẽ có nhiều ứng dụng trong tương lai.

Đánh giá dựa trên sự chuyển hóa phôi

Nghiên cứu của tác giả Gardner và cộng sự năm 2011 đã chỉ ra sự tiêu thụ và sản xuất các chất chuyển hoá của phôi trong môi trường nuôi cấy có mối quan hệ đến khả năng phát triển của phôi và khả năng có thai sau chuyển phôi. Các chất chuyển hoá là tập hợp các phân tử nhỏ bao gồm các sản phẩm trao đổi chất trung gian (acid amin, lipid và nucleotide), hormone, các phân tử tín hiệu và các chất chuyển hoá thứ cấp. Các phân tử này là các sản phẩm cuối cùng của sự biểu hiện gene và sự hiểu biết về các chất này cung cấp những thông tin về mối tương quan giữa kiểu gene và kiểu hình cũng như sự tương tác giữa gene và môi trường [61]. Nghiên cứu của Houghton (2002) ghi nhận có sự khác biệt về hàm lượng một số acid amin (alanine, arginine, glutamin, methionine và asparagine) trong môi trường nuôi cấy ở những phôi có và không có khả năng phát triển lên phôi nang với độ chính xác trên 95% [71]. Trong khi đó, Brison và cộng sự (2004) ghi nhận có sự thay đổi về hàm lượng của các acid amin trong môi trường nuôi cấy từ hợp tử đến phôi 2 tế bào. Đặc biệt hàm lượng asparagine, glycine và leucine có liên quan đến tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ sinh sống [37]. Tuy nhiên, việc đánh giá các chất chuyển hoá gặp khó khăn trong việc chuẩn hoá các kĩ thuật phân tích do các qui trình nuôi cấy khác nhau của các labo HTSS, sự khó khăn trong việc thu môi trường từ vi giọt nuôi cấy, ảnh hưởng của dầu khoáng lên kết quả cũng như thời gian dài để tách chiết và phân tích các chất chuyển hoá từ môi trường.

Đánh giá phôi dựa trên biểu hiện của gene trên tế bào hạt

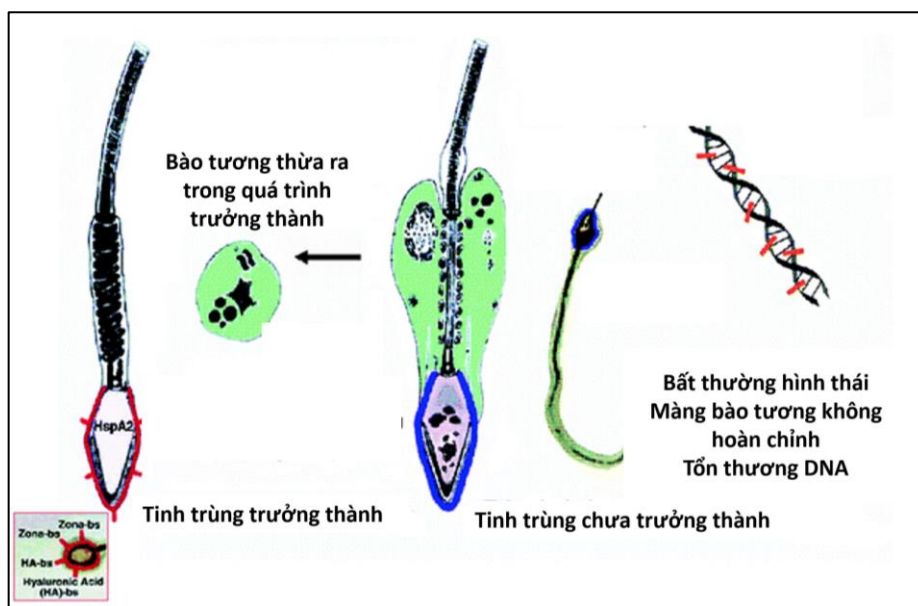
Trong nhiều năm qua, sự biểu hiện gene của tế bào hạt đã được sử dụng như một yếu tố đánh giá chất lượng noãn, hình thái của phôi và kết quả thai. Hiện nay có thể sử dụng phương pháp microarray và RT-PCR để đánh giá sự biểu hiện gene của tế bào hạt. Tuy nhiên, cho đến nay mặc dù các kỹ thuật hiện đại cho phép biểu hiện biểu hiện gene của các mẫu vật nhỏ như noãn và tế bào hạt, vẫn chưa hiểu hết được mối tương quan phức tạp giữa noãn và các tế bào hạt bao xung quanh chúng, sinh lý sự phát triển của noãn. So sánh các biểu hiện gene của tế bào hạt ở noãn không thụ tinh so với noãn có khả năng phát triển thành phôi ngày 3 bình thường thấy 160 gene đã được biểu hiện khác biệt giữa hai nhóm. Hiện nay có nhiều gene đã được khảo sát có liên quan đến chất lượng noãn, phôi và khả năng có thai bao gồm *PTX3*, *PTGS2*, *BDNF*, *STAR*, *AREG*, *BCL2L11*, *PCK1*, *NFIB*... [167].

1.3. KỸ THUẬT CHỌN LỌC TINH TRÙNG SINH LÝ

Sự ra đời của phương pháp ICSI là một trong những bước đột phá lớn trong lĩnh vực y học sinh sản. Kể từ khi những ca sinh sống đầu tiên với ICSI được báo cáo vào năm 1992, kỹ thuật này đã được triển khai như một công cụ mạnh mẽ để điều trị hầu hết các loại vô sinh nam, cũng như khắc phục tình trạng thụ tinh không thành công.

Trong tự nhiên, sự di chuyển của tinh trùng trong đường sinh dục nữ là quá trình chọn lọc cực kỳ nghiêm ngặt nhằm lựa chọn được những tinh trùng trưởng thành, có mức độ toàn vẹn DNA cao. Về mặt kỹ thuật, ICSI được xem là một kỹ thuật mang tính “xâm lấn”, khi một tinh trùng được đưa trực tiếp vào bào tương noãn đã trưởng thành, mà không trải qua các giai đoạn của thụ tinh tự nhiên. Trước khi tiến hành tiêm tinh trùng, các tế bào quanh noãn sẽ được tách bỏ và với sự hỗ trợ của hệ thống vi thao tác, tinh trùng sẽ được tiêm trực tiếp vào bào tương noãn. Như vậy, các “hàng rào” sinh học tự nhiên đã hoàn toàn bị vượt qua. Do đó, trong ICSI, việc lựa chọn tinh trùng để tiêm vào vào tương noãn rất quan trọng. Hiện nay, bước kỹ thuật này chủ yếu dựa vào kinh nghiệm của chuyên viên phôi học, thông qua việc quan sát đánh giá hình dạng và di động của tinh trùng dưới kính hiển vi. Vì vậy, những kỹ thuật chọn lọc được tinh trùng thực hiện ICSI để nâng cao tỉ lệ thụ tinh và phát triển phôi là điều cần thiết.

Acid hyaluronic là một hoạt chất hiện diện ở rất nhiều loại mô trong cơ thể như tổ chức da, biểu bì, khớp, mắt... và là một thành phần quan trọng trong các dịch tiết của đường sinh dục. Bên cạnh đó, acid hyaluronic có trong phức hợp tế bào hạt xung quanh noãn. Những tinh trùng trưởng thành có thụ thể với acid hyaluronic ở màng bào tương đầu tinh trùng. Khi tinh trùng gắn được với acid hyaluronic, đồng thời là gắn với phức hợp tế bào hạt quanh noãn, sau đó có thể trải qua được những bước tiếp theo của quá trình thụ tinh tự nhiên [75]. Hiện tại, một số phương pháp chọn lọc tinh trùng tiên tiến đã được phát triển theo các cơ chế chọn lọc tự nhiên. Trong số đó, chọn lựa tinh trùng dựa vào sự trưởng thành của màng tế bào ở đầu tinh trùng đang được sử dụng rộng rãi, tinh trùng được chọn lọc từ nguyên lý này dùng để thực hiện ICSI (gọi là kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý thực hiện ICSI - Physiological ICSI). Phương pháp này giúp lựa chọn được tinh trùng có tính toàn vẹn DNA và khả năng trưởng thành cao, đã được chứng minh là có hiệu quả đối với nhóm có tổn thương DNA cao [70].

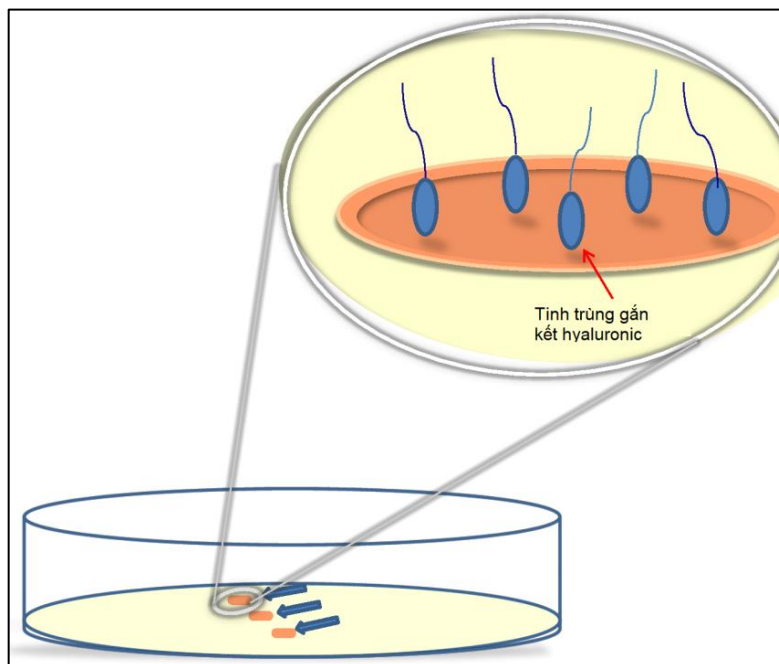


Hình 1.12. Tinh trùng trưởng thành có thụ thể gắn acid hyaluronic ở màng và tinh trùng chưa trưởng thành [73]

Các tác giả đề nghị xác định chỉ số gắn kết acid hyaluronic dựa theo xét nghiệm tinh trùng gắn acid hyaluronic (acid hyaluronic binding assay - HBA) của tinh trùng có thể được sử dụng để tiên lượng khả năng thành công của các kỹ thuật HTSS. Nếu khả năng gắn kết $HBA \leq 60\%$ nên thực hiện kỹ thuật ICSI, $HBA \geq 80\%$

có thể tiến hành bơm tinh trùng vào buồng tử cung và trong khoảng 60 - 80%, có thể tiến hành IVF [74]. Do đó, kỹ thuật khảo sát gắn kết acid hyaluronic như một xét nghiệm sàng lọc để góp phần lựa chọn phương án điều trị cho những trường hợp vô sinh chưa rõ nguyên nhân. Trong khảo sát khả năng gắn kết, sự gắn kết với acid hyaluronic của tinh trùng xuất hiện ở phần đầu của tinh trùng, chỉ những tinh trùng nào gắn kết chặt với acid hyaluronic thì mới có đạt độ trưởng thành cao, không còn giọt bào tương, có cấu trúc túi cực đầu toàn vẹn [75].

Hiện nay, có hai dạng sản phẩm có chứa acid hyaluronic, một là đĩa petri đã được phủ vi điểm acid hyaluronic lên trên (PICSI - Origio, Måløv, Denmark), được Ủy ban Châu Âu EC chấp thuận cho sử dụng trên người [87], và chế phẩm còn lại là môi trường có chứa acid hyaluronic (Sperm Slow, Origio). Thực hiện lựa chọn tinh trùng dựa trên khả năng gắn kết với acid hyaluronic ở các vi điểm acid hyaluronic trên bề mặt đĩa, khi nhỏ dịch tinh trùng sau lọc rửa vào vị trí có acid hyaluronic và ủ trong 8 – 10 phút, sẽ xảy ra gắn kết ở phần đầu tinh trùng, khi quan sát dưới kính hiển vi thấy tinh trùng bám vào đáy đĩa và tinh trùng di động đuôi tại chỗ bám [116]. Lựa chọn tinh trùng bám tại chỗ để thực hiện tiêm tinh trùng vào bào tương của noãn, như vậy được gọi là kỹ thuật PICSI – kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý.



Hình 1.13. Minh họa sự gắn kết acid hyaluronic của tinh trùng ở đĩa PICSI [127]

1.4. CÁC NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN

1.4.1. Nghiên cứu về mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và chỉ số tinh dịch đồ

Nghiên cứu trên thế giới

Với phương pháp đánh giá phân tán chất nhuộm sắc, trong nghiên cứu của Al Omrani và cộng sự (2018), mức độ phân mảnh DNA cao $DFI \geq 30\%$ chiếm tỉ lệ 13,83% những nam giới những cặp vợ chồng vô sinh, mức DFI trung bình ($15 - < 30\%$) và mức thấp ($< 15\%$) lần lượt là 32,98% và 53,19% [26]. Tác giả Borges và cộng sự (2019) nghiên cứu sự ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng đến kết quả thụ tinh ống nghiệm ở những cặp vợ chồng có nguyên nhân vô sinh không do nam giới (các trường hợp có chỉ số tinh trùng bình thường). Sử dụng kỹ thuật phân tán chất nhuộm sắc có kết quả tỉ lệ nam giới có $DFI \geq 30\%$ là 8,84%. Mức DFI trung bình ở nhóm $DFI < 30\%$ là $17,48 \pm 8,70\%$, và ở nhóm $DFI \geq 30\%$ là $37,67 \pm 6,39\%$. Nhóm $DFI < 30\%$ có tỉ lệ tinh trùng di động tiến tới cao hơn so với nhóm $DFI \geq 30\%$ ($54,90 \pm 14,27\%$ so với $46,50 \pm 16,77\%$, $p < 0,001$) [35].

Tác giả Sivanarayana và cộng sự (2014) áp dụng kỹ thuật phân tán chất nhuộm sắc trong đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng, kết quả cho thấy số lượng tinh trùng trung bình cao hơn đáng kể ở nhóm $DFI < 30\%$ so với nhóm $DFI \geq 30\%$: ($98,36 \pm 74,27 \times 10^6$ so với $64,21 \pm 67,81 \times 10^6$, $p < 0,001$). Khả năng di động, di động tiến tới nhanh và tiến tới chậm ở nhóm $DFI < 30\%$ cao hơn đáng kể so với nhóm $DFI \geq 30\%$, lần lượt là ($21,40 \pm 11,53$ so với $13,58 \pm 11,31$) ($31,23 \pm 14,97$ so với $22,37 \pm 12,70$) ($p < 0,001$). Tương tự, tỉ lệ hình dạng tinh trùng bất thường ở nhóm $DFI < 30\%$ ít hơn có ý nghĩa so với nhóm $DFI \geq 30\%$ ($90,06 \pm 7,12$ so với $92,90 \pm 5,55$) ($p < 0,001$) [144].

Tác giả Muriel và cộng sự chỉ ra mối tương quan nghịch giữa DFI và hình dạng tinh trùng ($r = -0,29$, $p = 0,04$). Hơn nữa, độ di động tiến tới của tinh trùng có tương quan nghịch với tỉ lệ tinh trùng có quầng halo nhỏ ($r = -0,22$, $p = 0,04$) và tương quan thuận với tỉ lệ tinh trùng có quầng halo lớn ($r = 0,30$, $p < 0,01$) [104].

Nghiên cứu của tác giả Chi HJ và cộng sự (2018) đánh giá chỉ số tinh trùng bằng máy phân tích tinh dịch tự động và sử dụng kỹ thuật phân tán chất nhuộm sắc

để đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng. Kết quả cho thấy DFI có mối tương quan nghịch với khả năng di chuyển của tinh trùng ($r = -0,435$, $p < 0,001$) và hình dạng bình thường ($r = -0,153$, $p < 0,05$). DFI cũng cho thấy mối tương quan đáng kể với khả năng di chuyển nhanh ($r = -0,436$, $p < 0,001$), và các thông số động học của vận tốc đường đi trung bình ($r = -0,403$) và tuyến tính ($r = -0,412$) [39].

Nghiên cứu trong nước

Ở Việt Nam, nhóm nghiên cứu của tác giả Lê Minh Tâm (2019), đánh giá 318 nam giới ở các cặp vợ chồng vô sinh tại trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế. Kết quả ghi nhận tỉ lệ có mức độ phân mảnh tinh trùng thấp ($DFI < 30\%$) và cao ($DFI \geq 30\%$) lần lượt là 78,3% và 21,7%, mức DFI thấp nhất là 3,6% và mức cao nhất là 99,2%. Mức độ phân mảnh DNA tinh trùng tương quan dương với tỷ lệ bất thường đầu tinh trùng ($r = 0,202$, $p = 0,0003$) và tương quan âm với khả năng di động tiến tới ($r = -0,168$, $p = 0,0027$). Các yếu tố: tuổi, thuốc lá và rượu ảnh hưởng đến mức độ phân mảnh DNA tinh trùng, có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ [147].

Tác giả Hồ Mạnh Tường và cộng sự (2020) báo cáo mức độ phân mảnh DNA tinh trùng khi đánh giá bằng kỹ thuật khảo sát cấu trúc chromatin tinh trùng với kết quả DFI trung bình là $19,16 \pm 13,68\%$. Trong đó, số bệnh nhân có DFI thấp ($\leq 15\%$) với tỉ lệ 51,5%, trung bình ($15 < DFI \leq 30\%$) là 29,3% và DFI cao ($> 30\%$) chiếm tỉ lệ 19,2%. Nhóm DFI thấp có tỉ lệ tinh trùng di động cao hơn hai nhóm còn lại ($54,20 \pm 13,61\%$ so với $41,14 \pm 15,82\%$ và $43,21 \pm 15,11\%$, $p < 0,001$). Chỉ số phân mảnh DNA tương quan thuận với tuổi bệnh nhân ($r = 0,376$, $p < 0,001$) và tương quan nghịch với độ di động của tinh trùng ($r = -0,477$, $p < 0,001$) [16].

Nghiên cứu của tác giả Dương Thị Nhân (2020) đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng bằng kỹ thuật khảo sát cấu trúc chất nhuộm sắc tinh trùng trên 151 mẫu. Giá trị DFI là $21,58 \pm 15,53\%$, có mối tương quan nghịch giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng với pH tinh dịch ($r = -0,02$ và $p = 0,012$), mật độ tinh trùng ($r = -0,26$, $p = 0,02$), tỉ lệ tinh trùng sống ($r = -0,32$ và $p < 0,001$) [6].

Tác giả Nguyễn Đắc Nguyên và cộng sự năm 2021, đánh giá một số yếu tố liên quan đến cặp vợ chồng vô sinh nguyên phát, kết quả cho thấy nguyên nhân vô sinh do cả 2 vợ chồng là 54,9%, trong đó vô sinh nam chiếm 21,3% và vô sinh nữ chiếm 18,7%. Nguyên nhân vô sinh nam chủ yếu là bất thường tinh trùng (78%). Tỷ lệ mẫu bất thường tinh dịch đồ ở nhóm đứt gãy DNA tinh trùng cao và trung bình cao hơn nhiều so với nhóm DFI thấp (tỷ lệ tương ứng là 82,1% và 81,5% so với 54,5%), với $p = 0,048$. DFI của nhóm tinh dịch đồ bất thường là $29,5 \pm 19,0\%$, cao hơn so với nhóm tinh dịch đồ bình thường, với DFI trung bình là $24,5 \pm 21,1\%$ ($p = 0,065$) [5].

Ngoài ra ở Việt Nam có một số công bố về mức độ phân mảnh DNA tinh trùng ở nam giới cặp vợ chồng vô sinh [14], [16], hoặc ở những trường hợp bệnh nhân nam có bệnh lý giãn tĩnh mạch thừng tinh [1], các nghiên cứu thực hiện ở cỡ mẫu nhỏ, trên những nhóm bệnh nhân khác nhau và chưa có nhiều phân tích chi tiết về mối tương quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và các chỉ số tinh trùng. Nghiên cứu này được thực hiện trên cỡ mẫu đủ lớn, đối tượng là người nam ở cặp vợ chồng vô sinh và đánh giá các mối liên quan, kết quả của nghiên cứu sẽ là cơ sở đánh giá chức năng sinh sản nam, cũng như ứng dụng trong điều trị vô sinh nam.

1.4.2. Nghiên cứu về mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả thụ tinh trong ống nghiệm

Nghiên cứu trên thế giới

Tác giả Sivanarayana và cộng sự năm 2014, nghiên cứu chia 2 nhóm mức độ phân mảnh DNA tinh trùng, bao gồm phân mảnh DNA thấp ($DFI < 30\%$) và phân mảnh DNA cao ($DFI \geq 30\%$). Kết quả cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở tỉ lệ thụ tinh giữa hai nhóm, tuy nhiên số lượng phôi tiến triển đến ngày thứ 3 và số phôi nang thu được cao hơn ở nhóm $DFI < 30\%$ [144].

Simon và cộng sự (2014), nghiên cứu 215 mẫu tinh trùng của các cặp vợ chồng vô sinh. Phân mảnh DNA tinh trùng được đánh giá bằng kỹ thuật Comet, phân chia thành ba nhóm: phân mảnh thấp $< 30\%$, phân mảnh mức trung bình (31% - 70%) và phân mảnh cao (71% - 100%). Kết quả cho thấy khả năng thụ tinh ở

nhóm nguyên nhân do vợ cao hơn do chồng và nhóm không rõ nguyên nhân (20,85% so với 8,22% và 7,30%, $p < 0,001$). Trong giai đoạn phôi ngày 1-2 và 3-5 thì nhóm phân mảnh DNA thấp có tỉ lệ phôi chất lượng tốt cao hơn ($p < 0,05$) và tỉ lệ phôi chất lượng kém ($p < 0,05$) thấp hơn so với nhóm có phân mảnh DNA cao. Khả năng thành công của chuyển phôi thấp hơn ở nhóm phân mảnh DNA cao (33,3%) so với nhóm phân mảnh DNA mức trung bình (55,26%, $p < 0,001$). Tỉ lệ thành công sau chuyển phôi nang (58,33%) cao hơn khi chuyển phôi nang giai đoạn sớm (53,85%, $p = 0,554$) và giai đoạn phôi dâu (34,40%, $p < 0,001$) [141].

Năm 2017, nghiên cứu của Alvarez Sedo và cộng sự đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng bằng kỹ thuật TUNEL lên kết quả ICSI, chia nhóm DFI $< 15\%$ và $\geq 15\%$. Kết quả có mối tương quan nghịch ($r = -0,5$) giữa mức độ phân mảnh DNA và tỉ lệ tạo phôi nang, tuy nhiên, tỉ lệ thụ tinh không bị ảnh hưởng. Sự phân mảnh DNA tinh trùng có tương quan nghịch với tỉ lệ phôi nang và tỉ lệ có thai ngay cả ở noãn chất lượng tốt [29].

Kết quả của nhóm tác giả Zheng và cộng sự năm 2018 chỉ ra độ phân mảnh DNA tinh trùng không ảnh hưởng đáng kể đến kết quả thụ tinh nhưng lại làm giảm rõ rệt tỉ lệ phát triển thành phôi nang và tỉ lệ có thai. So sánh giữa các nhóm DFI $\leq 10\%$, 11 - 20% và $> 20\%$: tỉ lệ thụ tinh đều duy trì khoảng trên 75% ở cả 3 nhóm nhưng tỉ lệ hình thành phôi nang giảm đáng kể ở nhóm DFI $> 20\%$ so với 2 nhóm còn lại (50,1% so với 70,6 và 78,5%) [169].

Đánh giá ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng với hình thành phôi ở những trường hợp có đáp ứng buồng trứng bình thường khi thực hiện IVF/ICSI. Tác giả Kim SM và cộng sự năm 2109 ghi nhận tác động của phân mảnh DNA tinh trùng lên chất lượng phôi. DFI có xu hướng tương quan nghịch với tỉ lệ hình thành phôi tốt ngày 3. Phân tích đường cong ROC cho thấy ngưỡng DFI 30,7% cho khả năng dự đoán tỉ lệ hình thành phôi chất lượng tốt $> 70\%$. Tỉ lệ hình thành phôi chất lượng tốt ngày 3 ở nhóm có DFI $< 30,7\%$ cao hơn đáng kể so với nhóm DFI $\geq 30,7\%$. Ở những phụ nữ đáp ứng buồng trứng tốt, DFI cao làm giảm tỉ lệ hình thành phôi giai đoạn phân chia, góp phần chứng minh yếu tố từ nam giới có ảnh hưởng đến chất lượng phôi thụ tinh trong ống nghiệm [84].

Nghiên cứu của tác giả Cheng và cộng sự báo cáo năm 2020 trên 2067 chu kỳ ICSI, giá trị DFI được chia thành 3 nhóm: DFI < 15%, 15 - 30% và > 30%. Kết quả không có sự khác biệt về tỉ lệ thai lưu ở cả 3 nhóm. Giới tính, tuổi thai, sinh non và cân nặng khi sinh không có sự khác biệt đáng kể, tuy nhiên tuổi thai lớn hơn đáng kể đối với các cặp sinh đôi trong nhóm DFI <15% và DFI >30%. Tỉ lệ sinh non ở các cặp sinh đôi trong nhóm DFI < 15% thấp hơn đáng kể so với nhóm 15 - 30%. Dù vậy, không có sự khác biệt đáng kể về cân nặng trẻ sơ sinh, tỉ lệ dị tật bẩm sinh. Như vậy, các kết quả từ nghiên cứu cho thấy DFI không ảnh hưởng đến kết quả lâm sàng và trẻ sơ sinh ở chu kỳ ICSI [38].

Tác giả Setti A và cộng sự với công bố trong năm 2021 thực hiện nghiên cứu nhằm đánh giá tác động của phân mảnh DNA tinh trùng lên kết quả lâm sàng ở người vợ với các nhóm tuổi khác nhau. 3 nhóm tuổi: ≤ 36 tuổi ($n = 285$), 37- 40 tuổi ($n = 147$) và > 40 tuổi ($n = 108$). Kết quả ở nhóm trẻ tuổi (≤ 36 tuổi) và 37- 40 tuổi, không có bất kỳ sự khác biệt nào về kết quả phôi và kết quả thai ở những trường hợp có DFI < 30% hoặc DFI $\geq 30\%$. Ở nhóm > 40 tuổi, tỉ lệ phôi tốt ngày 3 (54,4% với 33,1%; $p = 0,005$), tỉ lệ hình thành phôi nang (49,6% với 30,2%; $p = 0,035$), tỉ lệ phôi nang tốt (70,6% với 44,6%; $p = 0,014$) ở nhóm DFI <30% cao hơn đáng kể so với nhóm DFI $\geq 30\%$. Ngoài ra, nhóm DFI $\geq 30\%$ có kết quả thấp hơn so với nhóm DFI < 30% ở tỉ lệ thai (7,7% so với 20,0%, $p = 0,04$) và tỉ lệ làm tổ (11,9% so với 19,7%, $p < 0,001$). Noãn ở những người vợ lớn tuổi khi được thụ tinh với tinh trùng phân mảnh DNA cao sẽ phát triển thành phôi có chất lượng kém, từ đó dẫn đến tỉ lệ làm tổ và tỉ lệ thai thấp, tăng nguy cơ sảy thai ở các chu kỳ ICSI [138].

Nghiên cứu trong nước

Tác giả Nguyễn Minh Tài Lộc và cộng sự (2016), nghiên cứu trên 65 mẫu tinh dịch của các cặp vợ chồng được thực hiện ICSI, sự phân mảnh DNA tinh trùng được đo bằng phương pháp khảo sát cấu trúc nhiễm sắc chất tinh trùng. Kết quả cho thấy chỉ số DFI tương quan nghịch với tỉ lệ thụ tinh sau ICSI có ý nghĩa thống kê. Tỉ lệ thụ tinh ở nhóm bệnh nhân có chỉ số DFI > 15% thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm bệnh nhân có DFI $\leq 15\%$ (84% so với 91%; $p = 0,03$). Không tìm thấy sự tương quan có ý nghĩa thống kê giữa chỉ số DFI và chất lượng phôi. Tỉ số nguy

cơ (ORs) được ước tính cho kết quả thai sinh hóa, thai lâm sàng sau 8 tuần không có ý nghĩa thống kê ở 2 nhóm DFI [4].

Nghiên cứu tác giả Nguyễn Thị Quỳnh Tiên và cộng sự năm 2018, xác định mối tương quan giữa chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng được đo bằng phương pháp khảo sát độ phân tán chất nhuộm sắc và kết quả ICSI. Thực hiện trên 160 chu kỳ, ghi nhận không có mối tương quan giữa chỉ số phân mảnh DNA và kết quả ICSI, bao gồm: tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi ngày 3 và tỉ lệ phôi hữu dụng ngày 3 ($p > 0,05$). Thai lâm sàng ở ba nhóm DFI ($< 15\%$, $15-30\%$, $> 30\%$) không có sự khác biệt, bao gồm: tỉ lệ β hCG > 25 mIU/mL (tương ứng là 49%, 57% và 60%), tỉ lệ thai lâm sàng (tương ứng là 33%, 47% và 20%) và tỉ lệ sảy thai (tương ứng là 6,5%, 13,3% và 0%) ($p > 0,05$) [14].

Một số nghiên cứu đã chỉ ra mối tương quan giữa sự phân mảnh DNA tinh trùng tới khả năng thụ tinh, chất lượng phôi trong thụ tinh trong ống nghiệm, kết quả thai sau chuyển phôi. Tuy nhiên có nghiên cứu báo cáo không có mối tương quan, hoặc có tương quan yếu giữa DFI và kết quả thụ tinh và phôi. Các nghiên cứu sử dụng những kỹ thuật đánh giá DNA tinh trùng khác nhau và số lượng chu kỳ IVF/ICSI chênh lệch. Việc áp dụng kết quả xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng để đánh giá các kết quả của thụ tinh trong ống nghiệm còn chưa thống nhất. Do đó, cần thêm các nghiên cứu có bằng chứng tốt để có thể đưa ra kết luận đáng tin cậy về mối liên quan này, phân mảnh DNA tinh trùng có thực sự ảnh hưởng đến sự thụ tinh, và phôi bào ở kỹ thuật ICSI? Kết quả của nghiên cứu sẽ là bằng chứng có giá trị để giúp bác sĩ lâm sàng có những thông tin cụ thể, để đưa ra phác đồ điều trị phù hợp cho các cặp vợ chồng vô sinh.

1.4.3. Nghiên cứu về hiệu quả của kỹ thuật chọn lọc tinh trùng đến kết quả thụ tinh trong ống nghiệm

Nghiên cứu trên thế giới

Trong nghiên cứu của tác giả Parmegiani và cộng sự năm 2010 báo cáo tỉ lệ tạo phôi chung ở nhóm PICS (sử dụng môi trường hyaluronic acid-based SpermSlow) cao hơn đáng kể ($95,0 \pm 0,8$) so với nhóm ICSI ($84,0 \pm 1,1$, $p < 0,001$).

Tỉ lệ phôi chất lượng tốt nhất trong nhóm PICSI cao hơn đáng kể so với trong nhóm ICSI (35,8% so với 24,1%, $p < 0,046$). Mặc dù sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, xu hướng về tỉ lệ thụ tinh, làm tổ, và mang thai cao hơn được thấy trong nhóm PICSI [115].

Mokanszki và cộng sự năm 2014 đánh giá hiệu quả của PICSI dựa trên ngưỡng tỉ lệ tinh trùng có gắn kết acid hyaluronic ($HBA \leq 60\%$ và $> 60\%$). Kết quả cho thấy tỉ lệ thụ tinh cao hơn đáng kể của nhóm PICSI với $HBA > 60\%$, tỉ lệ làm tổ của nhóm PICSI với $HBA \leq 60\%$ và tỉ lệ mang thai lâm sàng trong mỗi nhóm PICSI so với nhóm ICSI ($p < 0,01$). Mỗi tương quan có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ tinh trùng và khả năng liên kết acid hyaluronic ($r = 0,62$, $p < 0,001$) và có mối quan hệ chặt chẽ hơn giữa điểm HBA và tỉ lệ làm tổ ($r = 0,53$) so với giữa mật độ tinh trùng và tỉ lệ làm tổ ($r = 0,14$) [103].

Một nghiên cứu lâm sàng, mới được công bố trong năm 2021 của nhóm tác giả Hozyen M và cộng sự. Thử nghiệm ngẫu nhiên có đối chứng bao gồm 302 bệnh nhân có phân mảnh DNA cao với $DFI \geq 20,3\%$, được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm: nhóm chứng ICSI (sử dụng tinh trùng được lọc rửa thường quy theo phương pháp thang nồng độ) ($n = 72$), nhóm thu thập tinh trùng từ tinh hoàn ($n = 73$), PICSI ($n = 78$) và MACS (Magnetic-activated cell sorting – Phân tách tế bào bằng từ tính) ($n = 79$). Kết quả nhóm tinh trùng từ tinh hoàn có tỉ lệ phôi phân chia và tạo phôi nang thấp hơn đáng kể so với nhóm PICSI, ICSI hoặc MACS ($p = 0,001$). Tỉ lệ có thai cao nhất ở nhóm PICSI (69,6%), trong khi đó tỉ lệ có thai thấp nhất ở nhóm ICSI (51,4%) với $p = 0,025$. Nhóm PICSI cho thấy tỉ lệ làm tổ cao hơn đáng kể so với các nhóm khác ($p = 0,003$). Về tỉ lệ có thai diễn tiến, có sự khác biệt đáng kể giữa PICSI (62,8%) và MACS (62%) so với ICSI thường quy (45,8%). Bên cạnh đó, không có sự khác biệt đáng kể nào về tỉ lệ sảy thai giữa 4 nhóm. Kết luận, PICSI và MACS cho thấy sự cải thiện đáng kể về kết quả phôi thai và lâm sàng so với tinh trùng từ tinh hoàn hoặc tinh trùng được lọc rửa thường quy theo phương pháp thang nồng độ ở những bệnh nhân có phân mảnh DNA tinh trùng cao [72].

Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác báo cáo kết quả cho thấy PICSI chưa thực sự hiệu quả trong cải thiện kết quả thụ tinh trong ống nghiệm. Tác giả Choe và cộng sự (2012) đánh giá trên 219 noãn thu được từ 18 phụ nữ thực hiện chia đôi số noãn

PICSI (n = 107)/ ICSI (n = 112) ở những cặp vợ chồng vô sinh có thông số tinh trùng bình thường nhưng tỉ lệ thụ tinh thấp trong IVF trước đó hoặc nhiều lần thất bại IVF. Tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ phôi ngày 2 được ghi nhận ở PICSI thấp hơn so với nhóm ICSI, nhưng sự khác biệt không đáng kể. Tỉ lệ phôi ngày 3 thấp hơn đáng kể ở nhóm PICSI (56,0% so với 69,6%, $p = 0,038$). Tỉ lệ hình thành phôi nang và số lượng phôi chuyển giống nhau ở cả hai nhóm. Thành công của ICSI không liên quan đến số lượng phôi được thụ tinh bởi tinh trùng gắn acid hyaluronic. Áp dụng PICSI không hữu ích ở những cặp vợ chồng có thông số tinh trùng bình thường [40]. Kết luận này cũng được tác giả Majumdar (2013) chỉ ra trong nghiên cứu đánh giá hiệu quả của PICSI ở bệnh nhân vô sinh không rõ nguyên nhân có thông số tinh dịch bình thường. Kết quả cho thấy rằng PICSI chưa thể hiện rõ khả năng cải thiện kết quả ở những cặp vợ chồng vô sinh không rõ nguyên nhân [97].

Tác giả Miller và cộng sự (2019), thực hiện phân tích dữ liệu từ 16 trung tâm HTSS ở nước Anh, bao gồm 1381 chu kỳ PICSI và 1371 chu kỳ ICSI. Kết quả tỉ lệ có thai lâm sàng hoặc sinh non không khác biệt giữa 2 nhóm; ngược lại, tỉ lệ sảy thai ở nhóm PICSI thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm ICSI. Phân tích cho thấy không có bằng chứng về ảnh hưởng riêng biệt của kỹ thuật PICSI đối với tỉ lệ sảy thai theo điểm số gắn kết acid hyaluronic của tinh trùng, tuổi vợ, lần sảy thai trước, nồng độ FSH (Follicle-stimulating hormone – hormon kích thích nang noãn) hoặc AMH (Anti-Mullerian Hormone) của vợ, hoặc mật độ tinh trùng. Không có sự khác biệt giữa các nhóm về tỉ lệ thụ tinh và thai sinh hóa, tỉ lệ sinh sống. PICSI không làm tăng đáng kể tỉ lệ thai sống đủ tháng so với ICSI, nhưng tỉ lệ sảy thai ở các cặp vợ chồng trong nhóm PICSI đã giảm đáng kể, điểm số gắn kết acid hyaluronic dường như không dự đoán hoặc ảnh hưởng đến kết quả điều trị [102].

Nghiên cứu trong nước

Tại Việt Nam, mặc dù có một số trung tâm HTSS đã áp dụng kỹ thuật lựa chọn tinh trùng dựa trên khả năng gắn kết acid hyaluronic, tuy nhiên không có nhiều công bố hiệu quả của kỹ thuật này. Một nghiên cứu của nhóm tác giả Lê Thụy Hồng Khả, từ tháng 7/2010 đến tháng 12/2011 có 350 chu kỳ sử dụng môi trường acid hyaluronic - SpermSlow, so sánh với 350 chu kỳ ICSI thường quy. Kết quả sự

khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm về tỉ lệ thụ tinh, số phôi tốt, số phôi chuyển trung bình và số phôi trữ. Tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ làm tổ của nhóm PICSI không khác biệt so với nhóm ICSI. Nhóm PICSI có tỉ lệ thai diễn tiến cao hơn nhóm ICSI sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê. Các tác giả đưa ra kết luận, sử dụng acid hyaluronic để chọn lọc tinh trùng có thể làm tăng tỉ lệ thai diễn tiến của một chu kỳ ICSI. Nên sử dụng acid hyaluronic để chọn lựa được tinh trùng phù hợp sinh lý tự nhiên, giúp tăng tỉ lệ thành công trong kỹ thuật ICSI [3].

Kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý dựa trên khả năng gắn kết acid hyaluronic của tinh trùng là kỹ thuật có thể áp dụng được ở labo thụ tinh trong ống nghiệm, việc lựa chọn tinh trùng từ đĩa PICSI có phủ acid hyaluronic là một bước thu nhận tinh trùng giống như thao tác thu nhận tinh trùng trong ICSI để tiêm tinh trùng vào bào tương của noãn. Kỹ thuật này đang được các nghiên cứu thực hiện các thử nghiệm lâm sàng để tìm ra hiệu quả tối ưu trên những nhóm bệnh nhân khác nhau. Hiện nay đã có các nghiên cứu so sánh hiệu quả giữa các nhóm thực hiện như: PICSI, ICSI, IVF, và các phương pháp chọn lọc tinh trùng từ các kỹ thuật khác nhau...., có rất ít nghiên cứu thực hiện trên các chu kỳ noãn chị em (Sibling oocyte – Noãn chị em). Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam thực hiện theo phương pháp chọn lọc tinh trùng sử dụng đĩa PICSI, dựa trên khả năng sinh lý của tinh trùng trưởng thành, và thực hiện so sánh giữa PICSI và ICSI ở các chu kỳ noãn chị em để đạt được sự đồng nhất về nghiên cứu. Bên cạnh đó, nghiên cứu còn đánh giá hiệu quả của PICSI ở các trường hợp đặc điểm tinh trùng, mức độ phân mảnh DNA tinh trùng khác nhau. Nghiên cứu có giá trị khẳng định được khả năng áp dụng phương pháp mới trong HTSS, và có giá trị thực tiễn, các đơn vị HTSS khác có thể tham khảo, tìm ra phương pháp phù hợp áp dụng cho từng bệnh nhân cụ thể với mục đích mang đến sự thành công của các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Các cặp vợ chồng điều trị vô sinh bằng phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm (ICSI thường quy hoặc song song PICSI và ICSI thường quy) tại Trung tâm Nội tiết sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế trong thời gian từ 1/2019 – 3/2022.

2.1.1. Tiêu chuẩn chọn đối tượng

Mục tiêu 1

Các cặp vợ chồng vô sinh được thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm có các đặc điểm sau:

Người vợ: đầy đủ các thông tin về lâm sàng, cận lâm sàng. Kết quả số noãn chọc hút được ≥ 2 , có noãn trưởng thành MII để thực hiện ICSI.

Người chồng: đầy đủ các thông tin về lâm sàng, cận lâm sàng, xét nghiệm tinh dịch đồ, xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng. Mẫu tinh trùng của người chồng đủ điều kiện thực hiện xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng (mật độ tinh trùng $\geq 1 \times 10^6$ /mL).

Kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm: bằng kỹ thuật ICSI thường quy, có kết quả theo sự thụ tinh, sự phát triển của phôi ngày 2, phôi nang, kết quả chuyển phôi nang (nếu có).

Đồng ý tham gia nghiên cứu

Mục tiêu 2

Các cặp vợ chồng vô sinh được thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm có các đặc điểm sau:

Người vợ: đầy đủ các thông tin về lâm sàng, cận lâm sàng. Kết quả số noãn chọc hút được ≥ 10 , có đủ noãn trưởng thành MII để thực hiện chia đôi số noãn thực hiện kỹ thuật PICSI và ICSI thường quy.

Người chồng: đầy đủ các thông tin về lâm sàng, cận lâm sàng, xét nghiệm tinh dịch đồ, xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng. Mẫu tinh trùng của người chồng đủ điều kiện thực hiện đánh giá khả năng bám acid hyaluronic (mật độ tinh trùng $\geq 5 \times 10^6/\text{mL}$).

Kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm: bằng kỹ thuật PICSI và ICSI thường quy, có kết quả theo sự thụ tinh, sự phát triển của phôi ngày 2, phôi nang.

Đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

Mục tiêu 1

Người chồng bị giãn tĩnh mạch thường tinh, nhiễm trùng tiết niệu sinh dục, xuất tinh ngược dòng, hoặc có tiền sử phẫu thuật giãn tĩnh mạch thường tinh, bệnh lý tinh hoàn và thoát vị bẹn, các trường hợp không thể xuất tinh. Mẫu tinh trùng được bảo quản lạnh hoặc thu nhận từ phẫu thuật tinh hoàn; có số lượng tinh trùng thấp (dưới $1 \times 10^6/\text{mL}$) hoặc không có tinh trùng.

Các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm có xin tinh trùng hiến tặng (tinh trùng hiến tặng trong quy trình được bảo quản lạnh nên không nằm trong phương pháp của nghiên cứu); hoặc xin noãn hiến tặng.

Các trường hợp nuôi cấy phôi không đánh giá phôi ngày 2 và ngày 5/ngày 6.

Mục tiêu 2

Người chồng bị giãn tĩnh mạch thường tinh, nhiễm trùng tiết niệu sinh dục, xuất tinh ngược dòng, hoặc có tiền sử phẫu thuật giãn tĩnh mạch thường tinh, bệnh lý tinh hoàn và thoát vị bẹn, các trường hợp không thể xuất tinh. Mẫu tinh trùng được bảo quản lạnh hoặc thu nhận từ phẫu thuật tinh hoàn; có số lượng tinh trùng rất thấp (dưới $5 \times 10^6/\text{mL}$) hoặc không có tinh trùng.

Các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm có xin tinh trùng hiến tặng (tinh trùng hiến tặng trong quy trình được bảo quản lạnh nên không nằm trong phương pháp của nghiên cứu); hoặc xin noãn hiến tặng.

Trường hợp số noãn thu nhận < 10 .

Các trường hợp nuôi cấy phôi không đánh giá phôi ngày 2 và ngày 5/ngày 6.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Mục tiêu 1

- Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang
- Cỡ mẫu nghiên cứu:

$$\text{Áp dụng công thức: } n = Z_{(1-\alpha/2)}^2 \frac{p(1-p)}{d^2}$$

Trong đó:

n: Cỡ mẫu tối thiểu cần nghiên cứu.

$z_{(1-\alpha/2)}$: Hệ số tin cậy, ứng với độ tin cậy 95% $\rightarrow z_{(1-\alpha/2)} = 1,96$.

d: Độ chính xác tương đối mong muốn, $d = 0,05$

p: Tỷ lệ nam giới khám vô sinh có mức độ phân mảnh DNA tinh trùng cao (DFI > 30%), chọn $p = 0,192$ theo kết quả nghiên cứu của tác giả Hồ Mạnh Tường [16].

Thay các giá trị vào công thức tính, $n = 239$. Kết quả nghiên cứu thu thập được 242 cặp vợ chồng đáp ứng đủ tiêu chuẩn nghiên cứu.

Mục tiêu 2

- Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu can thiệp so sánh tương đồng
- Cỡ mẫu nghiên cứu: Phương pháp chọn cỡ mẫu thuận tiện, tất cả các cặp vợ chồng được thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm bằng cả 2 kỹ thuật PICSI và ICSI nằm trong tiêu chuẩn chọn đối tượng nghiên cứu (tổng số noãn thu được trong 1 chu kỳ ≥ 10 sẽ chia đôi số noãn, một nửa thực hiện kỹ thuật PICSI và một nửa thực hiện kỹ thuật ICSI thường quy). Kết quả nghiên cứu thu nhận được 74 cặp vợ chồng đáp ứng đủ tiêu chuẩn nghiên cứu.

2.2.2. Biến số, chỉ số nghiên cứu

2.2.2.1. Biến số, chỉ số đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Người vợ

- Tuổi: độ tuổi trung bình, nhóm tuổi < 35 và nhóm tuổi ≥ 35
- Chỉ số khối cơ thể (Body Mass Index – BMI)
- Đặc điểm vô sinh: thời gian vô sinh, vô sinh nguyên phát, vô sinh thứ phát
- Tiền sử sảy thai: có/không

- Tiền sử HTSS: có/không
- Nguyên nhân vô sinh: do người vợ, do người chồng, do cả hai, không rõ nguyên nhân.
- Đặc điểm vô sinh người vợ: do vòi tử cung, hội chứng buồng trứng đa nang, lạc nội mạc tử cung, tại tử cung (polyp tử cung, bất thường niêm mạc), giảm dự trữ buồng trứng. Số nguyên nhân vô sinh: 0, 1, 2, 3, 4 nguyên nhân.
- Đặc điểm nội tiết và noãn: AMH (ng/mL), FSH (mIU/mL), số noãn thu nhận, số noãn MII.

Người chồng

- Tuổi: độ tuổi trung bình, nhóm tuổi < 40 và nhóm tuổi ≥ 40
- BMI: giá trị trung bình, BMI < 23 và BMI ≥ 23 [43]
- Thói quen:
 - + Thuốc lá: không có/có thói quen hút thuốc lá hàng ngày (≥ 1 điếu/ngày)
 - + Uống bia, rượu: Không thường xuyên khi lượng tiêu thụ $\leq 1,3$ đơn vị cồn/ lần và tuần suất uống 1 - 3 ngày/tháng; Có uống thường xuyên khi lượng cồn tiêu thụ $> 1,3$ đơn vị/lần, và thói quen uống thường xuyên từ 1 – 4 ngày/tuần hoặc hơn, theo nghiên cứu của tác giả Tan Van Bui và cộng sự [152]. Đơn vị cồn được tính dựa vào công thức: Đơn vị cồn = $0,79 \times$ dung tích (mL) $\times$ nồng độ (%). Mỗi lon bia được ước lượng khoảng 330mL với nồng độ cồn 5%, rượu mạnh có nồng độ cồn khoảng 37% [2].

2.2.2.2. Biến số, chỉ số các chỉ số tình dục, phân mảnh DNA tinh trùng

Chỉ số tình dục (theo hướng dẫn của WHO 2010 [161])

- pH tinh dịch
- Thể tích (mL): giá trị trung bình
- Mật độ (10^6 /mL): giá trị trung bình. Nhóm mẫu tinh trùng ít khi mật độ $< 15 \times 10^6$ /mL; Nhóm mẫu tinh trùng mật độ bình thường khi mật độ $\geq 15 \times 10^6$ /mL (Theo ngưỡng tham khảo của WHO 2010 [161]).
- Độ di động tiến tới (%): giá trị trung bình. Nhóm mẫu tinh trùng yếu khi độ di động tiến tới $< 32\%$; Nhóm mẫu tinh trùng di động nhanh khi độ di động tiến tới $\geq 32\%$ (Theo ngưỡng tham khảo của WHO 2010 [161]).
- Tỷ lệ tinh trùng sống (%): giá trị trung bình

- Hình dạng bình thường: giá trị trung bình. Nhóm mẫu tinh trùng bình thường khi tỉ lệ tinh trùng hình dạng bình thường $\geq 4\%$; Nhóm mẫu tinh trùng dị dạng khi tỉ lệ tinh trùng hình dạng bình thường $< 4\%$ (Theo ngưỡng tham khảo của WHO 2010 [161]).

- Tỉ lệ bất thường đầu, bất thường cổ đuôi: giá trị trung bình

- Phân nhóm đặc điểm tinh trùng (Theo ngưỡng tham khảo của WHO 2010 [161]).

+ Tinh trùng bình thường: khi mật độ $\geq 15 \times 10^6/\text{mL}$, độ di động tiến tới $\geq 32\%$ và tinh trùng hình dạng bình thường $\geq 4\%$.

+ Tinh trùng bất thường: Có ít nhất 1 trong 3 đặc điểm: mật độ $< 15 \times 10^6/\text{mL}$, độ di động tiến tới $< 32\%$ và tinh trùng hình dạng bình thường $< 4\%$.

+ Tinh trùng yếu: khi độ di động tiến tới $< 32\%$

+ Tinh trùng dị dạng: hình dạng bình thường $< 4\%$.

+ Tinh trùng ít – yếu: mật độ $< 15 \times 10^6/\text{mL}$ và độ di động tiến tới $< 32\%$

+ Tinh trùng ít – yếu – dị dạng: cả 3 đặc điểm mật độ $< 15 \times 10^6/\text{mL}$, độ di động tiến tới $< 32\%$ và tinh trùng hình dạng bình thường $< 4\%$.

+ Tinh trùng yếu – dị dạng: độ di động tiến tới $< 32\%$ và hình dạng bình thường $< 4\%$.

- Đặc điểm tinh trùng sau lọc rửa: độ di động tiến tới, mật độ

Phân mảnh DNA tinh trùng

- Chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng: DFI, DFI được chia theo các ngưỡng giá trị theo nghiên cứu của tác giả Borges E và cộng sự (2019) [35], tác giả Chen L và cộng sự (2020) [38]:

+ DFI $< 15\%$: mức độ thấp

+ $15\% \leq \text{DFI} < 30\%$: mức độ trung bình

+ DFI $\geq 30\%$: mức độ cao

- Đặc điểm DNA tinh trùng:

+ Tỉ lệ quãng lớn (%)

+ Tỉ lệ quãng trung bình (%)

+ Tỉ lệ quãng nhỏ (%)

+ Tỉ lệ không quãng (%)

+ Tỉ lệ thoái hóa (%)

Tình trạng gắn kết acid hyaluronic

- Chỉ số tình trạng gắn kết hyaluronic acid
- Phân nhóm mức độ gắn kết $HBA \leq 60\%$, $HBA > 60\%$, theo cách chia nhóm của tác giả Mokanszki A và cộng sự (2014) [103]

2.2.2.3. Biến số, chỉ số kết quả thụ tinh trong ống nghiệm

Mục tiêu 1

- Số noãn trưởng thành
- Tỷ lệ thụ tinh (%): Số hợp tử/số noãn MII; giá trị trung bình và phân nhóm tỷ lệ thụ tinh $< 75\%$ và $\geq 75\%$ (theo cách phân nhóm của tác giả Nishihara T và cộng sự 2018 [107]).
- Kết quả hình thành phôi phân chia ngày 2 (Chia nhóm phôi theo tiêu chuẩn đánh giá phôi của đồng thuận Alpha (2011) [28])
 - + Tỷ lệ phôi phân chia ngày 2 (%): Số phôi phân chia ngày 2 hình thành/số hợp tử
 - + Tỷ lệ phôi phân chia độ 1 (%): Số phôi phân chia độ 1 ngày 2 hình thành/số hợp tử
 - + Tỷ lệ phôi hữu dụng ngày 2/hợp tử (%): Số phôi phân chia độ 1 và độ 2 ngày 2/số hợp tử
 - + Tỷ lệ phôi hữu dụng ngày 2/noãn MII (%): Số phôi độ 1 và độ 2 ngày 2/số noãn MII; giá trị trung bình và phân nhóm tỷ lệ $< 50\%$ và $\geq 50\%$
 - + Tỷ lệ phôi < 4 tế bào (%): Số phôi < 4 tế bào/tổng số phôi ngày 2
 - + Tỷ lệ phôi 4 tế bào (%): Số phôi 4 tế bào/tổng số phôi ngày 2
 - + Tỷ lệ phôi > 4 tế bào (%): Số phôi > 4 tế bào/tổng số phôi ngày 2
 - + Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương 0 - $< 10\%$ (%): Số phôi mảnh vỡ bào tương 0 - $< 10\%$ / tổng số phôi ngày 2
 - + $10\% \leq$ Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương $\leq 25\%$ (%): Số phôi có $10\% \leq$ Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương $\leq 25\%$ / tổng số phôi ngày 2
 - + Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương $> 25\%$ (%): Số phôi có mảnh vỡ bào tương $> 25\%$ /tổng số phôi ngày 2
- Kết quả hình thành phôi nang (Chia nhóm phôi theo tiêu chuẩn đánh giá phôi của tác giả Gardner DK và cộng sự [60])

- + Tỷ lệ tạo phôi nang/phôi ngày 2 (%): số phôi nang hình thành/số phôi ngày 2
- + Tỷ lệ tạo phôi nang độ 1/ phôi ngày 2 (%): Số phôi nang độ 1/số phôi ngày 2
- + Tỷ lệ tạo phôi nang /hợp tử (%): số phôi nang hình thành / số hợp tử
- + Tỷ lệ tạo phôi nang/ noãn MII (%): số phôi nang hình thành / noãn MII; giá trị trung bình và phân nhóm < 50% và $\geq 50\%$
- Kết quả chuyển phôi
- + Số phôi chuyển
- + Độ dày niêm mạc tử cung ngày chuyển phôi (mm)
- + β hCG: dương tính/âm tính
- + Túi thai: có/không
- + Thai phát triển ≥ 12 tuần: có/không

Mục tiêu 2

- Số noãn MII được PICSI – ICSI
- Số noãn thụ tinh ở PICSI – ICSI
- Tổng số phôi phân chia ngày 2 hình thành ở PICSI – ICSI
- Số phôi độ 1, độ 2 ngày 2 hình thành ở PICSI – ICSI
- Số phôi < 4 tế bào, 4 tế bào, > 4 tế bào hình thành ở PICSI – ICSI
- Số phôi có mảnh vỡ bào tương < 10%, số phôi có $10\% \leq$ mảnh vỡ bào tương $\leq 25\%$, số phôi có mảnh vỡ bào tương > 25% ở PICSI – ICSI
- Số phôi nang hình thành ở PICSI – ICSI
- Số phôi nang độ 1 hình thành ở PICSI – ICSI
- Số phôi nang độ 2 và 3 hình thành ở PICSI – ICSI

2.2.3. Quy trình tiến hành

Số liệu thu thập được điền vào phiếu nghiên cứu. Tất cả các cặp vợ chồng vô sinh được khám và điều trị thụ tinh trong ống nghiệm theo quy trình sau:

2.2.3.1. Khám lâm sàng, cận lâm sàng

- Khám lâm sàng người vợ: khai thác dữ liệu về tiền sử, bệnh sử. Khám lâm sàng, đo các chỉ số nhân trắc, siêu âm tử cung buồng trứng, chụp Xquang vòi tử cung, xét nghiệm nội tiết.

- Khám lâm sàng người chồng: khai thác dữ liệu về tiền sử, bệnh sử, dấu hiệu lâm sàng liên quan, đo các chỉ số nhân trắc.

Người thực hiện: bác sĩ lâm sàng, điều dưỡng

2.2.3.2. Xét nghiệm tinh dịch đồ, phân mảnh DNA tinh trùng

Xét nghiệm tinh dịch đồ

- Mẫu được lấy bằng cách thủ dâm và xuất tinh vào trong lọ chứa sạch, miệng rộng, với chất liệu nhựa không gây độc cho tinh trùng. Lọ được dán nhãn ghi họ tên, mã số cá nhân, ngày tháng và giờ lấy mẫu. Các quy trình và tiêu chuẩn đánh giá tinh dịch đồ theo hướng dẫn của WHO 2010 [161].

- Lọ đựng mẫu được vào tủ ấm (37⁰C) trong khi tinh dịch ly giải.

- Các chỉ số được khảo sát và ngưỡng giá trị:

+ Sự ly giải

+ Thể tích

+ pH

+ Đánh giá tỉ lệ sống của tinh trùng. Đánh giá bằng kỹ thuật nhuộm eosin: Trộn 5μl tinh dịch kết hợp với 5μl dung dịch eosin lên lam kính. Kiểm tra tiêu bản bằng kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400X. Đếm tổng số tế bào bắt màu (chết) và không bắt màu (sống). Khảo sát 200 tinh trùng, tính tỉ lệ phần trăm tinh trùng sống

+ Đánh giá hình dạng tinh trùng: chuẩn bị một phiến phết tinh dịch trên lam. Để khô, cố định và nhuộm lam bằng thuốc nhuộm Giemsa. Quan sát bằng kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000X trong dầu. Khảo sát khoảng 200 tinh trùng, tính tỉ lệ phần trăm hình dạng bình thường hoặc của hình dạng bình thường, bất thường đầu, bất thường cổ đuôi.

+ Đánh giá tinh trùng di động: nhỏ 10μL tinh dịch lên lam kính, phủ lamel và đánh giá độ di động ở vật kính 40X. Đếm 200 tinh trùng, tính trung bình. Dùng máy bách phân bạch cầu để phân loại tinh trùng. Trong vùng chọn giới hạn, cùng một thời gian đếm tinh trùng di động tiến tới, tinh trùng di động không tiến tới và tinh trùng không di động.

+ Đánh mật độ tinh trùng bằng buồng đếm Neubauer: xác định độ pha loãng tinh dịch cho phù hợp dựa theo số lượng tinh trùng trên vi trường 40X, thường chọn độ pha loãng lúc đánh giá di động. Dung dịch pha loãng NaHCO₃ 5%: Hoà tan 50g

NaHCO₃ trong 1000 mL nước cất, thêm vào 10mL formalin 35%. Nhỏ 10 μ L mẫu đã pha vào 2 buồng đếm. Đếm ít nhất 200 tinh trùng trên mỗi buồng của buồng đếm: Đánh giá lưới ô vuông số 5 trước, bắt đầu từ cạnh của lưới ô vuông, đếm tinh trùng theo từng hàng. Đếm số tinh trùng và số hàng bằng máy bách phân bạch cầu. Dựa vào độ pha loãng và số tinh trùng đếm được, các vùng khác nhau của buồng đếm được sử dụng để tính mật độ [161].

Xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng

- Hóa chất và dụng cụ: bộ kit Halosperm (kit G1 HT-HS10) (bao gồm dung dịch lysis, dung dịch acid HCl, agarose, lam kính); nước cất, cồn 70 độ, cồn 100 độ; thuốc nhuộm Giemsa; pipet, đầu côn, khay ngâm lam, máy ủ nhiệt khô, tủ lạnh.



Hình 2.1. Bộ Kit Halosperm

(Nguồn nhà sản xuất: <https://www.halotechdna.com/productos/halosperm>)

Mẫu tinh dịch sau khi thu nhận và được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất Kit Halosperm, theo quy trình như sau :

- Bước 1

Chuẩn bị thạch: làm nóng thạch bằng máy ủ cho đến khi hóa lỏng hoàn toàn, mỗi eppendorf chứa 100 μ L thạch agarose được sử dụng cho một mẫu tinh dịch.

- Bước 2

Chuẩn bị hỗn hợp tinh dịch - thạch: Pha loãng mẫu tinh dịch với dung dịch đệm PBS, đến tối đa 20×10^6 /mL tinh trùng.

- Bước 3

Hút 50 μ L mẫu tinh trùng đã pha loãng vào tuýp eppendorf chứa thạch. Trộn nhẹ nhàng bằng micropipette, tránh hình thành bọt khí.

- Bước 4

Nhỏ 8 μ L hỗn hợp tinh dịch - thạch lên vị trí được khoanh tròn trên lam kính ở vị trí S, đẩy lamel, ấn nhẹ, tránh bọt khí xuất hiện. Lam kính được đặt nằm ngang trong suốt quá trình thao tác.

- Bước 5

Đặt lam kính vào tủ lạnh 4°C trong 5 phút để thạch đông lại.

- Bước 6

Chuẩn bị dung dịch biến tính bằng cách pha 80 μ L dung dịch acid với 10mL nước cất và trộn đều, cho vào khay ủ.

- Bước 7

Sau khi hỗn hợp tinh dịch - thạch đông lại: Lấy lam kính ra khỏi tủ lạnh, bỏ lamel bằng cách trượt nhẹ ra.

- Bước 8

Chuyển lam kính và dung dịch biến tính DNA và ủ trong 7 phút (Không ủ quá thời gian)

- Bước 9

Lấy lam kính từ dung dịch biến tính và đặt vào khay chứa 10 mL dung dịch ly giải trong 25 phút.

- Bước 10

Sau khi kết thúc bước ly giải, đặt tiêu bản vào khay chứa nước cất trong 5 phút để rửa dung dịch ly giải.

- Bước 11

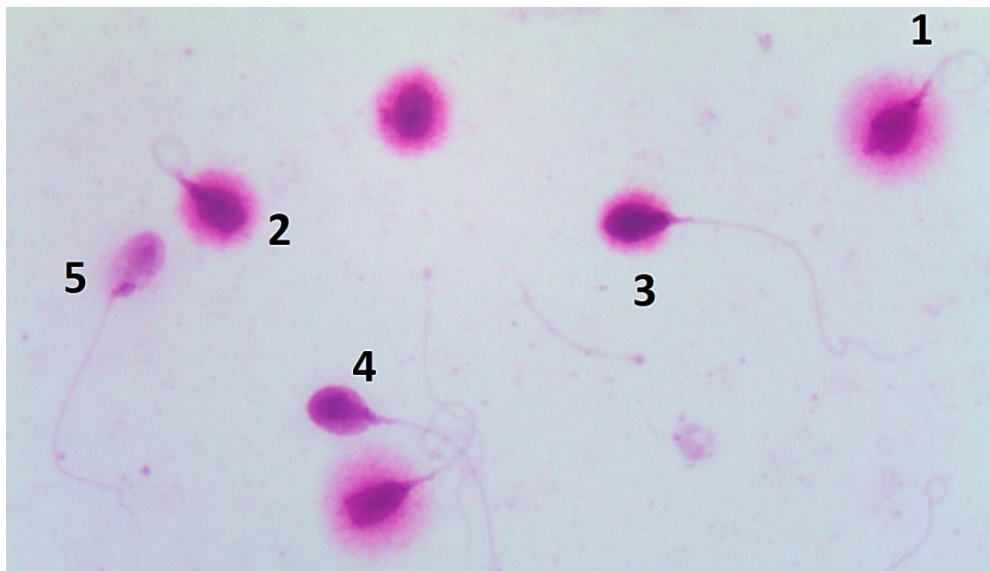
Khử nước bằng cách lần lượt cho tiêu bản vào dung dịch cồn 70%, và 100% trong vòng 2 phút mỗi dung dịch, sau đó để khô tự nhiên.

- Bước 12

Nhuộm mẫu: Đặt lam kính nằm ngang, nhỏ dung dịch Giemsa phủ lên trên bề mặt, để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút rồi rửa qua nước từ vòi, chú ý tránh rửa mạnh làm nhạt màu quang halo.

- Bước 13

Đánh giá kết quả: Quan sát lam kính dưới kính hiển vi quang học, đếm ít nhất 500 tế bào tinh trùng có đuôi trong tinh dịch để xác định độ phân mảnh DNA tinh trùng.



Hình 2.2. Hình ảnh tinh trùng trong xét nghiệm phân tán chất nhuộm sắc
(Hình ảnh kết quả mẫu tại Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh - Bệnh viện
Trường Đại học Y Dược Huế)

1: Tinh trùng có quầng lớn; 2: Tinh trùng có quầng trung bình. 3: Tinh trùng có quầng nhỏ; 4: Tinh trùng không có quầng. 5: Tinh trùng thoái hóa.

- Cách đánh giá quầng halo:

+ Tinh trùng có quầng lớn: Kích thước đường kính của quầng $\geq$ đường kính ngang của nhân.

+ Tinh trùng có quầng trung bình: $1/3$ đường kính ngang của nhân $<$ kích thước đường kính quầng $<$ đường kính ngang của nhân.

+ Tinh trùng có quầng nhỏ: Kích thước đường kính quầng $\leq 1/3$ đường kính ngang của nhân

+ Tinh trùng không quầng.

+ Tinh trùng thoái hóa: Tinh trùng có nhân bắt màu kém, không đều.

- Cách tính DFI:

$$\text{DFI (\%)} = \frac{\text{Tinh trùng quầng nhỏ} + \text{Tinh trùng không quầng} + \text{Tinh trùng thoái hóa}}{500 \text{ tinh trùng đếm được}} \times 100$$

2.2.3.3. Thực hiện các kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm

Kích thích buồng trứng và chọc hút noãn

Người vợ được điều trị bằng phương pháp kích thích buồng trứng có kiểm soát bằng phác đồ đối vận GnRH và FSH tái tổ hợp được dùng với liều khởi đầu 150-225 IU vào ngày thứ 2 của chu kỳ. Sau khi siêu âm để kiểm tra số lượng nang thứ cấp và loại trừ u nang buồng trứng. Liều khởi đầu của rFSH được chọn dựa trên tuổi của bệnh nhân, AMH và nang thứ cấp. Thuốc đối vận GnRH 0,25mg/ngày được bắt đầu vào ngày kích thích thứ 5 theo phác đồ cho đến ngày tiêm thuốc gây trưởng thành noãn. Trưởng thành noãn khi có 2 nang kích thước từ 18mm hoặc 3 nang kích thước từ 17mm trở lên bằng hCG 10000IU (IVF-C®, 5000IU) hoặc hCG 6500IU (Ovitrelle®, 250µg). Chọc hút noãn được thực hiện 35–36 giờ sau khi tiêm trưởng thành noãn. Noãn được chọc hút theo hướng dẫn siêu âm với kim một nòng (Kitazato, Nhật Bản) [10].

Kỹ thuật lọc rửa tinh trùng chuẩn bị cho thụ tinh trong ống nghiệm

Sử dụng 45% và 90% Sil-select plus (Fertipro, Beernem, Belgium), các mẫu tinh trùng được chuẩn bị bằng kỹ thuật ly tâm thang nồng độ với tỉ lệ: 1,5 mL tinh dịch: 1,5 mL 45% : 1,5mL 90%, ly tâm ở 350g trong 15 phút. Thu được cặn tinh trùng, mẫu tiếp tục được rửa hai lần với 3 mL môi trường SpermRinse (Vitrolife). Ly tâm 350g mỗi lần trong 10 phút. Kết quả thu được 0,3 mL môi trường tinh trùng, để chuẩn bị thụ tinh trong ống nghiệm [12], [161].

Thụ tinh trong ống nghiệm

Kỹ thuật ICSI thực hiện với noãn giai đoạn trưởng thành MII. Phức hợp noãn được lấy ra và rửa sạch trong đĩa 35 falcon có chứa 2mL G-MOPS PLUS, phủ 2mL Ovoil và ủ ở 37°C. Sau khi rửa, phức hợp noãn và tế bào hạt được ủ trong 1 mL G-IVF PLUS ở 37°C và 5,5% CO2 trong 2 giờ.

Phức hợp noãn được loại bỏ sạch tế bào hạt xung quanh noãn bằng môi trường tách noãn Hyase (Vitrolife). Noãn được ủ trong 100 µL giọt G-IVF PLUS phủ 3 mL Ovoil trong 1 giờ trước khi ICSI .

Tinh trùng và noãn được chuyển vào đĩa ICSI ngay trước khi tiến hành ICSI. Đĩa ICSI được đặt vào bệ ẩm của hệ thống kính hiển vi đảo ngược, chỉnh kim ICSI, kim Holding. Tiến hành bất động, làm rách màng bào tương đuôi tinh trùng và thu nhận tinh trùng vào đầu kim ICSI. Dùng kim holding hút nhẹ và giữ noãn, đánh giá sơ bộ noãn và chỉnh cực cầu nằm ở vị trí hướng 12 giờ hoặc 6 giờ. Kim holding giữ noãn ở hướng 9 giờ. Đâm kim ICSI ở vị trí 3 giờ, tạo thành hình nón ở màng bào tương noãn. Đẩy tinh trùng vào sát đầu kim ICSI, tránh để tinh trùng trôi ra. Đâm kim ICSI vào khoảng 2/3 đường kính noãn, làm thủng màng bào tương noãn, từ từ hút bào tương của noãn ngược ra, sau đó từ từ bơm bào tương noãn và tinh trùng vào. Đảm bảo tinh trùng đã nằm trong bào tương noãn và không bị kéo ra ngoài theo kim ICSI. Nuôi cấy noãn sau ICSI ở môi trường nuôi phôi trong tủ ẩm 37⁰C và 6% CO₂. Nuôi cấy phôi theo phương pháp nuôi cấy đơn bước không chuyển tiếp và đơn giọt: mỗi phôi được nuôi cấy riêng trong từng giọt môi trường. Kiểm tra thụ tinh sau 16 – 18 giờ [12].

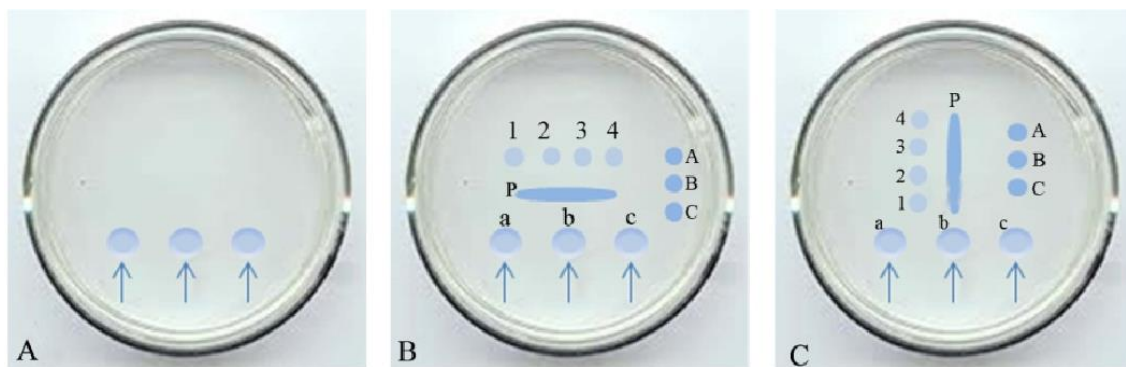
Kỹ thuật PICSI – Chọn lọc tinh trùng

Đĩa PICSI được chuẩn bị bằng cách ủ các vi điểm acid hyaluronic với các giọt 10 μ L môi trường nuôi cấy GMOPS và giọt polyvinylpyrrolidone được thêm vào đĩa để làm bất động tinh trùng. Thêm 2 μ L huyền phù tinh trùng sau lọc rửa được nhỏ vào vi điểm acid hyaluronic. Đĩa PICSI được phủ với 3-4 mL OvoiL và ủ ở 37°C trong 15 phút để tối đa hóa sự gắn kết acid hyaluronic của tinh trùng [12].

Đánh giá khả năng gắn kết của tinh trùng với acid hyaluronic (HBA): tỉ lệ phần trăm tinh trùng gắn kết acid hyaluronic trên tổng số tinh trùng đếm được khi quan sát ở đĩa PICSI dưới kính hiển vi đảo ngược [101]. Quá trình thao tác được lưu video sau đó chuyên viên phôi học sẽ đánh giá cụ thể khả năng gắn kết acid hyaluronic của tinh trùng).

Sau khi thu nhận được tinh trùng có gắn kết acid hyaluronic thì tiếp tục tiến hành các bước ICSI đã được mô tả.

Người thực hiện: chuyên viên phôi học



Hình 2.3. Vị trí các vi điểm acid hyaluronic và sơ đồ giọt môi trường trong PICSI [78]

(A). Đĩa PICSI. Mỗi mũi tên hướng đến một vi điểm chứa hyaluronic acid. (B) và (C) các vị trí tạo giọt môi trường (A, B và C là giọt rửa noãn, P là giọt polyvinylpyrrolidone, a, b và c là vi điểm acid hyaluronic và 1, 2, 3, và 4 là giọt thực hiện tiêm tinh trùng vào bào tương noãn).

2.2.3.4. Đánh giá thụ tinh và phát triển của phôi

Đánh giá thụ tinh ngày 1

Thời điểm đánh giá phân loại là 17 ± 1 giờ, tính từ thời điểm ICSI. Đĩa môi trường nuôi cấy được kiểm tra từng giọt nuôi cấy phôi dưới kính hiển vi đảo ngược.

Đánh giá số noãn thụ tinh bình thường, những phôi 2 tiền nhân được quan sát. Các noãn được đánh giá không thụ tinh là noãn không quan sát thấy tiền nhân tại thời điểm đánh giá, các noãn có tiền nhân lớn hơn 2 sẽ bị hủy bỏ.

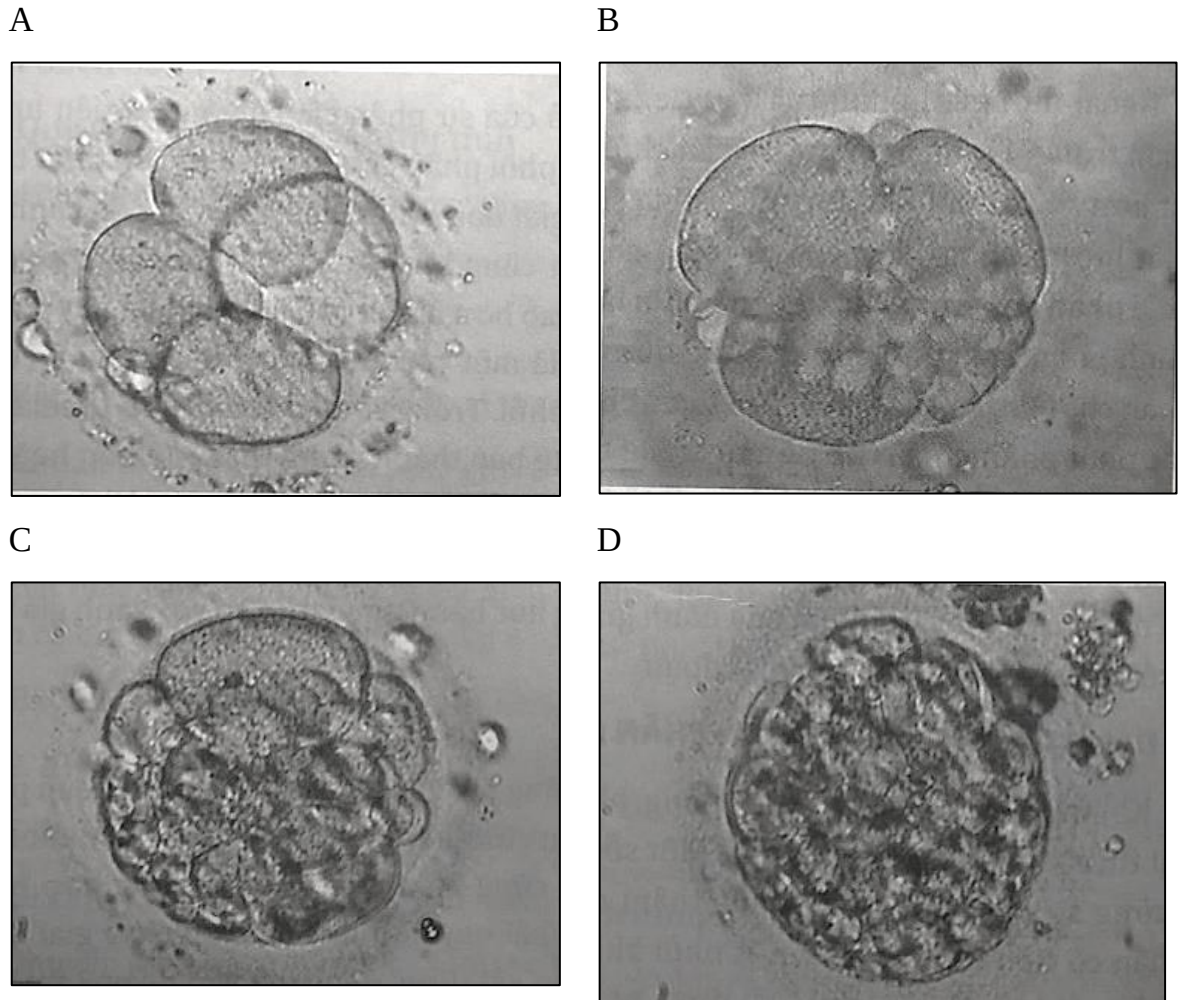
Đánh giá phôi giai đoạn phân chia ngày 2

Thời điểm đánh giá phân loại là 44 ± 1 giờ tính từ thời điểm ICSI. Đánh giá phôi theo các tiêu chuẩn của đồng thuận Alpha (2011) [28]:

- Phôi phân chia ngày 2 độ 1: các phôi bào có kích thước tương đối đồng đều, tỉ lệ mảnh vỡ bào tương $<10\%$, không có phôi bào đa nhân.
- Phôi phân chia ngày 2 độ 2: có < 4 phôi bào, số phôi bào kích thước tương đối đều chiếm đa số, tỉ lệ mảnh vỡ bào tương 10 - 25%, không có phôi bào đa nhân.
- Phôi phân chia ngày 2 độ 3: có < 4 phôi bào, các phôi bào có kích thước không đồng đều, tỉ lệ mảnh vỡ bào tương $> 25\%$, có phôi bào đa nhân.

Phôi hữu dụng là những phôi tốt (độ 1) và phôi trung bình (độ 2) được sử dụng

để chuyển phôi trong các chu kỳ chuyển phôi giai đoạn phân chia, những phôi xấu sẽ không được chuyển phôi [148]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này thực hiện nuôi cấy phôi đến ngày 5/ngày 6 ở tất cả các phôi, và áp dụng chuyển phôi nang.



Hình 2.4. Đánh giá hình ảnh phôi giai đoạn phân chia [12]

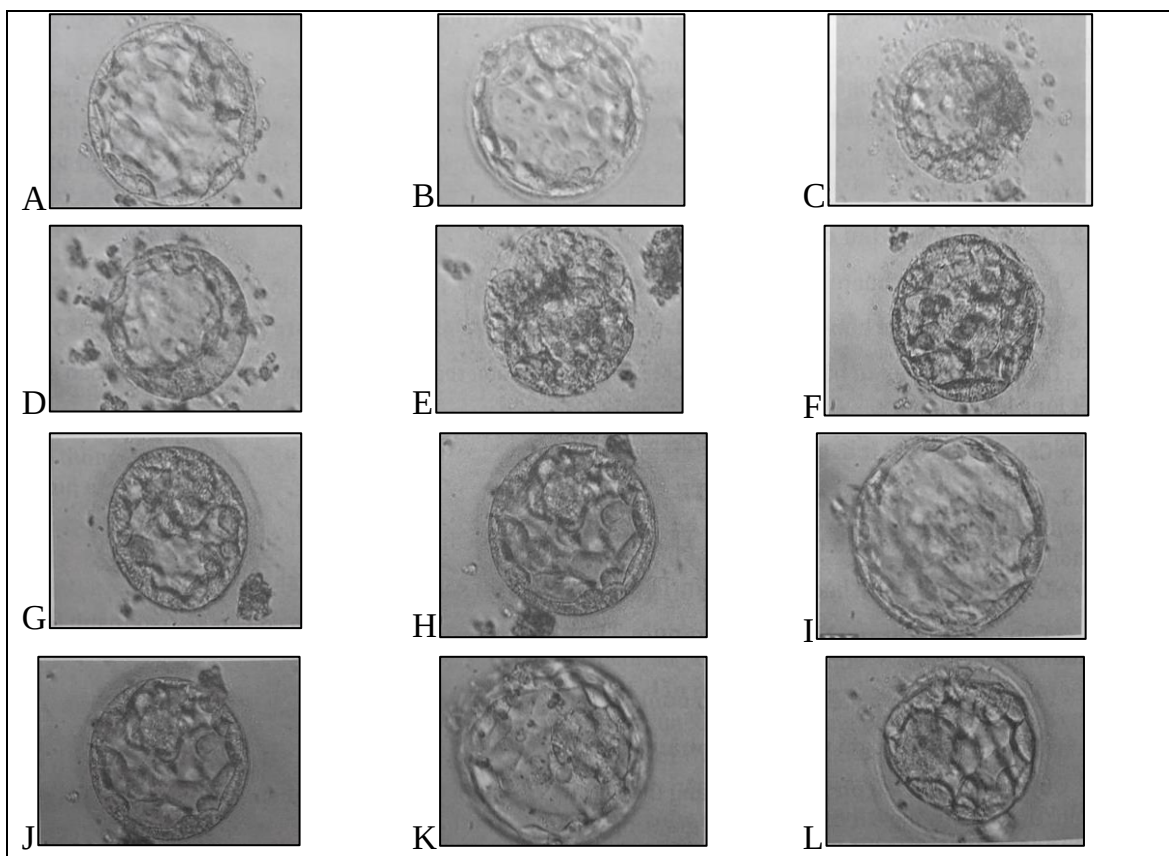
A. Phôi ngày 2 chất lượng tốt được đánh giá 4ES0; B. Phôi hữu dụng với 4 tế bào với một số mảnh vỡ nằm rải rác được đánh giá 4ES10; C. Phôi bào chất lượng xấu với nhiều mảnh vỡ; D. Phôi chất lượng xấu với nhiều mảnh vỡ không nhận diện được phôi bào

Đánh giá phôi nang

Phôi nang được đánh giá dựa vào tiêu chuẩn của Gardner (theo thang điểm từ 1 đến 6 phụ thuộc vào độ phát triển rộng của khoang phôi nang và hiện tượng thoát màng [60].

Bảng 2.1. Đánh giá phân loại phôi nang [60]

Đánh giá khoang phôi nang và hiện tượng thoát màng	
Giai đoạn 1	Phôi nang giai đoạn sớm khi khoang dịch chiếm dưới $\frac{1}{2}$ tổng thể tích của phôi.
Giai đoạn 2	Phôi nang khi khoang dịch chiếm trên $\frac{1}{2}$ tổng thể tích của phôi
Giai đoạn 3	Phôi nang đầy khi khoang dịch chiếm hầu hết thể tích của phôi
Giai đoạn 4	Phôi nang rộng khi khoang dịch phát triển rộng làm cho màng trong suốt bắt đầu mỏng dần.
Giai đoạn 5	Phôi nang đang thoát màng khi nguyên bào lá nuôi bắt đầu thoát ra khỏi màng trong suốt.
Giai đoạn 6	Phôi nang đã thoát màng khi phôi nang đã hoàn toàn thoát ra khỏi màng trong suốt.
Đánh giá mầm phôi	
Loại A	Khi có rất nhiều tế bào liên kết chặt chẽ
Loại B	Khi vài tế bào liên kết lỏng lẻo
Loại C	Khi có rất ít tế bào
Loại D	Không nhìn thấy mầm phôi.
Đánh giá nguyên bào nuôi	
Loại A	Nhiều tế bào liên kết tạo thành biểu mô kết
Loại B	Vài tế bào tạo thành biểu mô rời rạc
Loại C	Có vài tế bào lớn



Hình 2.5. Các hình thái phôi nang [12]

A. Phôi nang chất lượng tốt 4AA; B. Phôi nang chất lượng tốt 5AA với một số tế bào thoát vị; C. Phôi nang chất lượng xấu khi chỉ một số tế bào liên kết tạo khoang, lớp tế bào nguyên bào nuôi ít và chưa nhận diện được khối mầm phôi. D. Phôi nang được đánh giá 2CB với các tế bào loại thải, lớp tế bào nguyên bào nuôi rõ ràng nhưng chưa thấy hiện diện của mầm phôi; E. Phôi nang 1BB được hình thành sau khi loại bỏ các tế bào bất thường, các tế bào nguyên bào nuôi và mầm phôi đã nhận diện được; F. Phôi nang ngày 5 được đánh giá 3AB với lớp tế bào nguyên bào nuôi ít, chưa nén chặt; G. Phôi nang ngày 5 được đánh giá 3AA; H. Phôi nang ngày 5 được đánh giá 4BB với khối mầm phôi chưa nén chặt, lớp nguyên bào nuôi ít tế bào và có một số tế bào mảnh vỡ bị loại thải; I. Phôi nang 4CA, phôi nở rộng, lớp nguyên bào nuôi tốt nhưng khối mầm phôi không biểu hiện rõ ràng; J. Phôi nang ngày 5 được đánh giá 4BB với mầm phôi chưa nén chặt, lớp nguyên bào nuôi ít tế bào và có một số mảnh vỡ tế bào bị thải loại; K. Phôi chất lượng tốt 5AA, một số mảnh vỡ tế bào bị thoái hóa loại thải.; L. Phôi nang ngày 5 nở rộng nhưng xếp trong quá trình phát triển, có một số tế bào thoát vị ra bên ngoài, đánh giá chất lượng tốt 5AA.

Phân chia nhóm phôi nang thành 3 loại: phôi nang độ 1, độ 2, độ 3, tương ứng tốt, trung bình, xấu theo tiêu chuẩn của tác giả Racowsky và cộng sự (2010):

Bảng 2.2. Phân loại chất lượng phôi nang [122]

Đánh giá chất lượng phôi nang	Mô tả
Độ 1	Phôi có mức độ giãn rộng giai đoạn: 3, 4, 5, 6 Phân loại mầm phôi và nguyên bào lá nuôi: AA, AB, BA
Độ 2	Phôi có mức độ giãn rộng giai đoạn 3, 4, 5, 6 Phân loại mầm phôi và nguyên bào lá nuôi: BB, CA
Độ 3	Phôi có mức độ giãn rộng giai đoạn: 1, 2 Phân loại mầm phôi và nguyên bào lá nuôi: AC, BC, CB, CC

2.2.3.5. Chuyển phôi và theo dõi sau chuyển phôi

- Tiến hành chuyển phôi: những phôi được chuyển là phôi ngày 5 được đông/ rã. Số phôi được chuyển từ 1-3 phôi dựa theo số lượng và chất lượng phôi (1 phôi độ 1; hoặc 2 phôi độ 1; hoặc 1 phôi độ 1 và 1 phôi độ 3; hoặc 2 phôi độ 2, hoặc 3 phôi nang độ 3...), niêm mạc tử cung khi chuyển phôi $\geq 7\text{mm}$.

- Hỗ trợ hoàng thể: Sử dụng Progesteron 800mg/ ngày đặt âm đạo chia 2 lần. Bổ sung Progesterone kéo dài ít nhất đến ngày thử thai và đến khi tuổi thai 12 tuần [10].

- Người vợ xét nghiệm máu xác định nồng độ βhCG ngày thứ 12 sau chuyển phôi. βhCG được xác định dương tính khi có giá trị $\geq 25\text{mIU/mL}$, nếu $< 25\text{mIU/mL}$ được xác định là βhCG âm tính.

- Theo dõi kết quả thai, thai lâm sàng và thai tiến triển: Siêu âm thấy túi thai, phôi và tim thai sau chuyển phôi được xác định có thai lâm sàng. Theo dõi đến thai hơn 12 tuần để xác định thai tiến triển.

2.2.4. Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được nhập liệu và phân tích trên phần mềm SPSS 20.0

Đánh giá mối tương quan giữa DFI và chỉ số tinh trùng, giữa DFI và kết quả phôi bằng kiểm định Pearson hoặc Spearman. Kết quả đánh giá có tương quan khi $p \leq 0,05$.

Mức độ tương quan được tính:

- + Nếu r càng tiến về 1, -1: tương quan tuyến tính càng mạnh, càng chặt chẽ.
Tiến về 1 là tương quan thuận, tiến về -1 là tương quan nghịch.
- + Nếu r càng tiến về 0: tương quan tuyến tính càng yếu.
- + Nếu $r = 1$: tương quan tuyến tính tuyệt đối.
- + Nếu $r = 0$: không có mối tương quan tuyến tính.

So sánh giá trị trung bình về đặc điểm tinh trùng, đặc điểm phân mảnh DNA tinh trùng, đặc điểm phôi ngày 2, phôi nang giữa 2, giữa các nhóm nhóm phân loại bằng kiểm định Independent Sample T hoặc kiểm định Mann-Whitney.

So sánh giá trị trung bình về đặc điểm tinh trùng, đặc điểm phôi ngày 2, phôi nang giữa 3 nhóm DFI $<15\%$, $15\% \leq \text{DFI} < 30\%$ và $\text{DFI} \geq 30\%$ bằng kiểm định Anova hoặc kiểm định Kruskal- Wallis.

So sánh tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ hình thành phôi ngày 2, phôi nang, kết quả chuyển phôi giữa hai nhóm PCSI và ICSI bằng kiểm định Chi-Square.

Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p \leq 0,05$.

2.3. ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được Hội đồng chuyên môn thông qua đề cương. Nghiên cứu được chấp thuận của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Trường Đại học Y Dược Huế. Số hồ sơ: H2020/030.

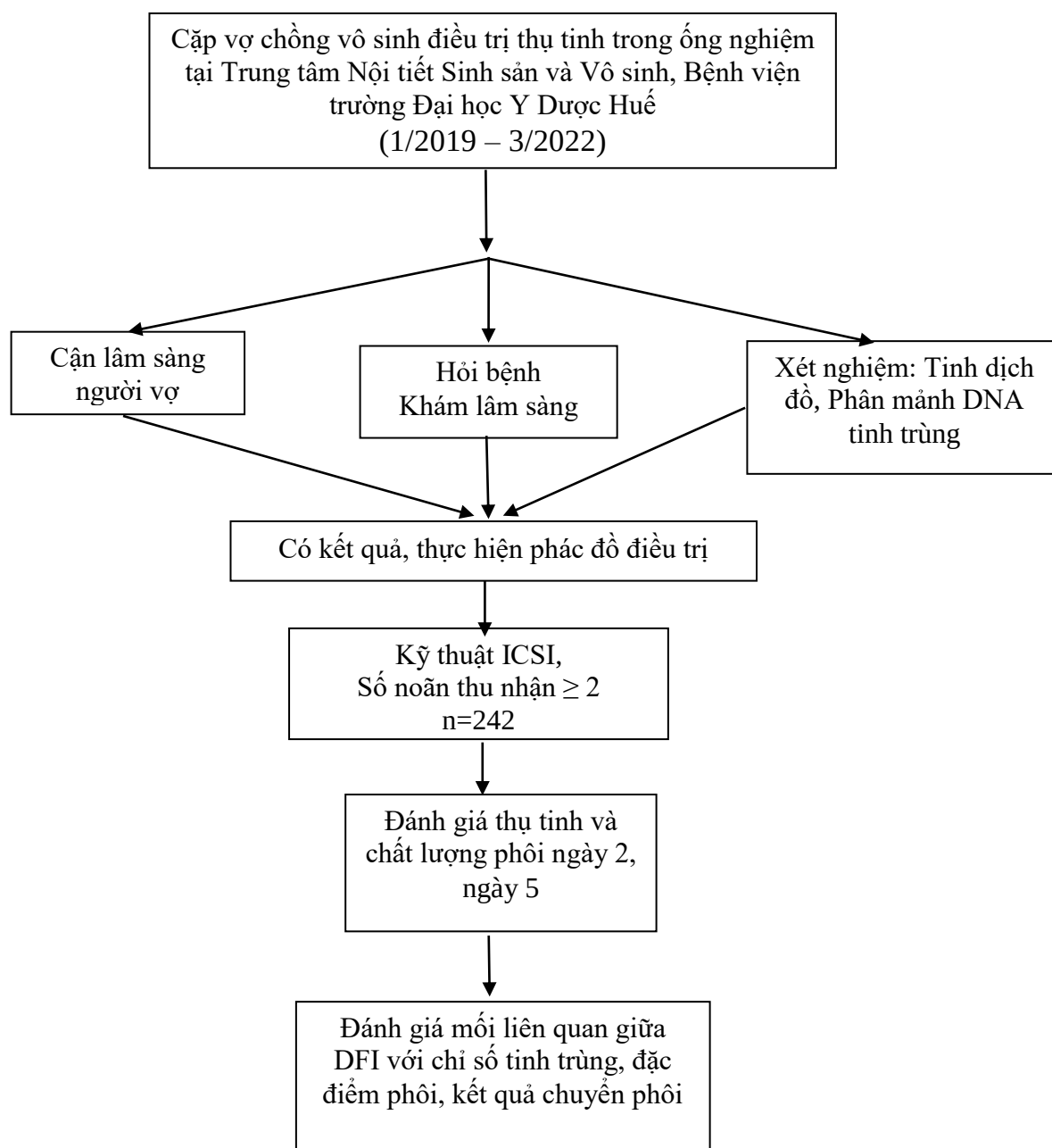
Đối tượng nghiên cứu được thông báo đúng về mục đích nghiên cứu, giải thích những hoạt động của nghiên cứu. Những vấn đề có thể xảy ra trong quá trình điều trị thụ tinh trong ống nghiệm.

Đối tượng tự nguyện tham gia nghiên cứu, ngoài ra đều có đơn xin thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm tại Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế.

Các dữ liệu cá nhân thu thập, xét nghiệm, kết quả thụ tinh trong ống nghiệm được lưu trữ, phân tích vì mục đích khoa học và đảm bảo tính bảo mật và chỉ những cá nhân liên quan mới có quyền tiếp cận số liệu.

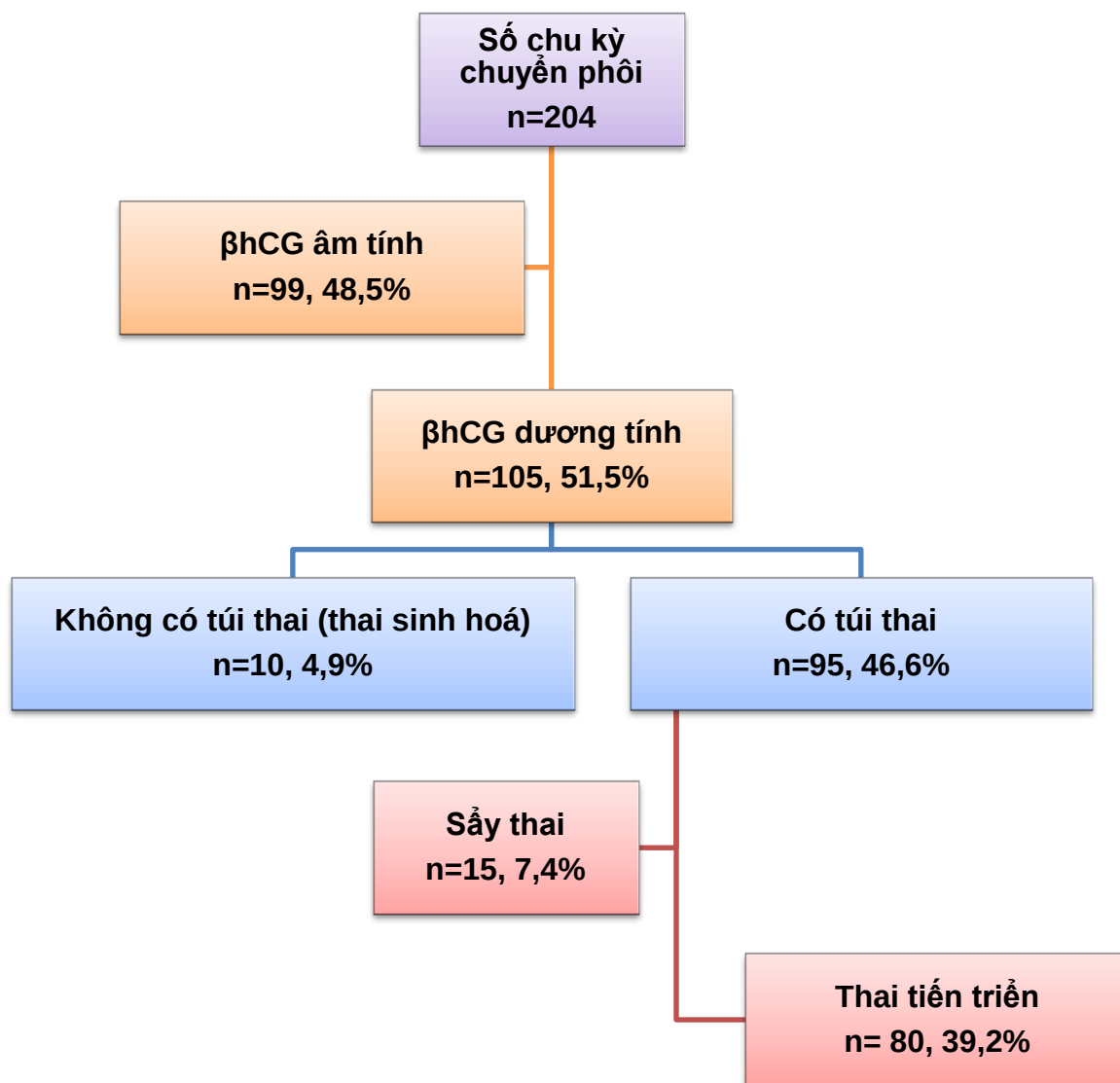
2.4. SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU

2.4.1. Sơ đồ mục tiêu 1



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu mục tiêu 1

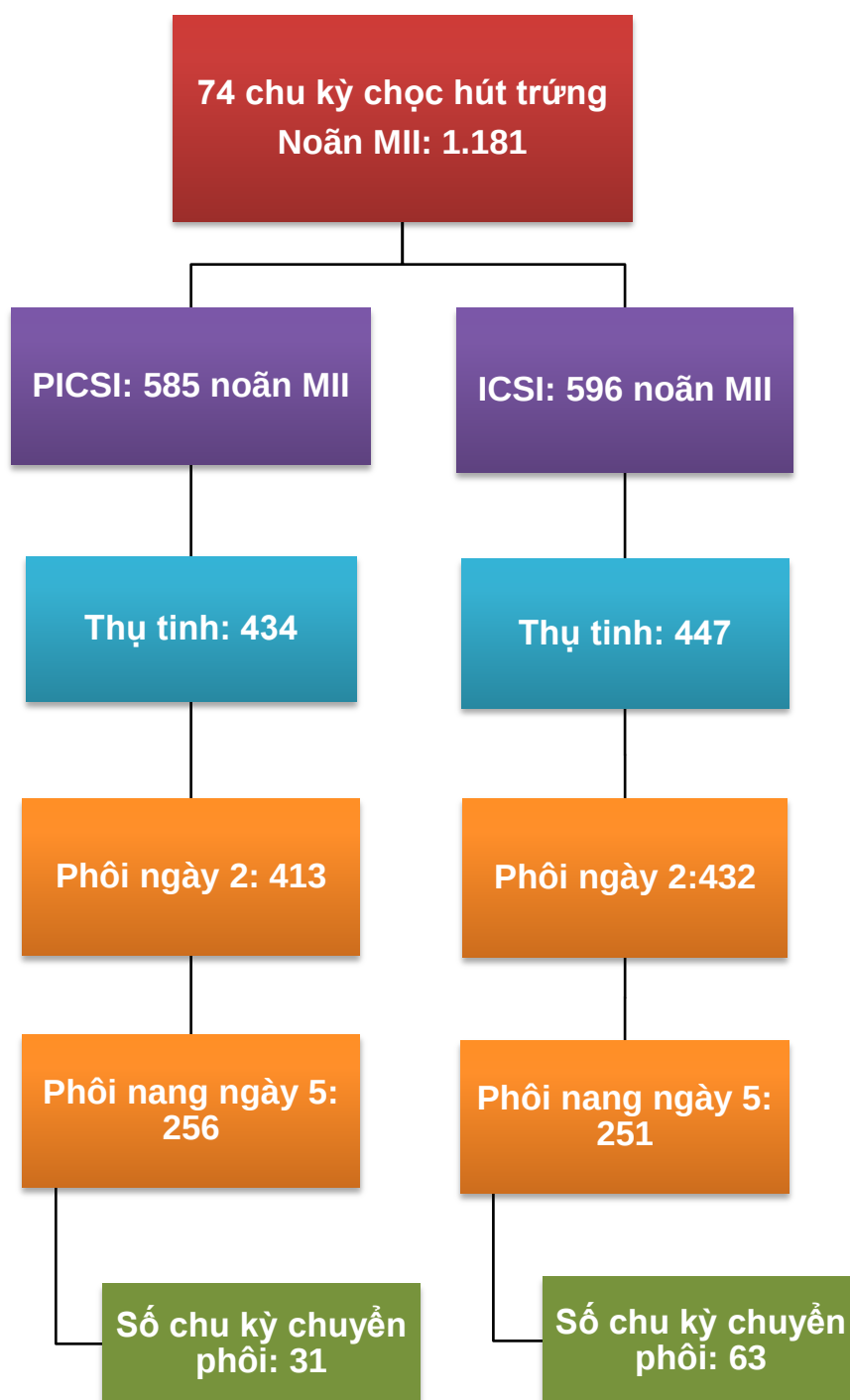
Trong số 242 cặp vợ chồng thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm có 204 cặp vợ chồng đã được chuyển phôi. Kết quả chuyển phôi được thể hiện theo sơ đồ 2.2:



Sơ đồ 2.2. Sơ đồ kết quả theo dõi sau chuyển phôi

2.4.2. Sơ đồ mục tiêu 2

Kết quả về nuôi cấy phôi của kỹ thuật PICSI và ICSI theo sơ đồ 2.3:



Sơ đồ 2.3. Sơ đồ kết quả nuôi cấy phôi của kỹ thuật PICSI và ICSI

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. MỐI LIÊN QUAN GIỮA PHÂN MẢNH DNA TINH TRÙNG VỚI CÁC CHỈ SỐ TINH DỊCH ĐỒ, CHẤT LƯỢNG PHÔI VÀ KẾT QUẢ THỤ TINH TRONG ỐNG NGHIỆM

Nghiên cứu thu nhận được 242 cặp vợ chồng vô sinh đáp ứng được tiêu chuẩn lựa chọn, thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm tại Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện trường Đại học Y - Dược Huế. Kết quả được thể hiện như sau:

3.1.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

3.1.1.1. Đặc điểm người vợ

Bảng 3.1. Đặc điểm chung của người vợ

Đặc điểm chung	Giá trị	Giá trị trung bình; trung vị	Nhỏ nhất – Lớn nhất
Tuổi (năm)		31,95 ± 4,43; 31	20 – 45
< 35, n (%)		178 (73,6%)	
≥ 35, n (%)		64 (26,4%)	
BMI		20,85 ± 2,48; 20,44	13,79 – 32,89
Tiền sử			
Tiền sử sảy thai, n (%)		69 (28,5%)	
Tiền sử HTSS, n (%)		170 (70,2%)	
Đặc điểm nội tiết và noãn			
AMH (ng/mL)		3,94 ± 2,94; 3,04	0,1 – 21,25
FSH (mIU/mL)		6,81 ± 2,35; 6,63	0,78 – 21,66
Số noãn thu nhận		14,99 ± 9,27; 13	2– 50
Số noãn trưởng thành (MII)		12,02 ± 7,29; 10	2– 39

Tuổi trung bình của người vợ trong độ tuổi sinh sản, người vợ lớn tuổi (≥ 35 tuổi) chiếm tỉ lệ 26,4%. 28,5% người vợ có tiền sử sảy thai và 70,2% đã từng thực hiện biện pháp HTSS. Nồng độ AMH trung bình là 3,94 ± 2,94 (0,1– 21,25) (ng/mL). Số noãn trưởng thành thu nhận được trung bình là 12,02 ± 7,29 noãn.

Bảng 3.2. Đặc điểm và nguyên nhân vô sinh

Đặc điểm vô sinh	Giá trị	n (%)
Thời gian vô sinh (năm) (trung bình)		4,70 ± 2,58 (1 - 18)
Phân loại		
Vô sinh nguyên phát (%)		143 (59,1%)
Vô sinh thứ phát (%)		99 (40,9%)
Nguyên nhân vô sinh		
Do người vợ		61 (25,2%)
Do người chồng		37 (15,3%)
Do cả hai		138 (57,0%)
Không rõ nguyên nhân		6 (2,5%)
Đặc điểm vô sinh người vợ		
Hội chứng buồng trứng đa nang		78 (32,2%)
Giảm dự trữ buồng trứng		70 (28,9%)
Do vòi tử cung		55 (22,7%)
Tại tử cung		48 (19,8%)
Lạc nội mạc tử cung		30 (12,4%)
Số nguyên nhân		
0		43 (17,8%)
1		129 (53,3%)
2		59 (24,4%)
3		10 (4,1%)
4		1 (0,4%)

Thời gian vô sinh trung bình là 4,70 ± 2,58 năm. Có 59,1% trường hợp vô sinh nguyên phát. Nguyên nhân vô sinh do cả hai vợ chồng chiếm tỉ lệ cao nhất là 57,0%.

Về nguyên nhân từ phía người vợ: nguyên nhân do hội chứng buồng trứng đa nang (32,2%) và giảm dự trữ buồng trứng (28,9%) là có tỉ lệ gặp nhiều nhất. Số trường hợp người vợ có 1 nguyên nhân vô sinh có tỉ lệ cao nhất là 53,3%.

3.1.1.2. Đặc điểm người chồng

Bảng 3.3. Đặc điểm chung của người chồng

Giá trị Đặc điểm chung	Giá trị trung bình	Nhỏ nhất – Lớn nhất
Tuổi (năm)	35,57 ± 5,24	25 – 55
< 40, n (%)	191 (78,9%)	
≥ 40, n (%)	51 (21,1%)	
BMI	23,48 ± 2,78	17,19 – 33,70
Hút thuốc		
Có, n (%)	74 (30,6%)	
Không, n (%)	168 (69,4%)	
Uống bia/rượu		
Thường xuyên, n (%)	102 (42,1%)	
Không thường xuyên, n (%)	140 (57,9%)	

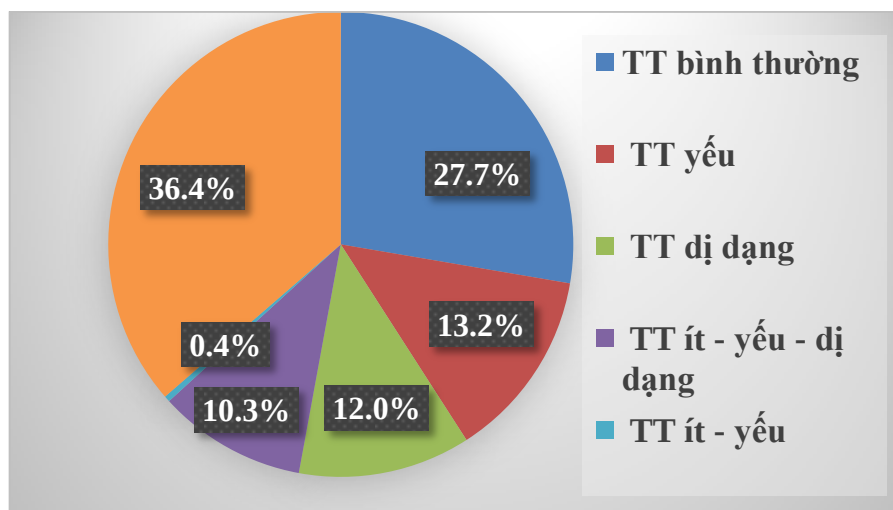
Độ tuổi trung bình của người chồng là 35,57 ± 5,24 (25 – 55), số trường hợp ≥ 40 tuổi chiếm 21,1%.

Có 30,6% trường hợp hút thuốc lá và 42,1% thường xuyên uống bia

Bảng 3.4. Đặc điểm chỉ số tinh dịch đồ

Đặc điểm	Giá trị	Giá trị trung bình	Nhỏ nhất – Lớn nhất
pH		$7,37 \pm 0,48$	5,5 – 8,5
Thể tích (mL)		$2,48 \pm 1,29$	0,5 – 7,0
Di động tiến tới (%)		$27,76 \pm 11,04$	0 – 58
< 32%, n (%)	146 (60,3%)		
$\geq 32\%$, n (%)	96 (39,7%)		
Mật độ ($\times 10^6/\text{mL}$)		$35,30 \pm 18,06$	2 – 86
< $15 \times 10^6/\text{mL}$, n (%)	27 (11,2%)		
$\geq 15 \times 10^6/\text{mL}$, n (%)	215 (88,8%)		
Tỉ lệ sống (%)		$81,95 \pm 9,13$	22 – 95
Hình dạng bình thường (%)		$3,43 \pm 2,02$	0 – 14
< 4%, n (%)	141 (58,3%)		
$\geq 4\%$, n (%)	101 (41,7%)		
Bất thường đầu (%)		$90,66 \pm 5,82$	76 – 100
Bất thường cổ đuôi (%)		$52,05 \pm 10,24$	30 – 95

Khả năng tinh trùng di động tiến tới trung bình ở nam giới cặp vợ chồng vô sinh là $27,76 \pm 11,04$ % thấp hơn ngưỡng giá trị tham khảo của WHO. Số trường hợp có tinh trùng di động yếu chiếm tỉ lệ cao với 60,3%. Có 27/242 trường hợp mẫu tinh trùng có mật độ thấp. Tỉ lệ mẫu dị dạng chiếm ưu thế 141/242, 58,3%.



(TT: Tinh trùng)

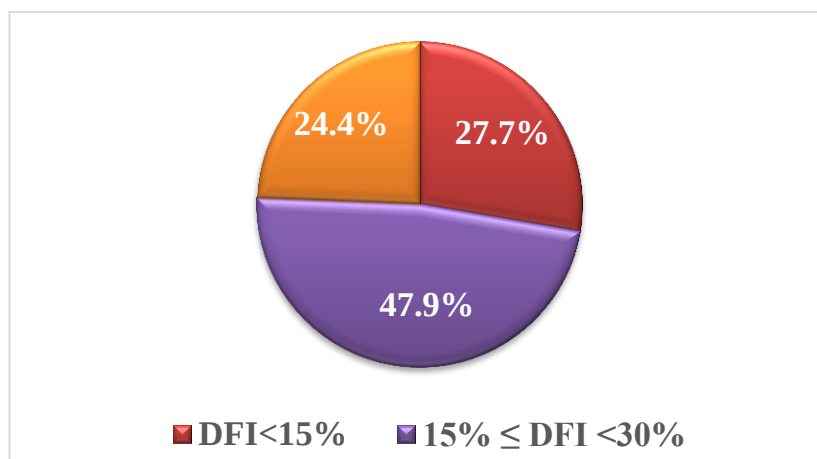
Biểu đồ 3.1. Đặc điểm phân loại bất thường chỉ số tinh trùng

Tỉ lệ mẫu có các chỉ số trong giới hạn bình thường đạt 27,7%. Trong các nhóm mẫu bất thường thì nhóm tinh trùng yếu - dị dạng chiếm số lượng chủ yếu với 36,4%.

Bảng 3.5. Đặc điểm phân mảnh DNA tinh trùng

Đặc điểm \ Giá trị	Giá trị trung bình	Nhỏ nhất – lớn nhất
DFI (%)	23,65 ± 13,80	4,4 – 81,6
Tỉ lệ quãng lớn (%)	34,13 ± 22,28	0 – 89,6
Tỉ lệ quãng trung bình (%)	42,08 ± 18,39	4,6 – 80,8
Tỉ lệ quãng nhỏ (%)	10,72 ± 6,69	1,0 – 40,8
Tỉ lệ không quãng (%)	7,96 ± 7,76	0,20 – 47,00
Tỉ lệ thoái hóa (%)	4,99 ± 4,57	0 – 46,0

Mức độ phân mảnh DNA tinh trùng trung bình ở nam giới cặp vợ chồng vô sinh là 23,65 ± 13,80 %. Tinh trùng không phân mảnh DNA có quãng trung bình chiếm ưu thế hơn so với tinh trùng quãng lớn. Những tinh trùng phân mảnh DNA, loại có quãng nhỏ chiếm số lượng nhiều hơn so với tinh trùng không quãng và thoái hóa.



Biểu đồ 3.2. Phân nhóm mức độ phân mảnh DNA tinh trùng

Các mức độ phân mảnh DNA tinh trùng với DFI thấp, trung bình và cao có tỉ lệ lần lượt là: 27,7%, 47,9%, và 24,4%.

Bảng 3.6. Đặc điểm phân mảnh DNA tinh trùng với một số yếu tố liên quan

Đặc điểm		DFI (%)	p
Tuổi	≥ 40 tuổi	24,68 ± 15,91	0,55
	<40 tuổi	23,38 ± 13,21	
Hút thuốc	Có	22,52 ± 13,16	0,39
	Không	24,15 ± 14,08	
Rượu/bia	Có thường xuyên	21,40 ± 11,88	0,03
	Không	25,29 ± 14,88	

Nam giới trên ≥ 40 tuổi có DFI cao hơn so với nam giới < 40 tuổi, $p = 0,55$. Không có sự khác biệt về DFI giữa những người hút thuốc và không hút thuốc. Nam giới thường xuyên uống bia có DFI thấp hơn so với những người không thường xuyên uống, với DFI: $21,40 \pm 11,88$ so với $25,29 \pm 14,88$, $p = 0,03$.

Bảng 3.7. Đặc điểm phân mảnh DNA tinh trùng theo nguyên nhân vô sinh

Đặc điểm	DFI (%)	p
Do vợ	23,89 ± 16,02 (4,4 – 77,6)	0,89
Do chồng	24,33 ± (10,4 – 81,6)	
Cả hai	23,21 ± 12,9 (5,8 – 70,6)	
Không rõ nguyên nhân	27,10 ± 16,02 (4,4 – 81,6)	

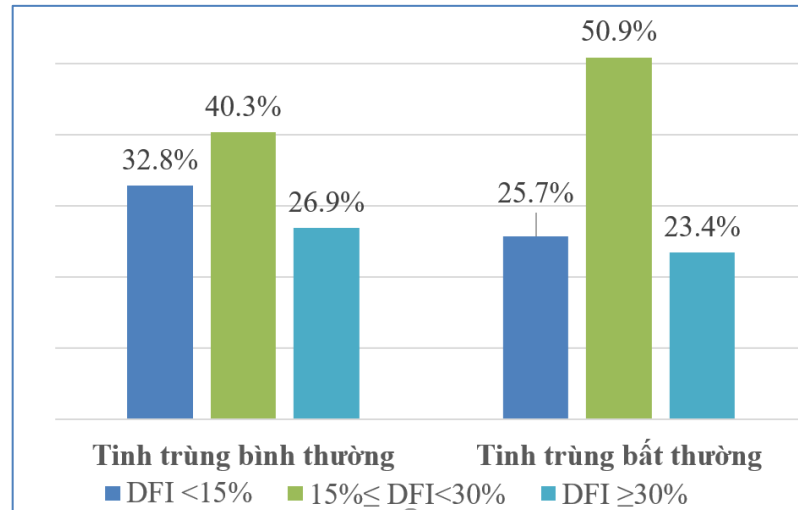
Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê về đặc điểm phân mảnh DNA tinh trùng giữa các nhóm nguyên nhân vô sinh.

3.1.2. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng với các chỉ số tinh dịch đồ

Bảng 3.8. Mối liên quan giữa các chỉ số tinh trùng trong các nhóm phân mảnh DNA tinh trùng

Phân mảnh DNA tinh trùng Chỉ số tinh trùng	DFI<15% n= 67	15%≤DFI<30% n= 116	DFI ≥30% n=59	p
pH	7,43 ± 0,51	7,43±0,48	7,19 ± 0,41	0,04
Thể tích (mL)	2,46 ± 1,08	2,64 ± 1,40	2,18 ± 1,24	0,09
Di động tiến tới (%)	30,40 ± 8,86	26,29 ± 10,98	27,66 ± 12,86	0,05
Mật độ (x10⁶/mL)	34,45 ± 15,52	38,16 ± 19,50	30,62 ± 16,95	0,03
Tỉ lệ sống (%)	84,22 ± 9,63	81,41 ± 9,02	80,44 ± 8,41	0,04
Hình dạng bình thường (%)	3,64 ± 2,04	3,48 ± 1,90	3,07 ± 2,22	0,26
Bất thường đầu (%)	90,19 ± 5,54	91,32 ± 5,56	89,88 ± 6,54	0,23
Bất thường cổ đuôi (%)	50,24 ± 8,77	51,22 ± 9,10	55,76 ± 12,84	0,005
DFI	11,19 ± 2,59	20,81 ± 3,75	43,38 ± 12,82	

Độ pH ở nhóm DFI ≥ 30% có giá trị thấp nhất, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,04$. Nhóm DFI <15% có tỉ lệ tinh trùng di động tiến tới ($30,40 \pm 8,86\%$), và tỉ lệ tinh trùng sống ($84,22 \pm 9,63\%$) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm $15\% \leq \text{DFI} < 30\%$ và DFI ≥ 30%, với p lần lượt là $p = 0,05$ và $p = 0,04$. Mật độ tinh trùng trong nhóm DFI ≥ 30% ($30,62 \pm 16,95.10^6/\text{mL}$) thấp nhất, có ý nghĩa thống kê với $p = 0,03$. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về bất thường cổ đuôi tinh trùng, nhóm DFI ≥ 30% có tỉ lệ cao nhất ($55,76 \pm 12,84\%$)



Biểu đồ 3.3. Tỷ lệ mức độ phân mảnh DNA tinh trùng trong nhóm tinh trùng bình thường và bất thường

Trong nhóm tinh trùng bình thường có 26,9% mẫu có phân mảnh DNA tinh trùng ở mức cao ($DFI \geq 30\%$). Những mẫu tinh trùng bất thường có 25,7% mẫu có mức độ phân mảnh DNA tinh trùng thấp ($DFI < 15\%$).

Bảng 3.9. Mối liên quan giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và mật độ tinh trùng

Mật độ tinh trùng Phân mảnh DNA tinh trùng	Mật độ < $15 \times 10^6/\text{mL}$ n = 27	Mật độ $\geq 15 \times 10^6/\text{mL}$ n = 215	p
DFI	$27,69 \pm 13,88$	$23,15 \pm 13,74$	0,11
Tỷ lệ quầng lớn	$30,84 \pm 22,87$	$34,55 \pm 22,22$	0,42
Tỷ lệ quầng trung bình	$40,97 \pm 16,87$	$42,21 \pm 18,61$	0,74
Tỷ lệ quầng nhỏ	$14,66 \pm 8,59$	$10,22 \pm 6,27$	0,01
Tỷ lệ không quầng	$7,49 \pm 6,33$	$8,02 \pm 7,93$	0,74
Tỷ lệ thoái hóa	$5,62 \pm 4,13$	$4,91 \pm 4,62$	0,45

Nhóm tinh trùng mật độ thấp có DFI cao hơn so với ở nhóm tinh trùng mật độ bình thường, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($27,69 \pm 13,88$ so với $23,15 \pm 13,74$, $p = 0,11$).

Loại tinh trùng quầng nhỏ ở nhóm tinh trùng mật độ cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm mật độ bình thường ($14,66 \pm 8,59$ so với $10,22 \pm 6,268$, $p = 0,01$).

Bảng 3.10. Mối liên quan giữa mức độ phân mảnh DNA và khả năng di động

Khả năng di động Phân mảnh DNA tinh trùng	Di động tiến tới < 32% n = 146	Di động tiến tới ≥ 32% n = 96	p
DFI	24,26 ± 13,44	22,73 ± 14,36	0,40
Tỉ lệ quầng lớn	34,29 ± 21,68	33,89 ± 23,26	0,89
Tỉ lệ quầng trung bình	41,28 ± 17,46	43,29 ± 19,76	0,41
Tỉ lệ quầng nhỏ	11,30 ± 6,98	9,83 ± 6,16	0,09
Tỉ lệ không quầng	8,04 ± 7,50	7,84 ± 8,18	0,85
Tỉ lệ thoái hóa	4,96 ± 4,82	5,04 ± 4,19	0,90

Mức độ phân mảnh DNA tinh trùng ở nhóm di động yếu cao hơn so với nhóm tinh trùng di động nhanh, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (24,26 ± 13,44 so với 22,73 ± 14,36, p = 0,40).

Tỉ lệ tinh trùng quầng nhỏ ở nhóm di động yếu cao hơn so với nhóm tinh trùng di động tốt, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với p = 0,09.

Bảng 3.11. Mối liên quan giữa mức độ phân mảnh DNA và hình dạng tinh trùng

Hình dạng Phân mảnh DNA tinh trùng	Hình dạng bình thường ≥ 4% n=141	Hình dạng bình thường < 4% n=101	p
DFI	23,65 ± 13,30	23,66 ± 4,54	0,99
Tỉ lệ quầng lớn	34,47 ± 22,06	33,67 ± 22,67	0,78
Tỉ lệ quầng trung bình	41,89 ± 17,76	42,33 ± 19,33	0,85
Tỉ lệ quầng nhỏ	10,97 ± 6,82	10,37 ± 6,54	0,50
Tỉ lệ không quầng	7,71 ± 7,51	8,31 ± 8,13	0,55
Tỉ lệ thoái hóa	4,99 ± 4,99	4,99 ± 3,94	0,99

Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê về đặc điểm phân mảnh DNA và không phân mảnh DNA tinh trùng giữa hai nhóm tinh trùng hình dạng bình thường ≥ 4% và hình dạng bình thường < 4%.

Bảng 3.12. Mối tương quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và các chỉ số tinh trùng

Chỉ số tinh trùng	DFI	
	r	p
pH	- 0,21	0,001
Thể tích	- 0,12	0,07
Di động tiến tới	- 0,11	0,08
Mật độ	- 0,12	0,06
Tỉ lệ sống	- 0,14	0,03
Hình dạng bình thường	- 0,13	0,04
Bất thường đầu	- 0,03	0,62
Bất thường cổ đuôi	0,23	< 0,001

Có mối tương quan nghịch yếu giữa độ pH của tinh dịch, tỉ lệ tinh trùng sống; hình dạng bình thường với phân mảnh DNA tinh trùng: ($r = - 0,21$, $p = 0,001$), ($r = - 0,14$, $p = 0,03$), ($r = - 0,13$, $p = 0,04$).

Có xu hướng tương quan nghịch yếu của độ di động tiến tới sống ($- 0,11$, $p = 0,08$), và hình dạng bình thường ($r = - 0,12$, $p = 0,06$) với phân mảnh DNA tinh trùng.

Có mối tương quan thuận yếu giữa đặc điểm bất thường cổ đuôi của tinh trùng và mức độ phân mảnh DNA với $r = 0,23$, $p < 0,001$.

3.1.3. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng với chất lượng phôi thụ tinh trong ống nghiệm

3.1.3.1. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả thụ tinh, kết quả phôi phân chia ngày 2

Bảng 3.13. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA và kết quả thụ tinh, phôi ngày 2

Phân mảnh DNA Kết quả phôi	Giá trị trung bình	DFI<15% n= 67	15% ≤ DFI <30% n= 116	DFI ≥30% n=59	p
Số noãn MII (trung bình)	12,02±7,29 (1 - 39)	12,33±7,49	11,78±6,91	12,12±7,88	0,88
Tỉ lệ thụ tinh (%)	72,59±17,64 (20,0 - 100)	75,14 ±15,90	73,12±18,37	68,66±17,69	0,11
Kết quả hình thành phôi phân chia ngày 2 (%)					
Tỉ lệ phôi phân chia ngày 2/hợp tử	95,98±9,32 (33,33 - 100)	97,32±5,56	94,73±11,41	96,92±7,87	0,13
Tỉ lệ phôi phân chia độ 1 ngày 2/hợp tử	65,35±25,10 (33,33 - 100)	67,94 ±23,82	64,77±29,51	63,57±29,51	0,59
Tỉ lệ phôi hữu dụng ngày 2/hợp tử	81,05±21,40 (0 - 100)	82,60±19,05	80,71±21,60	79,94±23,68	0,19
Tỉ lệ phôi hữu dụng/noãn MII	59,18±22,04 (6,67 - 100)	62,38±20,02	59,36±22,91	55,19±22,21	0,77

Phân mảnh DNA	Giá trị trung bình	DFI<15 % n= 67	15% ≤ DFI <30% n= 116	DFI ≥30% n=59	p
Kết quả phôi					
Đặc điểm phôi giai đoạn phân chia ngày 2 (%)					
Tỉ lệ phôi < 4 tế bào	22,32±24,91 (0 – 100)	24,68±22,77	21,81±22,47	20,66±24,10	0,58
Tỉ lệ phôi 4 tế bào	59,16±26,29 (0 – 100)	54,88±26,42	61,65±25,88	59,14±26,79	0,25
Tỉ lệ phôi > 4 tế bào	18,75±19,89 (0 – 100)	20,73±19,53	17,05±19,33	19,85±21,42	0,43
Tỉ lệ mảnh vỡ bào tương 0 - < 10%	82,61±22,78 (0 – 100)	88,17±18,67	82,92±20,64	75,67±28,80	0,008
10% ≤ Tỉ lệ mảnh vỡ bào tương ≤ 25%	14,22±18,19 (0 - 87,50)	11,18±16,23	14,28±16,55	17,56±22,59	0,14
Tỉ lệ mảnh vỡ bào tương >25%	3,21±10,23 (0 – 75,0)	1,75 ±5,72	2,60±7,88	6,11±16,21	0,04

Nhóm DFI ≥ 30% có tỉ lệ thụ tinh thấp nhất ($68,66 \pm 17,69\%$), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,11$. Tỉ lệ tạo phôi hữu dụng ngày 2/noãn MII ở nhóm DFI ≥ 30% ($55,19 \pm 22,21\%$) có giá trị thấp nhất, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,77$. Nhóm DFI ≥ 30% có tỉ lệ phôi có mảnh vỡ bào tương mức độ thấp 0 - < 10% thấp nhất ($75,94 \pm 28,98\%$), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,008$; và tỉ lệ phôi có mảnh vỡ bào tương mức độ cao > 25% là cao nhất với $6,11 \pm 16,21\%$, $p = 0,04$.

Bảng 3.14. Mối tương quan giữa DFI và kết quả thụ tinh và phôi phân chia ngày 2

Đặc điểm	DFI	
	r	p
Tỉ lệ thụ tinh	- 0,20	0,002
Kết quả hình thành phôi phân chia ngày 2		
Tỉ lệ tạo phôi ngày 2/hợp tử	0,01	0,87
Tỉ lệ tạo phôi độ 1/hợp tử	- 0,08	0,21
Tỉ lệ tạo phôi hữu dụng ngày 2/hợp tử	- 0,07	0,30
Tỉ lệ tạo phôi hữu dụng ngày 2/noãn MII	- 0,16	0,01
Đặc điểm phôi giai đoạn phân chia ngày 2		
Tỉ lệ phôi dưới 4 tế bào	- 0,02	0,72
Tỉ lệ phôi 4 tế bào	0,05	0,44
Tỉ lệ phôi trên 4 tế bào	- 0,04	0,48
Tỉ lệ mảnh vỡ bào tương 0 -< 10%	- 0,17	0,008
10% ≤ Tỉ lệ mảnh vỡ bào tương ≤ 25%	0,09	0,16
Tỉ lệ mảnh vỡ bào tương >25%	0,18	0,006

Có mối tương quan nghịch yếu giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và tỉ lệ thụ tinh ($r = - 0,20$, $p = 0,002$).

Có mối tương quan nghịch yếu giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và tỉ lệ tạo phôi hữu dụng ngày 2/noãn MII ($r = - 0,16$, $p = 0,01$).

Độ phân mảnh DNA tinh trùng có mối tương quan nghịch yếu với tỉ lệ mảnh vỡ bào tương < 10% ($r = - 0,17$, $p = 0,008$), và tương quan thuận yếu với tỉ lệ mảnh vỡ bào tương > 25% ($r = 0,18$, $p = 0,006$).

3.1.3.2. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả tạo phôi nang

Bảng 3.15. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả phôi nang

Phân mảnh DNA tinh trùng Kết quả Phôi	n = 242 Giá trị trung bình	DFI < 15% n = 67	15% ≤ DFI < 30% n = 116	DFI ≥ 30% n = 59	p
Tỉ lệ tạo phôi nang/phôi ngày 2	63,86±25,61 (0 – 100)	66,89±22,20	62,41±25,80	63,27±28,79	0,51
Tỉ lệ tạo phôi nang độ 1/ phôi ngày 2	35,23±25,45 (0 – 100)	38,58±23,22	33,65±25,88	34,55±27,03	0,44
Tỉ lệ tạo phôi nang/ noãn MII	44,27±20,89 (0 – 100)	48,59±19,00	43,35±22,02	41,19±20,17	0,11
Tỉ lệ tạo phôi nang /hợp tử	60,89±24,56 (0 – 100)	65,20±22,21	58,35±24,03	60,98±27,64	0,19

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về khả năng tạo phôi nang ở ba nhóm phân mảnh DNA tinh trùng.

Nhóm DFI ≥ 30% có tỉ lệ tạo phôi nang/noãn MII (41,19 ± 20,17) thấp nhất trong ba nhóm phân mảnh DNA tinh trùng, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p = 0,11).

Bảng 3.16. Mối tương quan giữa DFI và kết quả phôi nang

Đặc điểm phôi ngày 5	DFI	
	r	p
Tỉ lệ tạo phôi nang/phôi ngày 2	- 0,04	0,51
Tỉ lệ tạo phôi nang độ 1/ phôi ngày 2	- 0,41	0,53
Tỉ lệ tạo phôi nang /noãn MII	- 0,15	0,02
Tỉ lệ tạo phôi nang /hợp tử	- 0,04	0,48

Không có mối tương quan giữa khả năng hình thành phôi nang tốt và mức độ phân mảnh DNA tinh trùng. Có mối tương quan nghịch yếu giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và tỉ lệ tạo phôi nang/ noãn MII ($r = - 0,15$, $p = 0,02$).

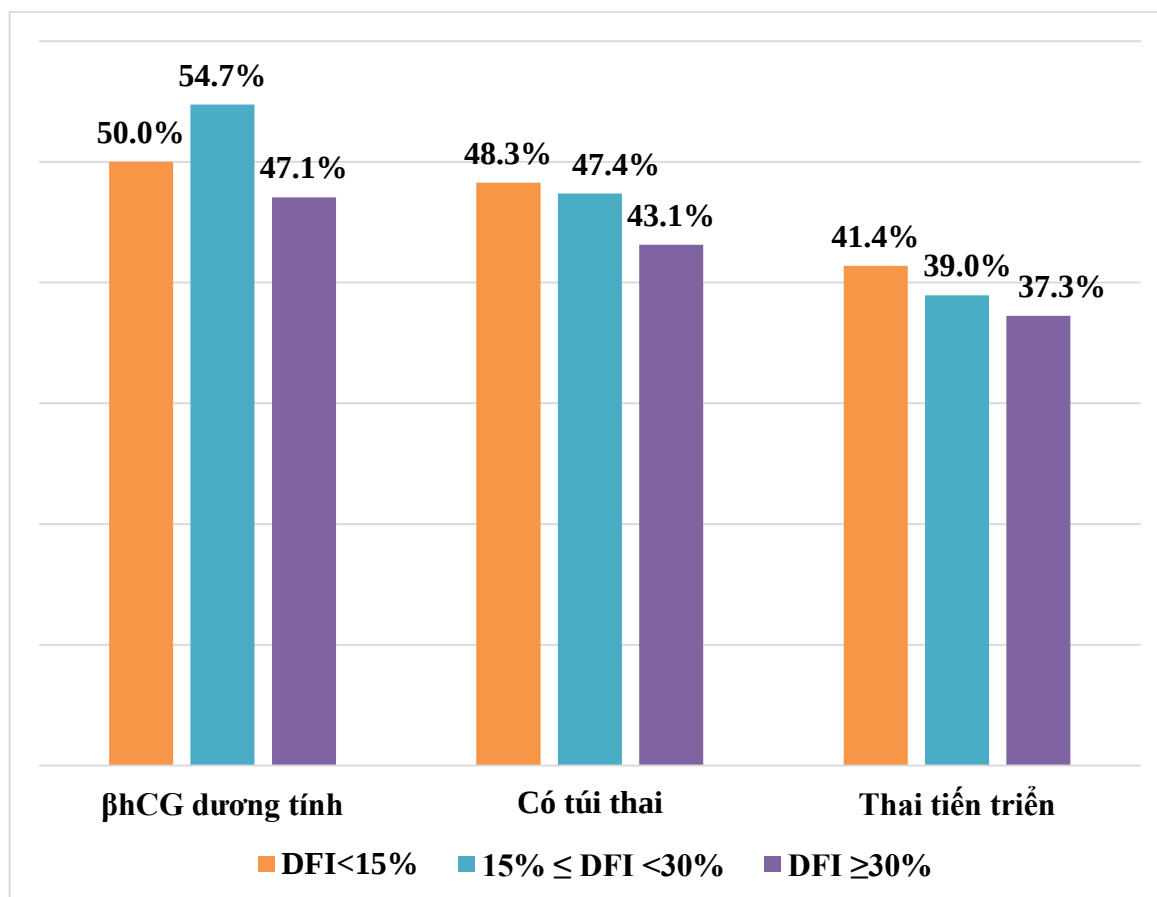
Bảng 3.17. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và các nhóm kết quả phôi

Phân mảnh DNA tinh trùng		n, (%) DFI	p
Kết quả phôi			
Tỉ lệ thụ tinh	< 75%	118, (48,8 %) 25,42 ± 15,85	0,05
	≥ 75%	124 (51,2%) 21,97±11,33	
Tỉ lệ tạo phôi hữu dụng ngày 2/MII	< 50%	73, (30,2%) 26,33 ± 15,40	0,05
	≥ 50%	169, (69,8%) 22,50 ± 12,93	
Tỉ lệ tạo phôi nang /MII	< 50%	138, (57,0%) 25,12 ± 14,62	0,06
	≥ 50%	104, (43,0%) 21,71 ± 12,43	

Nhóm tỉ lệ thụ tinh < 75% có DFI cao hơn so với nhóm tỉ lệ thụ tinh ≥ 75%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, ($25,42 \pm 15,85$ so với $21,97 \pm 11,33$, $p = 0,05$). Nhóm tỉ lệ tạo phôi hữu dụng ngày 2/MII < 50% có DFI cao hơn so với nhóm ≥ 50%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($26,33 \pm 15,40$ so với $22,50 \pm 12,93$, $p = 0,05$).

3.1.4. Đánh giá mối liên quan phân mảnh DNA tinh trùng đến kết quả chuyển phôi

Trong số 242 chu kỳ ICSI, có 204 chu kỳ có chuyển phôi. Tỷ lệ có βhCG dương tính đạt 105/204, 51,5%; số trường hợp có túi thai là 95/204, 46,6%; Số trường hợp thai tiến triển đạt 80/204, 39,2%, và tỷ lệ mất thai chung (thai sinh hoá và sảy thai): 25/204, 12,25%.



Biểu đồ 3.4. Kết quả sau chuyển phôi ở các nhóm phân mảnh DNA tinh trùng

Tỷ lệ có thai và thai tiến triển ở nhóm $DFI \geq 30\%$ thấp nhất trong 3 nhóm, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$.

Bảng 3.18. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả chuyển phôi

DFI		n (%)	p
Kết quả chuyển phôi		Giá trị trung bình	
βhCG	Dương tính	105 (51,47%) 23,68 ± 14,07	0,81
	Âm tính	99 (48,53%) 24,16 ± 14,52	
Túi thai	Có	95 (46,57%) 23,82 ± 14,56	0,93
	Không	109 (53,43%) 24,00 ± 14,06	
Thai tiến triển	Có	80 (39,22%) 23,75 ± 14,19	0,89
	Không	124, (60,78%) 24,02 ± 14,36	

Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê về mức độ phân mảnh DNA tinh trùng giữa các nhóm về kết quả sau chuyển phôi, $p > 0,05$.

3.2. TÁC ĐỘNG CỦA KỸ THUẬT CHỌN LỌC TINH TRÙNG SINH LÝ ĐẾN KẾT QUẢ TẠO PHÔI THỤ TINH TRONG ỐNG NGHIỆM

Kết quả nghiên cứu thu nhận được 74 cặp vợ chồng vô sinh đáp ứng được tiêu chuẩn lựa chọn, thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm tại Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế. Mỗi cặp vợ chồng thu nhận được số noãn ≥ 10 , một nửa số noãn được thực hiện kỹ thuật PICSI và một nửa số noãn được thực hiện kỹ thuật ICSI. Kết quả nghiên cứu được thể hiện như sau:

3.2.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu ở kỹ thuật PICSI-ICSI

3.2.1.1. Đặc điểm chung của người vợ và chồng

Bảng 3.19. Đặc điểm chung của người vợ ở kỹ thuật PICSI-ICSI

Đặc điểm	Giá trị	Giá trị trung bình	Nhỏ nhất–Lớn nhất
Tuổi (năm)		31,81± 4,39	22 – 44
< 35, n (%)		55 (74,3%)	
≥ 35, n (%)		19 (25,7%)	
BMI		21,29 ± 2,56	15,19 – 32,89
Đặc điểm vô sinh			
Thời gian vô sinh (năm)		4,30 ± 2,21	1 - 10
Vô sinh nguyên phát, n (%)		44 (59,5%)	
Vô sinh thứ phát, n (%)		30 (40,5%)	
Nguyên nhân vô sinh			
Do người vợ, n (%)		21 (28,4%)	
Do người chồng, n (%)		6 (8,1%)	
Do cả hai, n (%)		46 (62,2%)	
Không rõ nguyên nhân, n (%)		1 (1,3%)	
Đặc điểm nguyên nhân vô sinh			
Hội chứng buồng trứng đa nang, n (%)		41 (55,4%)	
Do vòi tử cung, n (%)		17 (23,0%)	
Tại tử cung, n (%)		12 (16,2%)	
Lạc nội mạc tử cung, n (%)		4 (5,4%)	
Đặc điểm nội tiết và noãn			
AMH (ng/mL)		4,95 ± 3,11	1,4 – 21,23
FSH (mIU/mL)		6,35 ± 1,46	4,06 – 10,50
Số noãn thu nhận		20,35 ± 7,50	10 – 43
Số noãn trưởng thành (MII)		15,97 ± 5,50	7 – 31

Tuổi trung bình của người vợ trong độ tuổi sinh sản, người vợ lớn tuổi (≥ 35 tuổi) chiếm tỉ lệ 25,7%.

Thời gian vô sinh trung bình là $4,30 \pm 2,21$ năm. Có 59,5% trường hợp là vô sinh nguyên phát. Nguyên nhân vô sinh từ cả hai vợ chồng chiếm tỉ lệ cao nhất là 62,2%. Về phía người vợ vô sinh do hội chứng buồng trứng đa nang có tỉ lệ gặp nhiều nhất (41/74, 55,4%).

Số noãn chọc hút được là $20,35 \pm 7,50$ (10 – 43) và số noãn trưởng thành MII thu nhận được trung bình ở mỗi chu kỳ ICSI là $15,97 \pm 5,50$ (7 – 31).

Bảng 3.20. Đặc điểm chung của người chồng ở kỹ thuật PICSI-ICSI

Giá trị Đặc điểm	Giá trị trung bình	Nhỏ nhất–Lớn nhất
Tuổi (năm)	35,73 ± 5,12	28 – 51
< 40, n (%)	59 (79,7%)	
≥ 40, n (%)	15 (20,3%)	
BMI	23,66 ± 2,70	17,19 – 33,70
Hút thuốc		
Có, n (%)	18 (24,3%)	
Không, n (%)	56 (75,7%)	
Uống rượu/bia		
Thường xuyên, n (%)	23 (31,1%)	
Không thường xuyên, n (%)	51 (68,9%)	

Độ tuổi trung bình của người chồng là $35,73 \pm 5,12$ (28 – 51) năm.

Về đặc điểm lối sống: có 24,3% trường hợp hút thuốc lá và 31,1% thường xuyên uống bia.

3.2.1.2. Đặc điểm mẫu tinh trùng

Bảng 3.21. Đặc điểm mẫu tinh trùng ở kỹ thuật PICSI-ICSI

Đặc điểm	Giá trị	Giá trị trung bình	Nhỏ nhất – lớn nhất
pH		7,24 ± 0,50	5,5 – 8,3
Thể tích (mL)		2,45 ± 1,18	1,0 – 6,0
Di động tiến tới (%)		31,72 ± 10,51	5 – 58
< 32%, n (%)		34 (45,9%)	
≥ 32%, n (%)		40 (54,1%)	
Mật độ (x10⁶/mL)		34,80 ± 13,14	5 – 65
<15x10 ⁶ /mL, n (%)		4 (5,4%)	
≥ 15x10 ⁶ /mL, n (%)		70 (94,6%)	
Tỉ lệ sống (%)		83,22 ± 5,16	70 – 92
Hình dạng bình thường (%)		3,85 ± 1,97	1 – 14
< 4%, n (%)		36 (48,6%)	
≥ 4%, n (%)		38 (51,4%)	
Bất thường đầu (%)		89,03 ± 5,59	78 – 98
Bất thường cổ đuôi (%)		51,95 ± 11,64	30 – 92
DFI %		23,85 ± 15,19	4,4 – 76,4
DFI < 30%, n (%)		56 (75,7%)	
DFI ≥ 30%, n (%)		18 (24,3%)	

Khả năng di động tiến tới trung bình là 31,72 ± 10,51%. Số trường hợp có độ di động tiến tới > 32% chiếm ưu thế hơn với 54,05%.

Mật độ tinh trùng trung bình trong giới hạn bình thường: 34,80 ± 13,14.10⁶/mL; có 4 trường hợp mẫu có mật độ thấp dưới ngưỡng.

Tỉ lệ mẫu hình dạng bình thường và dị dạng gần bằng nhau, lần lượt là 48,6% và 51,4%. Mức độ phân mảnh DNA tinh trùng trung bình là 23,85 ± 15,19 %, trong đó tỉ lệ DFI ≥ 30% là 18/74, 24,32%.

Bảng 3.22. Đặc điểm của tinh trùng ở mẫu sau lọc rửa

Đặc điểm \ Giá trị	Giá trị trung bình	Nhỏ nhất – lớn nhất
Mật độ sau lọc ($10^6/\text{mL}$)	$23,96 \pm 8,88$	4 – 45
Di động tiến tới sau lọc %	$83,96 \pm 9,94$	50 - 95
HBA %	$48,16 \pm 28,99$	1 - 90
HBA $\leq 60\%$, n (%)	43 (58,1%)	
HBA $> 60\%$, n (%)	31(41,9%)	

Sau lọc rửa mẫu tinh trùng có mật độ trung bình là $23,96 \pm 8,88\%$, và khả năng di động là $83,96 \pm 9,94\%$. Chỉ số gắn kết HBA trung bình là $48,16 \pm 28,99\%$, trong đó số mẫu gắn kết acid hyaluronic thấp HBA $\leq 60\%$ chiếm ưu thế với 58,1%.

Bảng 3.23. Mối liên quan giữa các chỉ số tinh trùng với khả năng gắn kết acid hyaluronic

Chỉ số \ Khả năng gắn kết	HBA $\leq 60\%$ n = 43	HBA $> 60\%$ n = 31	p
Hình dạng bình thường (%)	$3,63 \pm 1,69$	$4,16 \pm 2,30$	0,25
HBA (%)	$27,49 \pm 19,17$	$76,84 \pm 8,30$	0,00
DFI (%)	$23,40 \pm 14,00$	$24,47 \pm 16,91$	0,76
Di động tiến tới trước lọc rửa (%)	$30,42 \pm 11,26$	$33,52 \pm 9,27$	0,21
Di động tiến tới sau lọc rửa (%)	$81,37 \pm 10,69$	$87,55 \pm 7,57$	0,007
Mật độ trước lọc rửa ($\times 10^6/\text{mL}$)	$33,35 \pm 13,61$	$36,81 \pm 12,40$	0,27
Mật độ sau lọc rửa ($\times 10^6/\text{mL}$)	$21,93 \pm 9,20$	$26,77 \pm 7,70$	0,02

Tinh trùng trong nhóm HBA $> 60\%$ có tỉ lệ hình dạng bình thường nhiều hơn so với nhóm HBA $\leq 60\%$, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,25$. Tinh trùng sau lọc rửa ở nhóm HBA $> 60\%$ di động tốt hơn so với nhóm HBA $\leq 60\%$ ($87,55 \pm 7,56$ so với $81,37 \pm 10,69$, $p = 0,007$). Mật độ sau lọc rửa ở nhóm HBA $> 60\%$ nhiều hơn so với nhóm HBA $\leq 60\%$ ($26,77 \pm 7,70$ so với $21,93 \pm 9,20$, $p = 0,02$).

Bảng 3.24. Đánh giá mối tương quan giữa khả năng gắn kết acid hyaluronic và các đặc điểm tinh trùng

Đặc điểm	HBA	
	r	p
Hình dạng bình thường	0,06	0,62
DFI	0,02	0,84
Di động tiến tới trước lọc rửa	0,11	0,37
Di động tiến tới sau lọc rửa	0,29	0,01
Mật độ trước lọc rửa	0,14	0,23
Mật độ sau lọc rửa	0,21	0,08

Có mối tương quan thuận yếu giữa khả năng gắn kết acid hyaluronic của tinh trùng và khả năng di động sau lọc rửa: $r = 0,29$, $p = 0,01$;

Không có mối tương quan giữa khả năng gắn kết acid hyaluronic và các đặc điểm tinh trùng về hình dạng, độ di động, mật độ và mức độ phân mảnh DNA tinh trùng (trước lọc rửa) và mật độ tinh trùng sau lọc rửa.

3.2.2. Kết quả thụ tinh trong ống nghiệm của kỹ thuật PICSI và ICSI

3.2.2.1. Kết quả nuôi cấy phôi của kỹ thuật PICSI và ICSI

Bảng 3.25. So sánh kết quả nuôi cấy phôi giữa hai kỹ thuật PICSI và ICSI

Hai kỹ thuật Kết quả phôi	PICSI	ICSI	p
Số noãn MII	585	596	
Thụ tinh (n; %)	434; 74,2%	447; 75,00%	0,75
Kết quả hình thành phôi phân chia ngày 2	/434	/447	
Phôi phân chia (n; %)	413; 95,2%	432; 96,6%	0,27
Phôi phân chia độ 1 (n; %)	263; 60,6%	291; 65,1%	0,17
Phôi phân chia độ 2 (n; %)	86; 19,8%	79 ; 17,7%	0,41
Đặc điểm phôi giai đoạn phân chia ngày 2	/413	/432	
Phôi dưới 4 tế bào (n; %)	94; 22,8%	82; 19,0%	0,18
Phôi 4 tế bào (n; %)	241; 58,4%	252; 58,3%	0,99
Phôi trên 4 tế bào (n; %)	78; 18,9%	97; 22,5%	0,20
Mảnh vỡ bào tương < 10% (n; %)	324; 78,5%	345; 79,9%	0,61
10% ≤ mảnh vỡ bào tương ≤ 25% (n; %)	76; 18,40%	67; 15,5%	0,26
Mảnh vỡ bào tương >25% (n; %)	13; 3,1%	20; 4,6%	0,27
Kết quả hình thành phôi nang	/413	/432	
Phôi nang (n; %)	256; 62,0%	251; 58,1%	0,25
Phôi nang độ 1 (n; %)	114; 27,6%	143; 33,1%	0,08
Phôi nang độ 2 và 3 (n; %)	142; 34,4%	108; 25,0%	0,003

Không có sự khác biệt về tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi phân chia ngày 2, và đặc điểm phôi phân chia giữa 2 nhóm PICSI và ICSI ($p > 0,05$). Ở nhóm PICSI, tỉ lệ hình thành phôi nang độ 1 thấp hơn so với nhóm ICSI, khác biệt có xu hướng có ý nghĩa thống kê: 27,6% so với 33,10%, $p = 0,08$. Tỉ lệ tạo phôi nang độ 2 và 3 ở nhóm PICSI cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm ICSI: 34,4% so với 25,0%, $p = 0,003$.

3.2.2.2. So sánh kết quả nuôi cấy phôi của kỹ thuật PICSI và ICSI ở các nhóm đặc điểm tinh trùng

Bảng 3.26. So sánh kết quả nuôi cấy phôi giữa hai kỹ thuật PICSI và ICSI ở nhóm hình dạng tinh trùng

Nhóm hình dạng Kết quả phôi	Hình dạng bình thường $\geq 4\%$			Hình dạng bình thường $< 4\%$		
	PICSI 310 MII	ICSI 312 MII	p	PICSI 275 MII	ICSI 284 MII	p
Thụ tinh (n; %)	234 75,5%	239 76,6%	0,74	200 72,7%	208 73,2%	0,89
Kết quả hình thành phôi phân chia ngày 2						
Phôi phân chia (n; %)	225 96,2%	232 97,1%	0,66	188 94,0%	200 96,2%	0,31
Phôi phân chia độ 1 (n; %)	151 64,6%	164 68,6%	0,35	112 56,0%	127 61,1%	0,30
Phôi phân chia độ 2 (n; %)	44 18,8%	42 17,6%	0,73	42; 21,0%	37 17,8%	0,41
Kết quả hình thành phôi nang						
Phôi nang (n; %)	155 68,9%	154; 66,4%	0,52	101 53,7%	97 48,5%	0,30
Phôi nang độ 1 (n; %)	76 33,8%	93 40,1%	0,14	38 20,2%	50 25%	0,22
Phôi nang độ 2 và 3 (n; %)	79 35,1%	61 26,3%	0,04	63 33,5%	47 23,5%	0,03

Ở cả hai nhóm tinh trùng có hình dạng bình thường và bất thường, tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ hình thành phôi phân chia ngày, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Khả năng hình thành phôi nang độ 1 ở kỹ thuật PICSI đều thấp hơn so với ICSI ở cả hai nhóm hình dạng tinh trùng, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Kỹ thuật PICSI tạo được nhiều phôi nang độ 2 và 3 hơn so với ICSI ở cả hai nhóm hình dạng tinh trùng, lần lượt $p = 0,04$ và $p = 0,03$

Bảng 3.27. So sánh kết quả nuôi cấy phôi giữa hai kỹ thuật PICSI và ICSI ở nhóm
tình trùng di động nhanh – chậm

Nhóm di động Kết quả phôi	Di động tiến tới $\geq 32\%$			Di động tiến tới $< 32\%$		
	PICSI 328 MII	ICSI 331 MII	p	PICSI 257 MII	ICSI 265 MII	p
Thụ tinh (n; %)	241 73,5%	257 77,6%	0,21	193 75,1%	190 71,7%	0,38
Kết quả hình thành phôi phân chia ngày 2						
Phôi phân chia (n; %)	229 95,0%	249 96,9%	0,29	184 95,3%	183 96,3%	0,63
Phôi phân chia độ 1 (n; %)	151 62,6%	171 66,5%	0,36	112 58,0%	120 63,1%	0,30
Phôi phân chia độ 2 (n; %)	46 19,1%	48 18,7%	0,91	40 20,7%	31 16,3%	0,28
Kết quả hình thành phôi nang						
Phôi nang (n; %)	145 63,3%	148 59,2%	0,36	111 60,3%	103 56,2%	0,43
Phôi nang độ 1 (n; %)	64 27,9%	83 33,3%	0,16	50; 27,2%	60; 32,8%	0,22
Phôi nang độ 2 và 3 (n; %)	81 35,4%	65 26,1%	0,03	61; 33,2%	43; 23,5%	0,04

Trong nhóm tình trùng di động nhanh: Không có sự khác biệt về tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi phân chia ngày 2. Tỉ lệ phôi nang độ 1 ở PICSI thấp hơn so với ICSI, khác biệt không có ý nghĩa thống kê (27,9% so với 33,3% $p = 0,16$); tỉ lệ phôi nang độ 2 ở PICSI cao hơn có ý nghĩa thống kê so với ICSI (35,4% so với 26,1%, $p = 0,03$).

Trong nhóm tình trùng di động chậm: Không có sự khác biệt về tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi phân chia ngày 2. Tỉ lệ phôi nang độ 1 ở PICSI thấp hơn so với ICSI, khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,22$, tỉ lệ phôi nang độ 2 và 3 ở PICSI cao hơn có ý nghĩa thống kê so với ở ICSI (33,2% so với 23,5%, $p = 0,04$).

Bảng 3.28. So sánh kết quả nuôi cấy phôi giữa hai kỹ thuật PICSI và ICSI ở nhóm tình trùng có phân mảnh DNA thấp - cao

Nhóm phân mảnh DNA Kết quả phôi	DFI < 30% n = 56			DFI ≥ 30% n = 18		
	PICSI 435 MII	ICSI 448 MII	p	PICSI 150 MII	ICSI 148 MII	p
Thụ tinh (n; %)	317 72,9%	336 75,0%	0,47	117 78,0%	111 75,0%	0,54
Kết quả hình thành phôi phân chia ngày 2						
Phôi phân chia (n; %)	304 95,9%	323 96,1%	0,88	109 93,2%	109 98,2%	0,06
Phôi phân chia độ 1 (n; %)	197 65,5%	220 62,1%	0,38	66 56,4%	71 64,0%	0,24
Phôi phân chia độ 2 (n; %)	62 19,6%	61 18,15%	0,65	24 20,5%	18 16,2%	0,40
Kết quả hình thành phôi nang						
Phôi nang (n; %)	189 62,2%	186 57,4%	0,22	67 61,5%	65 59,6%	0,78
Phôi nang độ 1 (n; %)	77 25,4%	98 30,2%	0,16	37 33,9%	45 41,2%	0,16
Phôi nang độ 2 và 3 (n; %)	112 36,8%	88 27,2%	0,009	30 27,5%	20 18,4%	0,12

Trong nhóm tình trùng DFI <30%: sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ thụ tinh và tạo phôi phân chia ngày 2. Tỉ lệ phôi nang độ 1 ở PICSI thấp hơn so với ICSI, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,16$); tỉ lệ tạo phôi nang độ 2 ở PICSI cao hơn có ý nghĩa thống kê so với ICSI (36,8% so với 27,2%, $p = 0,009$).

Trong nhóm tình trùng DFI ≥ 30%: Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ thụ tinh và tạo phôi phân chia ngày 2. Tỉ lệ phôi nang độ 1 ở PICSI thấp hơn so với ICSI, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,16$); tỉ lệ phôi nang độ 2 và 3 ở PICSI cao hơn so với ICSI, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,12$.

Bảng 3.29. So sánh kết quả nuôi cấy phôi giữa hai kỹ thuật PICSI và ICSI ở nhóm tình trùng có khả năng gắn kết acid hyaluronic thấp - cao

Nhóm gắn kết HBA Kết quả phôi	HBA ≤ 60%			HBA > 60%		
	PICSI 330 MII	ICSI 338 MII	p	PICSI 255 MII	ICSI 258 MII	p
Thụ tinh (n; %)	241 73,0%	261 77,2%	0,21	193 75,7%	186 72,1%	0,35
Kết quả hình thành phôi phân chia ngày 2						
Phôi phân chia (n; %)	229 95,0%	251 96,2%	0,53	184 95,3%	181 97,3%	0,31
Phôi phân chia độ 1 (n; %)	150 62,2%	183 70,1%	0,06	113 58,5%	108 58,1%	0,92
Phôi phân chia độ 2 (n; %)	45 18,7%	38 14,6%	0,21	41 21,2%	41 22,0%	0,85
Kết quả hình thành phôi nang						
Phôi nang (n; %)	142 62,0%	146 58,2%	0,36	114 62,0%	105 58,0%	0,44
Phôi nang độ 1 (n; %)	61 26,6%	85 33,9%	0,07	53 28,8%	58 32,0%	0,43
Phôi nang độ 2 và 3 (n; %)	81 35,4%	61 24,3%	0,007	61 33,2%	47 26,0%	0,13

Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ thụ tinh, hình thành phôi phân chia giữa hai kỹ thuật PICSI và ICSI ở cả hai nhóm tình trùng gắn kết hyaluronic acid.

Với tình trùng gắn kết acid hyaluronic thấp: hình thành phôi nang độ 1 ở ICSI cao hơn có xu hướng ý nghĩa thống kê so với PICSI, $p = 0,07$. Tuy nhiên, tỉ lệ phôi nang độ 2 ở nhóm PICSI cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm ICSI: 35,4% so với 24,3%, $p = 0,007$.

Với tình trùng gắn kết với acid hyaluronic cao hình thành phôi nang độ 1 ở ICSI nhiều hơn so với PICSI, khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,43$. Khả năng hình thành phôi nang độ 2 và 3 ở PICSI cao hơn so với ICSI, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,13$.

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. MỐI LIÊN QUAN GIỮA PHÂN MẢNH DNA TINH TRÙNG VỚI CÁC CHỈ SỐ TINH DỊCH ĐỒ, CHẤT LƯỢNG PHÔI VÀ KẾT QUẢ THỤ TINH TRONG ONG NGHIỆM

4.1.1. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng với các chỉ số tinh dịch đồ

4.1.1.1. Đặc điểm phân mảnh DNA tinh trùng

Đánh giá về mức độ phân mảnh DNA tinh trùng ở mẫu tinh dịch cặp vợ chồng vô sinh, kết quả ghi nhận giá trị DFI trung bình là $23,65 \pm 13,80\%$, kết quả này gần tương đồng so với 2 nghiên cứu tại Việt Nam tại miền Bắc và miền Nam về mẫu tinh trùng nam giới cặp vợ chồng vô sinh, lần lượt là $21,58 \pm 15,53\%$ [6], và $19,16 \pm 13,68\%$ [16]. Hai nghiên cứu này thực hiện kỹ thuật khảo sát chất nhuộm sắc tinh trùng, còn chúng tôi áp dụng kỹ thuật đánh giá phân tán chất nhuộm sắc. Như vậy có thể thấy rằng DFI nam giới cặp vợ chồng vô sinh ở Việt Nam dao động từ 19-24%. Bên cạnh đó tỉ lệ nam giới có $DFI \geq 30\%$ trong nghiên cứu này là 24,4%; tỉ lệ nam giới có $DFI \% \geq 30\%$ chiếm khoảng 19-25% cũng được báo cáo trong các nghiên cứu ở Việt Nam [6], [16]; hoặc nghiên cứu của tác giả Marchlewska và cộng sự năm 2016 áp dụng kỹ thuật phân tán chất nhuộm sắc cũng báo cáo tỉ lệ $DFI \geq 30\%$ chiếm 24% ở nam giới cặp vợ chồng vô sinh [98]. Tuy nhiên một số nghiên cứu khác cũng có sự chênh lệch về tỉ lệ này, có thể do khác nhau về cỡ mẫu, và đối tượng nghiên cứu. Với nghiên cứu của tác giả Borges B và cộng sự áp dụng kỹ thuật phân tán chất nhuộm sắc đánh giá phân mảnh ở những nam giới có chỉ số tinh trùng trong giới hạn bình thường, kết quả $DFI \% \geq 30\%$ chiếm tỉ lệ thấp với 8,84%, nghiên cứu của chúng tôi thấy rằng ở những mẫu có chỉ số tinh dịch đồ bình thường có đến 26,9% trường hợp $DFI \geq 30\%$; trong nghiên cứu của tác giả Yang và cộng sự 2019 sử dụng kỹ thuật khảo sát chất nhuộm sắc có tỉ lệ mẫu $DFI \geq 30\%$ ở những trường hợp thực hiện IVF và ICSI là 10,79% [164]. Ngoài ra chúng tôi cũng quan sát thấy giá trị DFI trung bình ở mức cao có tương đồng trong một số nghiên cứu

khác: $38,54 \pm 10,14\%$ [26], $37,67 \pm 6,39\%$ [35], và của nghiên cứu này là $43,38 \pm 12,82\%$ (Bảng 3.8).

Qua các kết quả nhận thấy ở những cặp vợ chồng vô sinh có tỉ lệ cao các trường hợp với mức độ tổn thương DNA tinh trùng nặng. Bên cạnh đó, kết quả ghi nhận mức DFI cao ở nhóm vô sinh không rõ nguyên nhân ($27,10 \pm 16,02\%$), tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với các nguyên nhân khác. Nhưng có thể thấy cần xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng để tìm hiểu rõ nguyên nhân vô sinh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy với những tinh trùng được đánh giá là phân mảnh DNA thì những tinh trùng có đặc điểm quãng nhỏ chiếm đa số; ở những tinh trùng không phân mảnh DNA, tỉ lệ quãng trung bình chiếm ưu thế hơn so với những tinh trùng quãng lớn (Bảng 3.5).

4.1.1.2. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và đặc điểm tinh dịch đồ

Những khảo sát đánh giá chi tiết về nguyên nhân vô sinh do yếu tố nam vẫn chưa phổ biến, phân tích tinh dịch đồ là một xét nghiệm thường qui nhưng không phát hiện được bất thường trong nhân tinh trùng. Những năm gần đây các xét nghiệm phân mảnh DNA đã được chấp nhận tương đối rộng rãi, mặc dù vai trò lâm sàng chưa thực sự rõ rệt... Theo phiên bản mới của WHO 2021 về hướng dẫn xét nghiệm và xử lý tinh dịch, đã bổ sung hướng dẫn các xét nghiệm phân mảnh DNA vào để khảo sát khả năng sinh sản của nam giới [160].

Hiện nay, có nhiều báo cáo về mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và các chỉ số tinh dịch, các báo cáo được lồng ghép trong các nghiên cứu về ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng đến kết quả HTSS, thụ tinh trong ống nghiệm hoặc trong nghiên cứu ở nhóm đối tượng cụ thể. Bên cạnh đó mỗi nghiên cứu có phương pháp xét nghiệm khác nhau, do đó mối liên quan giữa DFI và các thông số tinh trùng còn khác nhau ở mỗi nghiên cứu. Một số báo cáo mối tương quan chặt chẽ giữa DFI và các thông số tinh dịch [39], [112], [144], [164]. DFI cũng có thể được sử dụng song song như một thước đo tiêu chuẩn trong việc đánh giá khả năng sinh sản của nam giới. Tuy nhiên, ở trong một số nghiên cứu khác báo cáo mối liên quan chưa rõ ràng giữa DFI và các thông số tinh dịch đồ [81], [154]. Bảng tóm tắt sau liệt kê một số nghiên cứu gần đây có đánh giá mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và chỉ số tinh dịch đồ:

Bảng 4.1. Một số nghiên cứu về mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và các chỉ số tinh trùng

	pH	Thể tích	Di động	Mật độ	Hình dạng
Sivanarayana (2014) [144]	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
Borges E (2019) [35]	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
Vinnakota C (2019) [154]	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
Osaka A (2022) [112]		(-)	(+)	(+)	(+)
Dương Thị Nhân (2020) [6]	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
Hồ Mạnh Tường (2020) [16]	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
Kết quả của nghiên cứu này	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)

(+): Có mối liên quan

(-): Không có mối liên quan

pH, thể tích tinh dịch, mật độ

Trong quá trình biệt hóa từ tinh tử thành tinh trùng, phần bào tương thừa được tách khỏi tinh trùng dẫn đến giảm lượng bào tương của tế bào tinh trùng, do đó hạn chế chất chống oxy hóa nội bào, như vậy cần đến chất chống oxy hóa ngoại bào để cân bằng oxy hóa. Dịch tinh được tiết ra từ túi tinh, tuyến tiền liệt và tuyến hành niệu đạo, cung cấp độ pH tối ưu, độ nhớt, dinh dưỡng và một phần đáng kể chất chống oxy hóa [32]. Theo ngưỡng tham khảo của WHO (2010, 2021) giá trị 7,2 được sử dụng là ngưỡng tham khảo tối thiểu [161], [160]. Nếu pH nhỏ hơn 7,0 trong mẫu tinh dịch với thể tích ít và số lượng tinh trùng thấp có thể do tắc nghẽn ống dẫn tinh hay bất sản cả hai ống dẫn tinh. Trong nghiên cứu của chúng tôi giá trị

trung bình của pH tinh tịch trong nhóm DFI $\geq 30\%$ ($7,19 \pm 0,41$) thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với hai nhóm mức độ phân mảnh DNA thấp và trung bình (Bảng 3.8). Ngoài ra, khi phân tích mối tương quan giữa pH và mức độ phân mảnh DNA tinh trùng, kết quả ghi nhận mối tương quan nghịch yếu với DFI ($r = - 0,21$, $p = 0,001$). Tác giả Garcia-Segura S và cộng sự (2020) báo cáo pH có mối tương quan nghịch về mức độ oxy hóa hiệu chỉnh theo độ nhớt của mẫu tinh dịch ($p = - 0,347$, $p < 0,05$), không có mối tương quan về mức độ oxy hóa hiệu chỉnh theo mật độ tinh trùng và pH, độ pH càng giảm thì mức độ oxy hóa càng tăng, dẫn đến mất cân bằng oxy hóa, dẫn đến có thể gây tổn thương DNA tinh trùng [59].

Đánh giá về thể tích tinh dịch giữa các nhóm mức độ phân mảnh DNA tinh trùng, kết quả cho thấy ở những mẫu DFI $\geq 30\%$ có thể tích tinh dịch ít hơn hơn so với mẫu DFI $< 30\%$, tuy nhiên sự khác biệt không ý nghĩa thống kê với $p = 0,09$ (Bảng 3.8). Ngoài ra, cũng không ghi nhận mối tương quan giữa DFI và thể tích tinh dịch. Lượng tinh dịch chủ yếu được tiết ra ở các tuyến sinh dục không liên quan đến sự toàn vẹn DNA. Đa số các nghiên cứu đều không thấy có mối liên quan giữa thể tích và DFI, tuy nhiên trong nghiên cứu của tác giả Borges và cộng sự (2019) có ghi nhận thể tích tinh dịch ở nhóm DFI $< 30\%$ thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm DFI $\geq 30\%$ ($2,94 \pm 0,50$ so với $3,79 \pm 1,09$ mL, $p = 0,001$) [35].

Mật độ và tổng số tinh trùng trong một lần xuất tinh sẽ đánh giá được khả năng tạo tinh trùng của tinh hoàn, cũng như sự thông suốt của ống dẫn tinh. Kết quả của nghiên cứu cho thấy nhóm DFI cao có mật độ tinh trùng ít hơn có ý nghĩa thống kê so với hai nhóm DFI thấp và trung bình, với $p = 0,03$ (Bảng 3.8). Ngoài ra, những mẫu mật độ tinh trùng ít ($< 15 \times 10^6/\text{mL}$) có độ phân mảnh DNA cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm có mật độ bình thường ($p = 0,05$) (Bảng 3.8). Báo cáo của tác giả Dương Thị Nhân (2020) cũng cho thấy nhóm mật độ tinh trùng $< 15 \times 10^6/\text{mL}$ có DFI là $26,66 \pm 18,77\%$ cao hơn DFI ở nhóm $\geq 15 \times 10^6/\text{mL}$ là $19,43 \pm 13,46\%$ với $p = 0,008$. Như vậy sự bất thường trong quá trình sinh tinh làm giảm số lượng tinh trùng có mối liên quan đến sự tổn thương DNA tinh trùng. Điều này cũng được chứng minh thông qua các nguyên nhân dẫn đến phân mảnh DNA tinh trùng. Những tổn thương do stress oxy hóa gây ra đối với DNA nhân có thể đẩy

nhánh quá trình chết theo chương trình của tế bào mầm, dẫn đến suy giảm sản xuất tinh trùng và làm giảm số lượng tinh trùng mỗi lần xuất tinh [12].

Độ di động tinh trùng

Mối liên quan về độ di động và phân mảnh DNA tinh trùng được báo cáo trong nhiều nghiên cứu: độ di động tiến tới nhóm DFI < 30% cao hơn có ý nghĩa so với so với nhóm DFI $\geq 30\%$ ($54,90 \pm 14,27$ so với $46,50 \pm 16,77$, $p = 0,001$) trong nghiên cứu của tác giả Borges (2019) [35]. Kết quả của tác giả Vinnakota C và cộng sự (2019) cho thấy tỉ lệ tinh trùng di động ở các nhóm mức độ phân mảnh DNA thấp, trung bình, cao lần lượt là $55,3 \pm 15,8$; $50,2 \pm 15,2$; $38,8 \pm 16,1$ (sự khác biệt có ý nghĩa thống kê) [154]. Ngoài ra, tác giả Muriel chỉ ra độ di động tiến tới của tinh trùng tương quan nghịch với tỉ lệ tinh trùng có quầng nhỏ ($r = -0,22$, $p = 0,04$) và tương quan thuận với tỉ lệ tinh trùng có quầng lớn ($r = 0,30$, $p < 0,01$) [104]. Trong nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận được có mối liên quan giữa DFI và khả năng di động tiến tới, kết quả cho thấy độ di động tiến tới ở mẫu DFI < 15% di động nhanh hơn so với hai nhóm mức độ trung bình và cao (Bảng 3.8). Tuy nhiên, DFI ở nhóm mẫu tinh trùng di động yếu cao hơn so với nhóm tinh trùng di động tốt, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (Bảng 3.10). Tác giả Hee-Jun Chi và cộng sự (2017) báo cáo phân mảnh DNA tinh trùng có mối tương quan nghịch với tất cả các thông số động học, nhưng mối tương quan mạnh nhất với vận tốc đường trung bình và tuyến tính, có nghĩa là tinh trùng có khả năng di chuyển một khoảng cách dài thể hiện được có tính toàn vẹn DNA cao [39]. Mức độ phân mảnh DNA tinh trùng cho thấy mối tương quan nghịch với khả năng di chuyển nhanh mạnh hơn đáng kể so với khả năng di chuyển trung bình hoặc chậm. Có thể thấy rằng, những mẫu có độ di động tốt thì tinh trùng ít phân mảnh DNA. Một nghiên cứu khác về chất lượng DNA tinh trùng cho thấy tỉ lệ dị bội ở nam giới có DNA tinh trùng phân mảnh thường cao hơn. Những thay đổi trong DNA ty thể của tinh trùng có thể dẫn đến suy giảm chức năng của ty thể, giảm khả năng cung cấp năng lượng cho tinh trùng, do đó giảm khả năng vận động và giảm khả năng thụ tinh [12]. Những minh chứng này cho thấy rằng lựa chọn tinh trùng có khả năng di chuyển nhanh trong ICSI là một cách tiếp cận để chọn tinh trùng có tính toàn vẹn DNA cao.

Hình dạng tinh trùng

Những bất thường về hình thái tinh trùng và bất thường về độ trưởng thành NST của tinh trùng có thể được coi là những chỉ số đánh giá khả năng sinh sản của nam giới [44], [114]. Vì vậy, việc đánh giá các bất thường về cấu trúc tinh trùng và tổn thương DNA tinh trùng là rất quan trọng trong quá trình đánh giá khả năng sinh sản của nam giới. Hình dạng tinh trùng là chỉ số phù hợp nhất trong phân tích tinh dịch thông thường để dự đoán khả năng thụ tinh. Kết quả nghiên cứu ghi nhận nhóm DFI $\geq 30\%$ có tỷ lệ hình dạng bình thường thấp nhất, nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa với $p = 0,26$. Tuy nhiên, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,03$) về bất thường cổ đuôi tinh trùng, nhóm DFI cao có tỉ lệ tinh trùng bất thường cổ đuôi ($55,76 \pm 12,81$) cao hơn hai nhóm DFI thấp và trung bình (Bảng 3.8). Bên cạnh đó không quan sát thấy sự khác biệt về phân mảnh DNA tinh trùng giữa hai nhóm hình dạng bình thường và bất thường (Bảng 3.10). Khi phân tích tương quan chúng tôi nhận thấy rằng có mối tương quan nghịch giữa DFI và hình dạng bình thường và có tương quan thuận yếu với bất thường cổ đuôi, lần lượt là $r = -0,13$, $p = 0,04$ và $r = 0,23$, $p = 0,00$ (Bảng 3.12).

Các nghiên cứu gần đây cũng ghi nhận mối tương quan giữa DFI và hình dạng tinh trùng. Báo cáo của tác giả Osaka A (2022) có tương quan nghịch giữa DFI và hình dạng tinh trùng bình thường với $r = -0,378$, $p < 0,001$ [112]; mật độ, khả năng di động và hình dạng bình thường thấp hơn đáng kể ở nhóm có DFI cao so với nhóm DFI bình thường được báo cáo trong nghiên cứu của Sivanarayana và cộng sự [144]. Tác giả Muriel và cộng sự chỉ ra mối tương quan nghịch giữa DFI và hình dạng tinh trùng ($r = -0,29$, $p = 0,04$) [104]. Về hình dạng tinh trùng, các bất thường ở đầu, đặc biệt là đầu bất định hình có liên quan với DFI cao [44]. Đánh giá hình dạng đầu tinh trùng bằng cách phân tích hình elip và phát hiện sự phân mảnh DNA bằng xét nghiệm TUNEL, nhóm tác giả Utsuno và cộng sự kết luận rằng đầu tinh trùng có hình elip bất thường và không bào lớn có mối liên quan đến phân mảnh DNA [151].

Nam giới có tinh trùng dị dạng nhiều cho thấy gia tăng chất oxy hóa, DNA biến tính và DNA phân mảnh cao hơn đáng kể [114]. Jakubik-Uljasz J và cộng sự

báo cáo rằng DFI có tương quan thuận tỉ lệ tinh trùng có bất thường đầu, giữa và đuôi, tinh trùng có giọt bào tương thừa [77]. Phân mảnh DNA tinh trùng chủ yếu xảy ra do quá trình trưởng thành khiếm khuyết từ tinh trùng thành tinh trùng trưởng thành, quá trình chết theo chương trình trong tinh hoàn và mất cân bằng oxy hóa trên toàn bộ đường sinh sản của nam giới [20], [125]. Một trong những nguyên nhân dẫn đến tinh trùng có hình dạng bất thường là sự thoát khỏi quá trình chết theo chương trình, với tế bào mầm được đánh dấu chết theo chương trình, nhưng tế bào không bị thoái hóa mà vẫn phát triển, phân chia giảm phân, điều này dẫn đến những bất thường về hình dạng, cũng như tổn thương DNA [133]. Do đó, mối quan hệ giữa hình dạng tinh trùng và mức độ phân mảnh DNA là có thể dự đoán được.

4.1.1.3. Đặc điểm phân mảnh DNA tinh trùng và một số yếu tố liên quan

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích thêm một số yếu tố liên quan của người chồng bao gồm tuổi, BMI, thuốc lá và rượu bia và phân mảnh DNA tinh trùng. Những yếu tố này đã được chứng minh là ảnh hưởng đến chỉ số tinh trùng thường quy.

Tuổi

Lão hóa là một quá trình tất yếu tự nhiên ảnh hưởng đến mỗi cá nhân và kéo theo một loạt các thay đổi sinh lý trong cơ thể. Một trong những thay đổi liên quan đến lão hóa là giảm khả năng sinh sản. Có mối liên quan giữa tuổi và những thay đổi về cấu trúc và chức năng của các cơ quan sinh dục và hệ thống nội tiết, do đó cho thấy có ảnh hưởng đến các thông số và khả năng sinh sản của tinh trùng. Tuổi có liên quan đến sự gia tăng ROS, dẫn đến tăng quá trình peroxy hóa lipid và hình thành các loại phản ứng oxy hóa trong ty thể [67]. Khả năng chống oxy hóa của cơ thể giảm và tác động của oxy hóa đối với DNA tinh trùng trở nên dễ dàng hơn. Điện thế màng ty thể suy giảm đáng kể theo tuổi, do đó có dẫn đến sự phân mảnh DNA tinh trùng liên kết với tổn thương ty thể [117]. Nghiên cứu của tác giả Pino và cộng sự (2020) tìm thấy mối tương quan giữa tuổi và sự phân mảnh DNA tinh trùng. Nam giới trên 50 tuổi có sự gia tăng có ý nghĩa thống kê về tổn thương DNA và có khả năng bị phân mảnh DNA tinh trùng cao hơn 4,58 lần so với nam giới ở độ tuổi 21-30 [118]. DFI gia tăng theo tuổi cũng đã được báo cáo trong các nghiên cứu

khác, trong đó DFI cao thường xuất hiện ở bệnh nhân nam từ 35 tuổi trở lên [45], [96], [95]. Kết quả hiện tại của chúng tôi không ghi nhận sự khác biệt về DFI giữa nhóm tuổi < 40 và ≥ 40 (Bảng 3.6), người chồng trong nghiên cứu của chúng tôi phần lớn đều tuổi trẻ trong độ tuổi sinh sản nên chưa phân tích được sự ảnh hưởng của tuổi đến chất lượng tinh trùng và DNA tinh trùng. Với các nghiên cứu tập trung về ảnh hưởng của tuổi đến DNA tinh trùng, các tác giả cho rằng nên điều trị phân mảnh DNA những người đàn ông lớn tuổi khi họ đang có mong muốn có con.

Thuốc lá

Thành phần chính của khói thuốc là nicotine và chất chuyển hóa của nó là cotinine. Các hợp chất này có thể vượt qua hàng rào máu-tinh hoàn, sau đó gây hại ở các mức độ khác nhau đối với tế bào mầm. Hút thuốc đã được chứng minh là không chỉ làm giảm khả năng vận động của tinh trùng, nồng độ tinh trùng, và tăng hình dạng tinh trùng bất thường mà còn gây ra hiện tượng sai lệch di truyền và biểu sinh trong tinh trùng. Cả hai nghiên cứu trên động vật và con người đều nhấn mạnh sự xuất hiện phân mảnh DNA tinh trùng, sự bất ổn định của bộ gene, đột biến gene và sự hiện diện của các thể dị bội trong dòng mầm của động vật và nam giới tiếp xúc với khói thuốc [111]. Sử dụng xét nghiệm Comet, La Maestro và cộng sự (2015) quan sát thấy cả đứt gãy sợi đơn và sợi đôi cao hơn đáng kể ở những con chuột tiếp xúc với khói thuốc lá từ sơ sinh đến thời trưởng thành so với những chuột nhóm chứng [90].

Hút thuốc lá đã được nghiên cứu đánh giá tác động đối với phân mảnh DNA tinh trùng. Trong một nghiên cứu phân tích ngẫu nhiên 108 cặp vợ chồng bị vô sinh không rõ nguyên nhân của tác giả Aboulmaouahib và cộng sự, 26 trường hợp người chồng có hút thuốc, sự phân mảnh DNA tinh trùng và sự khử NST được phân tích thông qua xét nghiệm TUNEL và nhuộm màu xanh anilin; mức độ phân mảnh DNA và sự ngưng tụ nhiễm sắc được chứng minh là cao hơn đáng kể ở những người hút thuốc so với những người không hút thuốc [17]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chúng tôi không quan sát thấy sự khác biệt về giá trị trung bình của DFI giữa 2 nhóm có/không hút thuốc, nghiên cứu của tác giả Hồ Mạnh Tường cũng không ghi nhận mối liên quan về nam giới hút thuốc lá và mức độ phân mảnh DNA tinh trùng

[16]. Nghiên cứu của chúng tôi không phân tích sâu sự ảnh hưởng của thuốc lá, đối tượng hút thuốc lá có tỉ lệ thấp trong nhóm nghiên cứu, nên chưa xác định rõ được mối liên quan giữa thuốc lá và DNA tinh trùng.

Rượu/bia

Trong nghiên cứu của chúng tôi nhận thấy rằng những người nam giới thường xuyên uống bia (lượng bia uống mức độ vừa phải 3 – 5 lon bia/tuần – tương đương 3 – 5 đơn vị cồn/tuần) có mức độ phân mảnh DNA tinh trùng thấp hơn so với những người không thường xuyên, với $p = 0,03$. Kết quả này ngược lại với sự hiểu biết thông thường về ảnh hưởng rượu/bia đến chất lượng tinh trùng. Trên thực tế, mối liên quan giữa chất lượng tinh dịch và lượng rượu tiêu thụ vẫn còn chưa sáng tỏ, vì các mức tiêu thụ rượu và tần suất uống, loại sản phẩm, thói quen uống khác nhau. Nghiên cứu ảnh hưởng của rượu đến phân mảnh DNA tinh trùng của Komiya và cộng sự cho thấy những người uống rượu/bia thường xuyên (hơn 1 đơn vị cồn/tuần) làm tăng DFI: $49,6 \pm 23,3\%$ so với $33,9 \pm 18,0\%$ ở những người không thường xuyên uống bia/rượu $p = 0,0084$. Tuy nhiên nghiên cứu này có lượng cỡ mẫu ít ($n = 54$) và có bao gồm những người nam giới giãn tĩnh mạch tinh [88]. Nghiên cứu của tác giả Aboulmaouahib và cộng sự trên 108 người nam vô sinh không rõ nguyên nhân với các thông số tinh trùng bình thường, trong đó có 23 trường hợp thường xuyên uống rượu (ít nhất 4 đơn vị cồn/ngày, ít nhất trong 1 năm), đánh giá sự phân mảnh DNA bằng xét nghiệm TUNEL. Kết quả cho thấy uống rượu dẫn đến tăng enzyme chống oxy hóa do tỉ lệ chất oxy hóa không cân bằng trong thời gian dài, điều này gây ra tổn thương DNA tinh trùng, tăng phân mảnh DNA tinh trùng [17]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Ricci E và cộng sự nhận thấy một mối tương quan tích cực giữa lượng và nồng độ tinh dịch, và uống rượu vừa phải (4 – 7 đơn vị cồn/tuần), cho thấy rằng uống rượu vừa phải có thể cải thiện chất lượng tinh dịch [126]. Điều này được tác giả giải thích là do một số hợp chất có trong đồ uống có cồn (flavonoid tự nhiên và polyphenol trong rượu vang đỏ) có chất chống oxy hóa và khả năng chống viêm, được báo cáo có ảnh hưởng tích cực đến chất lượng tinh trùng (đặc biệt cải thiện khả năng di động, nồng độ và khả năng sống của tinh trùng) [55].

4.1.2. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả thụ tinh trong ống nghiệm

4.1.2.1. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả thụ tinh, kết quả phôi phân chia ngày 2

Ảnh hưởng của tổn thương DNA tinh trùng đến chất lượng phôi trong chu kỳ ICSI là vấn đề được nghiên cứu bàn luận nhiều. Với phương pháp ICSI, tinh trùng được chọn dựa trên khả năng di chuyển và hình dạng, khả năng thụ tinh trong tế bào chất của noãn và khả năng vượt qua một số rào cản của chọn lọc tự nhiên [82]. Do đó tinh trùng có thể chứa DNA bị phân mảnh, tác động với quá trình thụ tinh và phát triển phôi sớm, sự phát triển của phôi có thể bị trì hoãn; hình thành phôi chất lượng kém ở nhóm có DFI cao [48], [84]. Noãn bào có khả năng sửa chữa các DNA bị hư hỏng của tinh trùng, mặc dù vậy có một ngưỡng nhất định, vượt quá ngưỡng đó, DNA tinh trùng bị phân mảnh dường như không thể sửa chữa được và có thể ảnh hưởng xấu đến phôi [52], mức phân mảnh DNA tinh trùng cao có thể ảnh hưởng đến sự phát triển phôi sớm cho đến giai đoạn 4 tế bào [141]. Nghiên cứu của tác giả Bazrgar và cộng sự 2014 ghi nhận phân mảnh DNA tinh trùng có thể kích hoạt các con đường sửa chữa bổ sung DNA, và sự phát triển của phôi có thể bị trì hoãn, dẫn đến chất lượng phôi kém [33].

Thụ tinh

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy không có sự khác biệt về tỉ lệ thụ tinh giữa 3 nhóm mức độ phân mảnh DNA tinh trùng ($p = 0,11$), mặc dù ở nhóm $DFI \geq 30\%$ có tỉ lệ thụ tinh thấp nhất trong 3 nhóm ($68,66 \pm 17,69\%$). Các nghiên cứu khác cũng ghi nhận tỉ lệ thụ tinh thấp ở nhóm DFI cao, tuy nhiên chưa có sự khác biệt rõ rệt. Kết quả của tác giả Borges và cộng sự cho thấy tỉ lệ thụ tinh thấp hơn ở nhóm $DFI \geq 30\%$ so với nhóm $DFI < 30\%$, ($85,28 \pm 1,06\%$ so với $90,68\% \pm 3,61\%$, $p = 0,226$) [35]. Nghiên cứu của tác giả Oleszczuk K (2016) không ghi nhận sự ảnh hưởng của DFI với kết quả thụ tinh ở kỹ thuật ICSI mặc dù kết quả phân tích cho thấy tỉ lệ thụ tinh ở nhóm DFI 0 - 10 % có giá trị cao nhất, và tỉ lệ này giảm dần ở các nhóm DFI $DFI > 10 - 20\%$, $DFI > 20-30\%$ và $DFI > 30\%$ ($p > 0,05$) [110].

Nghiên cứu của tác giả Xue LT (2016) phân tích tương quan cho thấy tỉ lệ phân mảnh DNA tinh trùng có tương quan nghịch với tỉ lệ thụ tinh trong các chu kỳ

ICSI ($r = -0,433$, $p < 0,001$) nhưng không có mối liên quan nào trong các chu kỳ IVF. Xác định DFI 22,3% là giá trị giới hạn và nhận thấy rằng tỉ lệ thụ tinh theo ICSI thấp hơn đáng kể ở nam giới có DFI $> 22,3\%$ so với DFI $\leq 22,3\%$ [162]. Kết quả của chúng tôi cũng ghi nhận có mối tương quan nghịch yếu giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và tỉ lệ thụ tinh ($r = -0,20$, $p = 0,002$) (Bảng 3.14). Nghiên cứu của tác giả Nguyễn Minh Tài Lộc cũng ghi nhận mối tương quan nghịch với $r = -0,28$; $p = 0,02$ [4], nhưng với kết quả của tác giả Nguyễn Thị Quỳnh Tiên cũng áp dụng kỹ thuật phân tán chất nhuộm sắc tinh trùng lại không xác định được mối tương quan này [14]. Ngoài ra, chúng tôi có quan sát thấy giá trị DFI ở nhóm tạo tỉ lệ thụ tinh $< 75\%$, cao hơn so với nhóm $\geq 75\%$, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,05$. (Bảng 3.17).

Ảnh hưởng của sự phân mảnh DNA tinh trùng sẽ tác động ở giai đoạn sớm trong quá trình thụ tinh, khi quá trình này phụ thuộc chủ yếu vào chất lượng của hai giao tử. Chính vì điều này, các bệnh nhân có mức độ phân mảnh DNA tinh trùng cao khó có thể thụ tinh và mang thai tự nhiên. Việc lựa chọn tinh trùng trong kỹ thuật ICSI dựa vào khả năng di chuyển, hình dạng dưới kính hiển vi đảo ngược có thể thu nhận phải tinh trùng có phân mảnh DNA dẫn đến ảnh hưởng đến khả năng thụ tinh. Bên cạnh đó, kết hợp với các đặc điểm noãn của người vợ thì phân mảnh DNA tinh trùng có ảnh hưởng đến kết quả thụ tinh.

Phôi phân chia ngày 2

Phân mảnh DNA tinh trùng cũng được chứng minh có tác động đến phôi giai đoạn phân chia trong một số nghiên cứu. Nghiên cứu của Borges và cộng sự (2019) cho thấy kết quả ICSI của bệnh nhân có DFI $\geq 30\%$ có tốc độ phân chia bình thường và tỉ lệ phôi tốt vào ngày thứ 3 giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm DFI $< 30\%$ [35]. Tính toàn vẹn DNA tinh trùng đóng một phần quan trọng trong quá trình thụ tinh và trong quá trình phát triển phôi sớm, do đó ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng thụ thai tự nhiên, ngăn cản sự phát triển của phôi sau trạng thái phân chia lần thứ hai [129]. Đánh giá phôi bằng hệ thống theo dõi phôi liên tục, tác giả Wdowiak (2015) kết luận phân mảnh DNA tinh trùng ảnh hưởng đến tỉ lệ hình

thành phôi nang; DFI tương quan thuận với một số thông số động học như thời gian hoàn thành phân chia 2, 3, 4, 5... phôi bào lần lượt là ($r = 0,650$; $p < 0,001$), ($r = 0,544$; $p < 0,001$), ($r = 0,677$; $p < 0,001$), ($r = 0,171$; $p = 0,029$) và thời gian hình thành khoang phôi nang ($r = 0,537$; $p < 0,001$) [157]. Nghiên cứu của tác giả Esbert và cộng sự (2018) có mối tương quan giữa DFI với sự phân chia của phôi. Cụ thể là thời gian xuất hiện thể cực thứ 2, xuất hiện tiền nhân, phân chia hoàn toàn thành 2, 3, 4, 5, ... phôi bào và thời gian hình thành phôi dâu đều chậm hơn ở nhóm tinh trùng có DFI cao [48].

Kết quả phân tích chúng tôi chưa ghi nhận sự ảnh hưởng của phân mảnh DNA đến kết quả chung của phôi giai đoạn phân chia ngày 2. Tỷ lệ tạo phôi hữu dụng ngày 2/noãn MII, tỷ lệ tạo phôi hữu dụng ngày 2/hợp tử ở nhóm $DFI \geq 30\%$ đều thấp nhất trong 3 nhóm, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê lần lượt với $p = 0,77$ và $p = 0,19$ (Bảng 3.13). Tuy nhiên, có quan sát thấy mối tương quan nghịch yếu giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và tỷ lệ tạo phôi hữu dụng ngày 2/noãn MII ($r = -0,16$, $p = 0,01$) (Bảng 3.14). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hình thái phôi truyền thống, hướng nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của phân mảnh DNA đến chất lượng phôi thông qua hệ thống theo dõi phôi liên tục sẽ được chúng tôi tiếp tục nghiên cứu trong tương lai.

Ngưỡng $DFI < 30,7\%$ để dự đoán tỷ lệ hình thành phôi phân chia chất lượng tốt ngày 3 $> 70\%$ được xác định trong nghiên cứu của Kim SM và cộng sự, cho thấy ảnh hưởng của tinh trùng đến chất lượng phôi trong chu kỳ IVF ngay cả ở phụ nữ đáp ứng kích thích buồng trứng bình thường [84]. Với kết quả phân tích được, chúng tôi quan sát thấy giá trị DFI ở nhóm tạo tỷ lệ tạo phôi hữu dụng ngày 2/MII $< 50\%$, cao hơn so với nhóm $\geq 50\%$, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($26,33 \pm 15,40$ so với $22,50 \pm 12,93$, $p = 0,05$) (Bảng 3.17).

Kết quả nghiên cứu này cho thấy phân mảnh DNA tinh trùng không ảnh hưởng đến tốc độ phân chia phôi, tuy nhiên phân mảnh DNA ảnh hưởng đến sự xuất hiện mảnh vỡ bào tương phôi bào. Ở nhóm $DFI \geq 30\%$, tỷ lệ những phôi không có hoặc có mảnh vỡ bào tương phôi bào mức độ thấp là thấp nhất trong 3 nhóm,

hình thành nhiều phôi có mảnh vỡ bào tương nhiều nhất trong 3 nhóm (Bảng 3.13). Bên cạnh đó, quan sát thấy mối tương quan nghịch giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và tỉ lệ mảnh vỡ bào tương $< 10\%$ ($r = -0,17$, $p = 0,008$), và tương quan thuận với tỉ lệ mảnh vỡ bào tương $> 25\%$ ($r = 0,18$, $p = 0,006$). Những yếu tố tác động đến sự phân mảnh phôi bào bao gồm: (i) phân mảnh có thể bắt nguồn từ tế bào noãn: các khiếm khuyết vốn có trong noãn thường ảnh hưởng đến chất lượng phôi và khả năng phát triển của nó; (ii) do quy trình kích thích buồng trứng, chất lượng noãn thu được có liên quan trực tiếp đến phác đồ kích thích buồng trứng; (iii) môi trường nuôi cấy của phôi rất quan trọng đối với sự phát triển của phôi; (iv) cuối cùng từ yếu tố tinh trùng [85]. Năm 2017, nghiên cứu của Alvarez Sedo C và cộng sự ghi nhận mẫu tinh trùng phân mảnh DNA cao có liên quan đến mức độ xuất hiện mảnh vỡ bào tương cao hơn trong phôi bào (9,1% so với 15,9%, $p < 0,05$). Với phương pháp phát hiện tổn thương tế bào và quá trình chết theo chương trình ở phôi bằng hóa mô miễn dịch, cho thấy những phôi bào được hình thành từ mẫu tinh trùng có mức độ phân mảnh DNA cao đã bị kích hoạt con đường chết theo chương trình ở mức cao hơn so với các mẫu có DFI thấp (16,4% so với 21,9%) ($p < 0,05$), phân mảnh DNA tinh trùng có tương quan nghịch với tỉ lệ phôi nang và tỉ lệ có thai ngay cả ở noãn chất lượng tốt [29].

Trong nghiên cứu chúng tôi đánh giá về ảnh hưởng phân mảnh DNA tinh trùng đến mảnh vỡ bào tương phôi bào, các báo cáo trong nước không đánh giá tác động này nên chúng tôi không so sánh được với các nghiên cứu thực hiện tại Việt Nam. Với các bằng chứng từ những nghiên cứu nước ngoài, cũng như kết quả từ nghiên cứu này có thể thấy rằng phân mảnh DNA tinh trùng có ảnh hưởng đến chất lượng phôi giai đoạn phân chia.

4.1.2.2. Mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả tạo phôi nang ngày 5

Với nghiên cứu của chúng tôi, khi phân tích tỉ lệ phôi nang/hợp tử, không ghi nhận được sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa ba nhóm DFI, và không quan sát thấy mối tương quan; tuy nhiên khi đánh giá tỉ lệ phôi nang/noãn MII ghi nhận mối tương quan nghịch yếu với $r = -0,15$, $p = 0,02$ (Bảng 3.16). Ngoài

ra, kết quả nhóm tỉ lệ tạo phôi nang /MII < 50%, có mức độ phân mảnh DNA tinh trùng cao hơn so với nhóm $\geq 50\%$ sự khác biệt có xu hướng có ý nghĩa thống kê ($25,12 \pm 14,62$ so với $21,71 \pm 12,43$, $p = 0,06$). Như vậy với kết quả này, phân mảnh DNA tinh trùng không ảnh hưởng đến khả năng hình thành phôi nang, kết quả của chúng tôi cũng tương đồng so với một số nghiên cứu khác: Trong nghiên cứu của tác giả Green KA và cộng sự (2020), không quan sát thấy sự khác biệt về tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi nang hữu dụng/hợp tử giữa hai nhóm DFI $\leq 15\%$ và DFI $> 15\%$ ($49,5\%$ so với $48,8\%$, $p = 0,865$), bên cạnh đó cũng không có sự khác biệt về phôi di bội ($55,7\%$ so với $52,1\%$, $p = 0,35$) [66]. Phân tích tổng hợp của tác giả Adiga PK và cộng sự (2021) không chứng minh được bất kỳ sự khác biệt đáng kể nào về tỉ lệ tạo phôi nang giữa các nhóm DFI cao và DFI thấp khi thực hiện kỹ thuật ICSI, phân mảnh DNA tinh trùng cao có thể không ảnh hưởng xấu đến sự hình thành phôi nang. Đối với các chu kỳ thực hiện IVF cổ điển đã cho thấy sự gia tăng tỉ lệ phôi nang, tỉ lệ xuất hiện cao hơn trong kỹ thuật IVF cổ điển ở nhóm DFI cao, điều này có thể là do trong quá trình IVF chỉ những tinh trùng ít bị tổn thương DNA hơn sẽ được chọn lọc tự nhiên, có năng lực và khả năng thụ tinh và phân chia tốt hơn để hình thành phôi bào. Do đó nhóm DFI thấp có thể áp dụng phối hợp phương pháp IVF + ICSI [18].

Nghiên cứu của tác giả Alvarez Sedo C và cộng sự, phân tích được mối tương quan nghịch ($r = - 0,5$) giữa mức độ phân mảnh DNA và tỉ lệ tạo phôi nang. Tỉ lệ tạo phôi nang ở DFI < 15% và DFI $\geq 15\%$, lần lượt là $59,2 \pm 22\%$ so với $37,5\% \pm 28$, $p = 0,003$ [29], kết quả nghiên cứu có mối tương quan rõ ràng hơn của chúng tôi bởi nghiên cứu được thực hiện ở chu kỳ hiến noãn từ những phụ nữ trẻ, nhóm đối tượng này thực hiện chu kỳ xin noãn chúng tôi không đưa vào nghiên cứu.

Bảng 4.2. Tổng hợp kết quả một số nghiên cứu đánh giá mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng kết quả thụ tinh trong ống nghiệm

Tác giả (năm)	Kết quả chính
Oleszczuk K (2016) [110]	Khi DFI > 20% các kết quả về phôi và tỉ lệ sinh sống thấp ở những chu kỳ IVF. ICSI cải thiện kết quả so với IVF khi DFI > 20%
Xue L (2016) [162]	DFI tương quan nghịch với tỉ lệ thụ tinh trong ICSI nhưng không ở chu kỳ IVF. Không có liên quan giữa DFI và tỉ lệ phôi phân chia hoặc chất lượng trong chu kỳ IVF hoặc ICSI, DFI > 22,3% chỉ số tiên lượng giảm tỉ lệ thụ tinh sau ICSI.
Alvarez Sedo C (2017) [29]	DFI > 15% tương quan nghịch với tỉ lệ phôi nang, và tỉ lệ thai, không ảnh hưởng đến tỉ lệ thụ tinh. Các phôi bào biểu hiện chết theo chương trình ở nhóm DFI cao.
Esbert M (2018) [48]	DFI cao dẫn đến chậm thời gian phân chia phôi. Không ảnh hưởng đến tỉ lệ thụ tinh, làm tổ, có thai và sảy thai
Borges E (2019) [35]	Không có sự khác biệt về tỉ lệ thụ tinh Tỉ lệ phôi có tốc độ phôi phân chia bình thường, phôi tốt ngày 3, phôi tốt ngày 5, tỉ lệ làm tổ đều thấp hơn có ý nghĩa ở nhóm DFI cao ($\geq 30\%$) so với DFI thấp ($<30\%$)
Green KA (2020) [66]	Tỉ lệ phôi nang, dị bội, thụ tinh và sảy thai không khác biệt giữa DFI $\geq 15\%$ so với DFI $< 15\%$
Nguyễn Minh Tài Lộc (2016) [4]	Tỉ lệ thụ tinh ở DFI > 15% thấp hơn có ý nghĩa thống kê so DFI $\leq 15\%$ (84% so với 91% $p = 0,03$). DFI tương quan nghịch với tỉ lệ thụ tinh ($r = -0,28$; $p = 0,02$). Không có tương quan giữa DFI và chất lượng phôi. DFI không ảnh hưởng đến kết quả thai

Tác giả (năm)	Kết quả chính
Nguyễn Thị Quỳnh Tiên (2018) [14]	Không có mối tương quan giữa DFI và kết quả ICSI: tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi ngày 3 và tỉ lệ phôi hữu dụng ($p > 0,05$). Kết quả thai lâm sàng ở ba nhóm DFI ($< 15\%$, $15-30\%$, $> 30\%$) không khác biệt
Kết quả của nghiên cứu này	Tỉ lệ thụ tinh ở $DFI \geq 30\%$ thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với $DFI < 30\%$ DFI tương quan nghịch với tỉ lệ thụ tinh ($r = -0,20$, $p = 0,00$), tỉ lệ tạo phôi hữu dụng ngày 2/noãn MII ($r = -0,16$, $p = 0,01$) DFI tương quan nghịch giữa và tỉ lệ phôi nang / noãn MII ($r = -0,15$, $p = 0,02$) Kết quả thai lâm sàng ở ba nhóm DFI ($< 15\%$, $15 - < 30\%$, $\geq 30\%$) không khác biệt.

4.1.3. Đánh giá mối liên quan phân mảnh DNA tinh trùng đến kết quả chuyển phôi

Chuyển phôi nang hiện nay phổ biến tại các trung tâm HTSS vì một số lợi ích như cải thiện tỉ lệ làm tổ, tỉ lệ sinh sống, giảm số lượng phôi chuyển thông qua việc lựa chọn phôi tốt hơn sau khi kích hoạt bộ gene phôi và niêm mạc tử cung đồng bộ hơn so với chuyển phôi giai đoạn phân chia [57]. Hiện nay, tại trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế thực hiện quy trình nuôi cấy và chuyển phôi nang cho tất cả các trường hợp.

Kết quả của chúng tôi cho thấy không có sự ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng tới kết quả làm tổ, có túi thai, và thai tiến triển, mặc dù vậy quan sát thấy tỉ lệ các kết quả lâm sàng ở nhóm $DFI \geq 30\%$ đều thấp nhất trong ba nhóm DFI. Hai nghiên cứu trước ở Việt Nam thực hiện phân tích ở kết quả chuyển phôi giai đoạn phân chia ngày 3, cũng không ghi nhận mối liên quan giữa DFI và kết quả lâm sàng [4], [14]. Ảnh hưởng của DFI đối với kết quả lâm sàng sau chuyển phôi hiện nay chưa được thể hiện rõ. Tác giả Cissen và cộng sự (2016) đã phân tích 30 nghiên cứu đánh giá giá trị của phân mảnh DNA tinh trùng trong việc dự đoán khả năng mang thai ở IVF hoặc ICSI. Các tác giả kết luận rằng các phương pháp xét nghiệm phân

mảnh DNA tinh trùng hiện tại có khả năng dự đoán khả năng có thai rất hạn chế [41]. Một phân tích cộng gộp từ 13 nghiên cứu của tác giả Collins, J.A và cộng sự (2008), Tính toán vẹn DNA tinh trùng có liên quan đáng kể đến việc mang thai sau IVF và ICSI với OR chuẩn đoán là 1,44, khoảng tin cậy 95% = 1,03–2,03; $p = 0,04$, nhưng tỉ lệ khả dĩ (likelihood ratios (LR) không dự đoán được kết cục thai kỳ (LR dương tính = 1,23; KTC 95%, 0,98, 1,54; LR âm tính = 0,81; 95 % KTC, 0,67, 0,98), do đó nhóm nghiên cứu kết luận phân mảnh DNA tinh trùng không ảnh hưởng đến kết quả lâm sàng [42]. Báo cáo của tác giả Green KA và cộng sự năm 2020 chứng minh không có tác động của phân mảnh DNA tinh trùng đối với tỉ lệ làm tổ, sảy thai hoặc thai diễn tiến. Kết quả lâm sàng tương tự nhau giữa các nhóm DFI thấp và cao, bao gồm tỉ lệ làm tổ (68,8% so với 79,8%), tỉ lệ có thai đang diễn ra (65,9 so với 72,6%), và tỉ lệ sảy thai (4,2 so với 8,8%) [66].

Các nghiên cứu phân tích vai trò dự đoán của phân mảnh DNA tinh trùng đối với kết quả sau chuyển phôi báo cáo các kết quả trái ngược nhau [41], [66], [142], [172]. Sự mâu thuẫn này có thể là từ một số yếu tố, như phương pháp nghiên cứu, tính không đồng nhất về cỡ mẫu, sự khác biệt trong phương pháp xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng và tình trạng sinh sản của người vợ. Nhiều phân tích tổng hợp được thực hiện để đánh giá của phân mảnh DNA tinh trùng đối với kết quả lâm sàng sau chuyển phôi về tỉ lệ mang thai, sảy thai và sinh sống. Ba phân tích cộng gộp báo cáo rằng phân mảnh DNA tinh trùng cao có liên quan đến tỉ lệ mang thai thấp hơn khi thực hiện IVF với OR dao động trong khoảng 0,68 đến 1,7. Đối với kỹ thuật ICSI, tác giả Simon và cộng sự báo cáo tỉ lệ mang thai thấp hơn đáng kể với phân mảnh DNA tinh trùng cao [142], trong khi các phân tích cộng gộp còn lại không tìm thấy mối liên quan đáng kể [170], [168]. Tác giả Oleszczuk và cộng sự năm 2016 đánh giá kết quả sau chuyển phôi cho thấy mức DFI từ 20% trở lên có liên quan đến việc giảm đáng kể tỉ lệ sinh sống khi thực hiện IVF. Hơn nữa, tỉ lệ sảy thai tăng lên đối với những người có DFI từ 40% trở lên [110].

Kết quả sau chuyển phôi còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố của người phụ nữ về nội tiết, yếu tố niêm mạc tử cung,... Tác giả Jin và cộng sự báo cáo rằng khi DFI > 27,3%, nguy cơ sảy thai sớm tăng lên đáng kể đối với những người có dự trữ buồng

trứng giảm và bình thường. Điều này cho thấy rằng xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng đặc biệt hữu ích cho các cặp vợ chồng khi phụ nữ có dự trữ buồng trứng giảm [79]. Tương tự như trong nghiên cứu của Liang và cộng sự cho thấy khi phụ nữ trên 30 tuổi, kết hợp người chồng có DFI > 30% có tỉ lệ mang thai lâm sàng thấp hơn so với DFI ≤ 30% [93]. Như vậy giá trị DFI khi kết hợp với yếu tố của người vợ trong một số trường hợp cụ thể có thể có ảnh hưởng rõ ràng hơn đến kết quả lâm sàng sau chuyển phôi. Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng đến chất lượng phôi thụ tinh trong ống nghiệm, chúng tôi tiến hành phân tích thêm về mối liên quan giữa DFI và kết quả lâm sàng, tuy nhiên kết quả chưa thể hiện rõ mối liên quan này. Vấn đề này sẽ là hướng nghiên cứu mới theo từng nhóm bệnh nhân cụ thể khi kết hợp phân tích ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng và yếu tố người vợ đến kết quả lâm sàng sau chuyển phôi.

4.2. TÁC ĐỘNG CỦA KỸ THUẬT CHỌN LỌC TINH TRÙNG SINH LÝ ĐẾN KẾT QUẢ TẠO PHÔI THỤ TINH TRONG ỐNG NGHIỆM.

4.2.1. Khả năng gắn kết HBA và mối liên quan với chỉ số tinh trùng

Đánh giá mối liên quan giữa các giá trị thông số tinh trùng và khả năng gắn kết acid hyaluronic của tinh trùng, kết quả của nghiên cứu chưa ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, cũng như không thấy có mối tương quan giữa các giá trị. Một số nghiên cứu trước đây báo cáo có mối tương quan rõ rệt, nghiên cứu của Nasr-Esfahani MH và cộng sự ghi nhận mối tương quan thuận có ý nghĩa giữa khả năng di chuyển của tinh trùng với HBA ($r = 0.47$, $p = 0.000$), và tương quan nghịch với phần trăm hình dạng bất thường ($r = -0.431$, $p = 0.001$) [105]. Tác giả Ye H và cộng sự chỉ ra khả năng gắn kết acid hyaluronic của tinh trùng tương quan với tổng số, di động tiến tới và hình dạng bình thường, gợi ý rằng gắn kết acid hyaluronic có thể phản ánh chất lượng tinh dịch [165]. Có sự khác nhau về kết quả nghiên cứu có thể do chất lượng và số lượng mẫu được đưa vào nghiên cứu khác nhau, như trong nghiên cứu của Nasr-Esfahani, mặc dù cùng phương pháp nghiên cứu, nhưng cỡ mẫu của chúng tôi nhiều gấp 4,5 [105]. Đối với nghiên cứu của Ye và cộng sự thì chất lượng mẫu tinh dịch giá trị các thông số cao hơn nhiều so với mẫu của chúng tôi [165]. Một nghiên cứu gần đây của tác giả Ghaleno LR và cộng sự, ghi nhận HBA tương quan thuận với di động tiến tới (hệ số $\beta = 0.449$, $p < 0.05$) và hình dạng

bình thường (hệ số $\beta = 2,722$, $p < 0,01$) [63], nghiên cứu này có số lượng mẫu tương đồng với chúng tôi, tuy nhiên đánh giá HBA trên mẫu tinh dịch tươi, còn của chúng tôi là đánh giá ở mẫu sau lọc rửa, đồng thời 2 kỹ thuật đánh giá khác nhau, có thể đã dẫn đến kết quả chênh lệch.

Tinh trùng để sử dụng trong các kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm là mẫu đã được xử lý (lọc rửa). Kỹ thuật lọc rửa tinh trùng với mục đích loại bỏ hết phần dịch tinh, tinh trùng chết và các tế bào lạ. Kết quả sau khi lọc rửa thu được 1 thể tích nhỏ dịch môi trường tinh trùng được cô đặc (0,3mL), là những tinh trùng sống, được hoạt hóa, có khả năng di động tốt (tương đồng với tinh trùng khi di chuyển trong đường sinh dục nữ đến gặp noãn). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá HBA là ở mẫu tinh trùng sau khi lọc rửa, kết quả ghi nhận được mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa HBA và di động tiến tới và mật độ tinh trùng sau lọc rửa (Bảng 3.23), đồng thời mối tương quan thuận giữa độ di động sau lọc rửa, mật độ sau lọc rửa và HBA (Bảng 3.24). Như vậy, có thể thông qua mật độ, khả năng di động của tinh trùng sau lọc rửa dự đoán khả năng gắn kết acid hyaluronic của tinh trùng, từ đó có thể áp dụng kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm phù hợp là ICSI, IVF, PICSI. Tác giả Mokanszki và cộng sự (2014), đánh giá hiệu quả của PICSI dựa trên ngưỡng HBA $\leq 60\%$ và $> 60\%$. Kết quả cho thấy tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ làm tổ cao hơn đáng kể ở nhóm có chọn lọc tinh trùng gắn kết acid hyaluronic so với nhóm thực hiện ICSI thường quy [103]. Các tác giả đề nghị HBA có thể được sử dụng để tiên lượng khả năng thành công của kỹ thuật HTSS. Nếu HBA $\leq 60\%$, nên được thực hiện ICSI, HBA $\geq 80\%$ có thể tiến hành bơm tinh trùng vào buồng tử cung, và trong khoảng 60 - 80% có thể tiến hành IVF[74], [166].

Các nghiên cứu trước đây cho thấy kỹ thuật gắn kết acid hyaluronic có khả năng chọn lọc những tinh trùng không bị tổn thương DNA [74], [105], có mối tương quan nghịch giữa tỉ lệ gắn kết acid hyaluronic với thiếu hụt protamine, phân mảnh DNA, và hình dạng bất thường của tinh trùng. Trong nghiên cứu của Parmegiani và cộng sự năm 2010 báo cáo cho thấy những tinh trùng gắn acid hyaluronic có mức độ phân mảnh DNA thấp hơn đáng kể so với những tinh trùng sau lọc rửa và tinh trùng thu thập trong polyvinylpyrrolidone - dung dịch làm chậm di chuyển tinh trùng thực hiện trong ICSI thường quy, cũng như là tinh trùng từ

mẫu tinh dịch tươi, lần lượt là 5,3%, 11,0%, và 16,5% ($p < 0,001$) [115]. Đánh giá về mối liên quan giữa khả năng gắn kết acid hyaluronic với mức độ phân mảnh DNA tinh trùng, kết quả của chúng tôi không tìm thấy mối tương quan nào. Trong nghiên cứu của tác giả Ghaleno và cộng sự cũng báo cáo cho thấy không có mối tương quan giữa HBA và mức độ phân mảnh DNA tinh trùng ($r = -0,102$, $p = 0,319$), mặc dù HBA có mối tương quan nghịch với mức độ ổn định DNA tinh trùng $r = -0,319$, $p < 0,01$ [63]. Tuy nhiên, cũng phương pháp nghiên cứu như của chúng tôi, nhưng kết quả của nhóm tác giả Nasr-Esfahani và cộng sự ghi nhận có mối tương quan nghịch giữa HBA và mức độ phân mảnh DNA tinh trùng ($r = -0,29$, $p = 0,035$) [105]. Tác giả West R và cộng sự đánh giá các xét nghiệm về gắn kết acid hyaluronic và phân mảnh DNA tinh trùng cho thấy chỉ số gắn kết HBA tương quan nghịch với DFI khi nhuộm Acridine orange ($r = -0,211$; $p < 0,001$), ở kỹ thuật Comet ($r = -0,127$; $p < 0,001$) và ở kỹ thuật TUNEL ($r = -0,214$; $p < 0,001$) và tương quan thuận với DFI ở kỹ thuật khảo sát sự phân tán chất nhuộm sắc ($r = 0,255$; $p < 0,001$) [158]. Kirkman-Brown và cộng sự tìm thấy mối tương quan giữa khả năng gắn kết acid hyaluronic với khả năng di chuyển của tinh trùng, nồng độ, sự phân mảnh DNA [87]. Như vậy, thực hiện khảo sát khả năng gắn kết HBA của tinh trùng để phản ánh được mức độ phân mảnh DNA tinh trùng còn chưa rõ ràng, tuy nhiên những tinh trùng có gắn kết với acid hyaluronic được chọn lọc để tiêm vào bào tương noãn có thể là những tinh trùng không bị phân mảnh DNA, từ đó nâng cao kết quả của thụ tinh trong ống nghiệm.

4.2.2. Kết quả thụ tinh trong ống nghiệm của kỹ thuật PICSI và ICSI

4.2.2.1. Kết quả nuôi cấy phôi của kỹ thuật PICSI và ICSI

Ứng dụng acid hyaluronic trong chọn lọc tinh trùng sinh lý đã được chứng minh hiệu quả qua nhiều nghiên cứu trước đây [83], [103], [115]. Nghiên cứu của tác giả Parmegiani L và cộng sự (2010) chứng minh rằng tỉ lệ hình thành phôi tổng thể ở nhóm PICSI cao hơn có ý nghĩa ($95,0 \pm 0,8$) so với nhóm ICSI ($84,0 \pm 1,1$), $p < 0,001$. Tỉ lệ phôi chất lượng tốt trong nhóm PICSI cao hơn đáng kể so với nhóm ICSI (35,8% so với 24,1%, $p = 0,046$). Ngoài ra, mặc dù sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, nhưng các xu hướng về tỉ lệ thụ tinh, làm tổ và mang thai tốt hơn đã

được thấy ở nhóm PICSI [115]. Nghiên cứu Novoselsky - Persky và cộng sự công bố năm 2021 với kích thước mẫu nhỏ cũng đánh giá chu kỳ noãn chí em ở những trường hợp thất bại thụ tinh trước đó, phôi kém phát triển, làm tổ thất bại hoặc sảy thai 45 chu kỳ, trong đó 257 noãn thực hiện PICSI và 294 với ICSI, PICSI so với ICSI về tỉ lệ thụ tinh (71% so với 83%) và tỉ lệ phôi đủ điều kiện chuyển (38% so với 51%) đều cao hơn đáng kể ở PICSI (lần lượt tương ứng $p = 0,008$ và $p = 0,01$) [109]. Mặt khác, đánh giá điểm HBA của tinh trùng trong tinh dịch có ý nghĩa để chọn thực hiện kỹ thuật PICSI hoặc ICSI trong các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm. Kỹ thuật PICSI có nhiều hứa hẹn và cải thiện đáng kể kết quả lâm sàng ở những bệnh nhân có điểm HBA thấp [103].

Qua kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy việc lựa chọn tinh trùng trong PICSI không có nhiều lợi ích hơn về khả năng thụ tinh và tỉ lệ tạo phôi phân chia ngày 2 so với kỹ thuật ICSI. Tỉ lệ hình thành phôi nang ngày 5 ở nhóm PICSI cao hơn nhóm ICSI nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê: 61,99% so với 58,10%, $p = 0,26$. Tuy nhiên, khi phân tích riêng rẽ, nhận thấy nhóm ICSI có khả năng hình thành được nhiều phôi nang chất lượng tốt nhiều so với nhóm PICSI, nhưng nhóm PICSI thu được nhiều phôi nang độ 2 và độ 3 hơn so với ICSI (Bảng 3.24). Trong nghiên cứu của Majumdar G và Majumdar A (2013) cũng ghi nhận không có sự khác biệt về tỉ lệ thụ tinh, số lượng phôi tốt giữa nhóm ICSI và PICSI (lần lượt là 65,7% so với 64,7%, $p = 0,724$; 45,8% so với 43,6%, $p = 0,460$) [97]. Hai nghiên cứu trước đây sử dụng môi trường chứa acid hyaluronic để chọn lọc tinh trùng, đánh giá chia đôi số noãn với số lượng ít cho kết quả không cải thiện rõ tỉ lệ thụ tinh và tạo phôi so với ICSI: Choe S.A. và cộng sự (2012) báo cáo tỉ lệ thụ tinh (75,7% so với 83,0%, $p > 0,05$), tỉ lệ phôi phân chia ngày 2 (72,9% so với 83,0% $p > 0,05$), tỉ lệ phôi nang ngày 5/6 tương tự nhau ở cả nhóm. Tuy nhiên, tỉ lệ phôi phân chia ngày 3 thấp hơn đáng kể ở nhóm PICSI (56,0% so với 69,6%, $p = 0,038$) [40]. Nghiên cứu của nhóm tác giả Liu Y và cộng sự (2017), PICSI có tỉ lệ thụ tinh bất thường thấp hơn đáng kể (1,9% so với 9,7%, $p = 0,017$) và xu hướng tăng tỉ lệ thụ tinh bình thường (73,8% so với 62,1%, $p = 0,073$) với thời gian thực hiện kỹ thuật kéo dài hơn (2,5 so với 2,1 phút, $p = 0,001$). Không có sự khác biệt giữa

PICSI và ICSI được quan sát thấy ở tỉ lệ phôi tốt (50% so với 53,1%, $p = 0,712$) [94]. Dữ liệu báo cáo của tác giả Kirkman-Brown cũng cho thấy việc lựa chọn PICSI không mang lại lợi thế trong quá trình phát triển phôi sớm, kết quả thụ tinh ở PICSI (66,6%) thấp hơn so với ICSI (69,0%), tuy nhiên không ảnh hưởng đến kết quả tổng thể vì không ảnh hưởng đến số lượng phôi chuyển được hình thành [87]. Nghiên cứu tại Việt Nam của tác giả Lê Thụy Hồng Khả và cộng sự năm 2012 sử dụng môi trường chứa acid hyaluronic cũng không thấy sự khác biệt về tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ phôi phân chia ngày 2 giữa hai nhóm PICSI và ICSI [3].

Có một số nguyên nhân giải thích cho kết quả chưa thực sự hiệu quả của kỹ thuật chọn lọc tinh trùng, đó là kỹ thuật thu nhận tinh trùng lên khối mặt đĩa PICSI tại vi điểm acid hyaluronic là nâng cơ học tinh trùng đánh khối đĩa PICSI, dẫn đến có nguy cơ làm tổn thương màng bào tương phía đầu của tinh trùng [87] từ đó có thể ảnh hưởng đến kết quả phôi. Mặt khác, trong quá trình chọn lọc tinh trùng trong đĩa PICSI và tiêm tinh trùng vào bào tương noãn, quy trình này mất nhiều thời gian hơn so với ICSI thông thường. Điều này có thể ảnh hưởng đến chất lượng của noãn khi để lâu ở bên ngoài nên sẽ làm giảm chất lượng của phôi. Đặc điểm của thời gian dài hơn bình thường cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Liu và cộng sự, thời gian thực hiện tiêm tinh trùng vào bào tương noãn kéo dài hơn được quan sát thấy ở nhóm môi trường chứa acid hyaluronic so với nhóm ICSI. Các tác giả đưa ra giải pháp là hạn chế số lượng noãn thao tác vào mỗi đĩa, do đó hạn chế thời gian noãn ở bên ngoài tủ ấm [94].

4.2.2.2. So sánh kết quả nuôi cấy phôi của kỹ thuật PICSI và ICSI ở các nhóm đặc điểm tinh trùng

Chúng tôi phân tích hiệu quả của kỹ thuật PICSI trong các nhóm đặc điểm tinh trùng khác nhau. Phân chia các nhóm hình dạng tinh trùng bình thường và dị dạng, nhưng không quan sát thấy ưu điểm nổi bật của PICSI trong phân nhóm tinh trùng dị dạng, kết quả này cũng tương tự như với nhóm tinh trùng có hình dạng bình thường. Đối với sự phát triển phôi ngày 2 của cả 2 kỹ thuật là tương đương nhau, kỹ thuật ICSI có ưu điểm hơn trong hình thành phôi nang tốt, còn kỹ thuật PICSI thì hình thành được nhiều phôi nang độ 2 hơn (Bảng 3.26). Các kết quả được ghi nhận

tương tự ở các nhóm tinh trùng về đặc điểm di động, phân mảnh DNA, khả năng gắn kết acid hyaluronic (Bảng 3.27, 3.28, 3.29)

Hiệu quả của lựa chọn tinh trùng bình thường với acid hyaluronic cũng được báo cáo trong nghiên cứu của Prinosilova: sử dụng acid hyaluronic chọn lọc được tinh trùng trưởng thành, khả năng thụ tinh của tinh trùng khi chọn lọc bằng acid hyaluronic cao tương đương với kỹ thuật lựa chọn tinh trùng bằng thử nghiệm gắn màng trong suốt. Ngoài ra, tỷ lệ tinh trùng có hình dạng bình thường ở nhóm gắn kết HA cao hơn so với mẫu tinh dịch ban đầu [121]. Erberelli RF và cộng sự (2017) đã nghiên cứu hiệu quả của PICSİ và ICSI ở các trường hợp vô sinh nam từ trung bình đến nặng, những chu kỳ sử dụng kỹ thuật PICSİ có cơ hội thụ thai cao hơn đáng kể (5 lần) so với những người chỉ chọn tinh trùng bằng đánh giá hình thái học. Như vậy, trường hợp có yếu tố vô sinh nam với bất thường hình dạng tinh trùng có thể được hưởng lợi từ kỹ thuật PICSİ hơn các yếu tố khác liên quan đến các nhóm đặc điểm tinh trùng khác nhau, đề xuất sử dụng PICSİ cho tất cả các trường hợp có hình thái tinh trùng bất thường [47]. Nghiên cứu của Kim và cộng sự cũng ủng hộ ưu điểm của PICSİ, khi sử dụng môi trường có chứa hyaluronic trong các trường hợp dị dạng tinh trùng nặng ($\leq 1\%$ hình thái bình thường của tinh trùng). Tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ phôi chất lượng tốt ở nhóm PICSİ cao hơn đáng kể so với nhóm ICSI (82,7% so với 71,7%, $p < 0,001$ và 52,8% so với 34,0%, $p < 0,001$). Tỷ lệ phôi phân chia ngày 3 ở nhóm PICSİ thấp hơn so với nhóm ICSI (96,2% so với 98,6%, $p = 0,027$). Tỷ lệ phôi chất lượng tốt ở nhóm PICSİ cao hơn đáng kể so với nhóm ICSI (52,8% so với 34,0%, $p < 0,001$). PICSİ dường như vượt trội hơn về khả năng thụ tinh và chất lượng phôi ở những trường hợp tinh trùng dị dạng [83].

Trong một số nghiên cứu đã chỉ ra sử dụng acid hyaluronic có khả năng chọn lọc các tinh trùng toàn vẹn của DNA và có hình dạng bình thường [105], [115], [150], [163]. Tổn thương DNA tinh trùng có liên quan đến khả năng thụ thai, sảy thai tự nhiên và thất bại trong hỗ trợ sinh sản [168], [172], liên quan đến sự hình thành phôi phân chia và phôi nang [35], [84], [144]. Tinh trùng được thu thập sau khi có gắn kết với acid hyaluronic có mức độ phân mảnh DNA thấp hơn nhiều so với tinh trùng sau khi rửa, thu thập trong Polyvinylpyrrolidone, hoặc tinh trùng từ một mẫu tinh dịch tươi [115]. Kết quả phân tích ở những trường hợp mẫu tinh trùng phân mảnh DNA thấp và trung bình chúng tôi nhận thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ thụ

tinh giữa PICSI và ICSI. Sự hình thành phôi phân chia, phôi nang ở hai kỹ thuật là tương đương nhau. Tuy nhiên những phôi nang độ 1 hình thành nhiều hơn trong nhóm ICSI, nhưng phôi nang độ 2 có nhiều hơn ở nhóm PICSI. Bên cạnh đó, ở những trường hợp mẫu tinh trùng phân mảnh DNA cao (Bảng 3.28), chúng tôi quan sát thấy khả năng tạo phôi nang tốt có tỉ lệ thấp hơn ở nhóm thực hiện PICSI, và ở nhóm ICSI có số phôi nang tốt được tạo ra nhiều hơn, với số lượng mẫu nhỏ trong nhóm tinh trùng phân mảnh DNA cao nên các kết quả không ghi nhận sự khác biệt kỹ thuật. Kết quả này cho thấy kỹ thuật PICSI chưa có tác động cải thiện đối với mẫu tinh trùng có phân mảnh DNA cao.

Nhiều chứng cứ cho thấy việc nuôi cấy phôi đến giai đoạn phôi nang cho phép lựa chọn phôi có tiềm năng phát triển hơn, khả năng làm tổ cao hơn. Nâng cao chất lượng phôi chuyển nhờ việc nuôi cấy dài ngày đến giai đoạn phôi nang là một xu hướng tất yếu của lĩnh vực hỗ trợ sinh sản. Phôi có chất lượng tốt về mặt di truyền và khả năng phát triển tốt mới có thể tiến triển đến giai đoạn phôi nang vào ngày 5 sau khi thụ tinh. Nuôi cấy đến giai đoạn phôi nang giúp nâng cao được tỉ lệ làm tổ lên đến 60 -70%. Thời điểm phôi nang được chuyển vào tử cung ở ngày 5 là hoàn toàn phù hợp với sinh lý phát triển và tăng khả năng làm tổ vào niêm mạc tử cung [62]. Tại Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế, các chuyên viên phôi học đã thành thạo trong kỹ thuật nuôi cấy phôi nang ngày 5, đạt được tỉ lệ cao phôi nang được hình thành [9]. Các bằng chứng khoa học được công bố trước đó cho thấy kỹ thuật PICSI có hiệu quả trong cải thiện kết quả thụ tinh trong ống nghiệm, tuy nhiên cũng có những nghiên cứu cho rằng PICSI chưa thực sự hiệu quả hơn ICSI. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy PICSI chưa có tác động cải thiện đến kết quả phôi thụ tinh trong ống nghiệm, tỉ lệ phôi nang tốt được tạo ra từ kỹ thuật PICSI thấp hơn so với ICSI.

4.3. ƯU ĐIỂM VÀ HẠN CHẾ CỦA ĐỀ TÀI

Ưu điểm

Xác định được một số mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa phân mảnh DNA tinh trùng với chỉ số tinh dịch đồ ở nam giới cặp vợ chồng vô sinh. Đây là nghiên cứu sử dụng kỹ thuật phân tán chất nhuộm sắc, là kỹ thuật có thể thực hiện phổ biến tại các labo HTSS và có kết quả chính xác.

Nghiên cứu ghi nhận được một số mối liên quan, tương quan giữa DFI và tỉ lệ thụ tinh, đặc điểm phôi phân chia ngày 2, phôi nang; mà chưa có báo cáo đầy đủ nào tại Việt Nam với cỡ mẫu khá lớn, nuôi phôi đồng nhất đến giai đoạn phôi nang.

Nghiên cứu của chúng tôi đánh giá hiệu quả của kỹ thuật chọn lọc tinh trùng đến kết quả thụ tinh trong ống nghiệm, là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam sử dụng đĩa PICSI chuyên dụng thực hiện với chu kỳ noãn chị em, và với phương pháp nuôi cấy đơn phôi trong giọt môi trường, chúng tôi có thể theo dõi, đánh giá được đặc điểm của từng phôi. Kết quả ghi nhận được PICSI với khả năng thu nhận được tối đa phôi nang (mặc dù số lượng phôi nang độ 1 thấp hơn nhóm ICSI nhưng thu nhận được nhiều phôi nang độ 2 và độ 3).

Hạn chế đề tài

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu thập đối tượng nghiên cứu nhiều cặp vợ chồng với nguyên nhân vô sinh khác, chưa chuyên biệt loại bệnh nhân để đánh giá kỹ hơn mối liên quan này theo đối tượng cụ thể. Vì vậy, trong kết quả khi xác định mối tương quan chỉ ghi nhận được một số mối tương quan yếu giữa phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả phôi thụ tinh trong ống nghiệm.

Với hướng nghiên cứu chia đôi số noãn để thực hiện hai kỹ thuật, nghiên cứu chỉ chọn lựa những chu kỳ thu được ≥ 10 noãn, đây là những trường hợp có dự trữ buồng trứng bình thường, nên chưa áp dụng kỹ thuật PICSI ở phụ nữ dự trữ buồng trứng thấp. Trên thực tế có một số trường hợp thu nhận được 10 noãn nhưng số noãn MII thấp nên khi chia đôi số noãn cho mỗi kỹ thuật còn ít. Bên cạnh đó với số lượng chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm áp dụng kỹ thuật chưa nhiều nên cũng hạn chế đối tượng nghiên cứu theo đặc điểm riêng rẽ. Do đó, kết quả kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý có thể chưa có tác động rõ đến chất lượng phôi so với kỹ thuật ICSI thường quy.

KẾT LUẬN

Qua đề tài nghiên cứu ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng và kỹ thuật chọn lọc tinh trùng đến kết quả thụ tinh trong ống nghiệm, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

1. Môi liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng với các chỉ số tinh dịch đồ, chất lượng phôi và kết quả thụ tinh trong ống nghiệm.

1.1. Môi liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng với các chỉ số tinh dịch đồ

- Mức độ phân mảnh DNA tinh trùng trung bình ở nam giới cặp vợ chồng vô sinh là $23,65 \pm 13,80\%$. Tỷ lệ mẫu tinh trùng có mức độ phân mảnh DNA cao là 24,4%.

- Độ pH tinh dịch ở nhóm $DFI \geq 30\%$ là có giá trị thấp nhất. DFI có mối tương quan nghịch yếu với độ pH với $r = -0,21$, $p = 0,001$.

- Tinh trùng trong nhóm phân mảnh DNA mức thấp có khả năng di động tiến tới cao nhất ($p = 0,05$).

- Mật độ tinh trùng trong nhóm $DFI \geq 30\%$ là thấp nhất, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,03$.

- Có mối tương quan nghịch yếu $r = -0,13$, $p = 0,04$ giữa DFI và hình dạng tinh trùng bình thường, và mối tương quan thuận yếu với bất thường cổ đuôi của tinh trùng: $r = 0,23$, $p < 0,001$.

1.2. Môi liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng với chất lượng phôi và kết quả thụ tinh trong ống nghiệm.

- Nhóm tinh trùng phân mảnh DNA cao có tỉ lệ thụ tinh thấp nhất, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Có mối tương quan nghịch yếu giữa phân mảnh DNA tinh trùng và tỉ lệ thụ tinh ($r = -0,20$, $p = 0,02$).

- Không có sự khác biệt về kết quả phôi giai đoạn phân chia ngày 2 giữa các nhóm phân mảnh DNA tinh trùng. Nhóm phân mảnh DNA cao xuất hiện nhiều phôi bào có mảnh vỡ bào tương phôi bào $> 25\%$.

- Không có sự khác biệt về khả năng tạo phôi nang giữa các nhóm phân mảnh DNA tinh trùng.

- Tỉ lệ có thai và thai tiến triển ở nhóm $DFI \geq 30\%$ thấp nhất trong 3 nhóm, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$.

2. Tác động của kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý đến kết quả tạo phôi thụ tinh trong ống nghiệm

- Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê về kết quả thụ tinh, phôi phân chia ngày 2 giữa kỹ thuật PICSI và ICSI.

- Ở kỹ thuật PICSI tỉ lệ hình thành phôi nang độ 1 thấp hơn so với ICSI, nhưng tỉ lệ tạo phôi nang độ 2 và 3 ở PICSI cao hơn có ý nghĩa thống kê so với ICSI.

- Trong các phân nhóm về đặc điểm tinh trùng đều ghi nhận các giá trị tương tự kết quả chung, cho thấy kỹ thuật PICSI không làm thay đổi sự phát triển phôi giai đoạn sớm. Đối với giai đoạn phôi nang: PICSI tạo được nhiều phôi nang độ 2 và 3, ICSI tạo được nhiều phôi nang độ 1.

KIẾN NGHỊ

- Xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng là xét nghiệm tin cậy đánh giá được chất lượng tinh trùng, nên được áp dụng đồng thời với xét nghiệm tinh dịch đồ trong đánh giá chức năng sinh sản nam. Sử dụng kết quả phân mảnh DNA tinh trùng như một giá trị tham khảo để dự đoán kết quả thụ tinh trong ống nghiệm.

- Các trung tâm hỗ trợ sinh sản cần cân nhắc khi áp dụng thực hiện kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyễn Thị Hiệp Tuyết, Nguyễn Văn Trung, Nguyễn Thị Thái Thanh, Đặng Thị Hồng Nhạn, Đặng Công Thuận, Lê Minh Tâm (2021), **Đặc điểm phân mảnh DNA tinh trùng và mối liên quan với thông số tinh dịch đồ**, *Tạp chí Y Dược học - Trường Đại học Y Dược Huế*, 5 (11), tr. 103 – 109.
2. Nguyễn Thị Hiệp Tuyết , Nguyễn Văn Trung, Nguyễn Thị Thái Thanh, Đặng Thị Hồng Nhạn, Lê Minh Tâm (2021), **Mối tương quan giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả thụ tinh trong ống nghiệm**. *Tạp Chí Y học Việt Nam*, 502 (1), tr. 225 – 229.
3. Nguyen Thi Hiep Tuyet, Dang Thi Hong Nhan, Nguyen Thi Thai Thanh, Nguyen Van Trung, Dang Cong Thuan, Nguyen Vu Quoc Huy, Le Minh Tam (2022), **Correlations between abnormalities of morphological details and DNA fragmentation in human sperm**. *Clin Exp Reprod Med*, 49(1), pp: 40-48.
4. Le Minh Tam, Nguyen Van Trung, Nguyen Thi Thai Thanh, Nguyen Thi Hiep Tuyet, Le Dinh Duong, Nguyen Vu Quoc Huy (2021), **Predictive Significance of Sperm DNA Fragmentation Testing in Early Pregnancy Loss in Infertile Couples Undergoing Intracytoplasmic Sperm Injection**. *Research and reports in urology*, 13. pp: 313-323.
5. Nguyễn Thị Hiệp Tuyết, Nguyễn Văn Trung, Nguyễn Thị Thái Thanh, Đặng Thị Hồng Nhạn, Đặng Công Thuận, Lê Minh Tâm (2022), **Mối liên quan giữa khả năng gắn kết hyaluronic acid của tinh trùng với mức độ phân mảnh DNA và thông số tinh trùng**, *Tạp chí Y Dược học - Trường Đại học Y Dược Huế*, 5 (12), tr. 104 – 109.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Nguyễn Hoài Bắc và Bùi Cảnh Vin (2017), "Tác dụng của vi phẫu thắt tĩnh mạch lên độ phân mảnh DNA tinh trùng ở những bệnh nhân vô sinh do giãn tĩnh mạch tinh", *Tạp Chí Nghiên Cứu Y Học, Đại học Y Hà Nội*, 106,(1), tr. 137 - 145.
2. Bộ Y tế (2020), "Hướng dẫn sàng lọc và can thiệp giảm tác hại cho người có nguy cơ sức khỏe do uống rượu, bia tại cơ sở chăm sóc sức khỏe ban đầu và tại cộng đồng".
3. Lê Thụy Hồng Khả, Nguyễn Ngọc Quỳnh, Nguyễn Ngọc Bích,... và cs (2012), "Sử dụng hyaluronic acid thay thế PVP làm tăng tỷ lệ thai diễn tiến trong các chu kỳ tiêm tinh trùng vào bào tương noãn", *Tạp chí Phụ Sản*, 10,(4), tr. 51 - 57.
4. Nguyễn Minh Tài Lộc, Phạm Mã Quế Mai, Nguyễn Ân Bình,... và cs (2017), "Mối tương quan giữa kết quả tiêm tinh trùng vào bào tương noãn và sự phân mảnh DNA tinh trùng được đo bằng phương pháp khảo sát cấu trúc nhiễm sắc chất tinh trùng (SCSA) ", *Tạp chí Phụ Sản*, 14,(04), tr. 70 - 74.
5. Nguyễn Đắc Nguyên, Trần Thị Thu, Trần Đức Thịnh,... và cs (2021), "Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và một số yếu tố liên quan đến cặp vợ chồng vô sinh nguyên phát", *Tạp chí Phụ sản*, 19,(2), tr. 41-47.
6. Dương Thị Nhân (2020), "*Đánh giá mối liên hệ giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và các chỉ số tinh dịch đồ ở nam giới vô sinh đến khám và điều trị tại Bệnh viện A Thái Nguyên*", Luận văn Thạc sĩ Sinh học ứng dụng, Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên.
7. Triệu Tiến Sang, Trần Anh Đức, Trần Văn Khoa,... và cs (2018), "Nghiên cứu xây dựng quy trình đánh giá mức độ đứt gãy DNA tinh trùng", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 60,(7), tr. 17-22.
8. Lê Minh Tâm và Nguyễn Đắc Nguyên (2019), "Vai trò của stress oxy hóa với phân mảnh DNA tinh trùng và cập nhật các giải pháp can thiệp", *Tạp chí Phụ Sản*, Số đặc biệt, (Sân phụ khoa 9 - Từ bằng chứng đến thực hành), tr. 147 - 162.

9. Lê Minh Tâm, Nguyễn Thị Thái Thanh, và Cao Ngọc Thành (2015), "Nghiên cứu hiệu quả nuôi cấy phôi nang trong thụ tinh ống nghiệm", *Tạp chí Phụ sản*, 13,(1), tr. 54 - 58..
10. Lê Minh Tâm, Cao Ngọc Thành, Trần Thị Như Quỳnh,... và cs (2022). Chương 3: Các vấn đề lâm sàng trong vô sinh, tr 193 - 296; Chương 5: Chu kỳ hỗ trợ sinh sản, tr 379 - 441. Trong *Các vấn đề trọng yếu trong Hỗ trợ sinh sản, Tập 1 - Dành cho Bác sĩ lâm sàng*. Nhà xuất bản Y học
11. Lê Minh Tâm, Nguyễn Thị Thái Thanh, Nguyễn Văn Trung,... và cs, "Báo cáo công trình: Vai trò xét nghiệm đứt gãy DNA tinh trùng trong đánh giá khả năng sản nam giới hiếm muộn" Hội thi Sáng tạo Kỹ thuật tỉnh Thừa Thiên Huế lần thứ XI, Tỉnh Thừa Thiên Huế, 2021.
12. Lê Minh Tâm, Nguyễn Văn Trung, Nguyễn Thị Thái Thanh,... và cs (2022). Chương 1: Các kỹ thuật phân tích tinh dịch, tr 19 - 86; Chương 2: Các kỹ thuật chuẩn bị tinh trùng, tr 110 - 176; Chương 4: Kỹ thuật nuôi cấy, đánh giá và các can thiệp trên phôi. Trong *Các vấn đề trọng yếu trong Hỗ trợ sinh sản, Tập 2 - Dành cho Phôi học lâm sàng*. Nhà xuất bản Y học.
13. Cao Ngọc Thành và Lê Minh Tâm (2017). Chương 16: Chẩn đoán vô sinh nam, tr 2650 - 260. Trong *Nội tiết phụ khoa và Y học sinh sản*. Nhà xuất bản Đại học Huế.
14. Nguyễn Thị Quỳnh Tiên, Phạm Mã Quế Mai, Dương Nguyễn Duy Tuyền,... và cs (2019), "Mối tương quan của chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả tiêm tinh trùng vào bào tương noãn", *Tạp chí Phụ Sản*, 17 (1), tr. 62 - 67.
15. Nguyễn Văn Trung, Lê Minh Tâm, Nguyễn Thị Tâm An,... và cs (2018), "Nghiên cứu ứng dụng hệ thống theo dõi phôi liên tục (time lapse) trong thụ tinh ống nghiệm", *Tạp chí Phụ sản*, 15,(4), pp. 83 – 88.
16. Hồ Mạnh Tường, Nguyễn Minh Tài Lộc, Dương Nguyễn Duy Tuyền,... và cs (2020), "Đánh giá sự phân mảnh DNA tinh trùng của bệnh nhân khám hiếm muộn", *Tạp chí Phụ sản*, 18,(1), tr. 66-72.

TIẾNG ANH

17. Aboulmaouahib S., Madkour A., Kaarouch I.,... *et al* (2018), "Impact of alcohol and cigarette smoking consumption in male fertility potential: Looks at lipid peroxidation, enzymatic antioxidant activities and sperm DNA damage", *Andrologia*, 50,(3), pp. 1-7.
18. Adiga P.K., & Vitthala S. (2021), "Correlation of sperm DNA damage with blastocyst formation: systematic review and meta-analysis", *Middle East Fertility Society Journal*, 26,(1), pp. 1-14.
19. Agarwal A., Hamada A., & Esteves S.C. (2012), "Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1", *Nature Reviews Urology*, 9,(12), pp. 678-690.
20. Agarwal A., Majzoub A., Baskaran S.,... *et al* (2020), "Sperm DNA fragmentation: a new guideline for clinicians", *The world journal of men's health*, 38,(4), pp. 412 - 471.
21. Agarwal A., Majzoub A., Parekh N.,... *et al* (2020), "A schematic overview of the current status of male infertility practice", *The world journal of men's health*, 38,(3), pp. 308 - 322.
22. Agarwal A., Mulgund A., Hamada A.,... *et al* (2015), "A unique view on male infertility around the globe", *Reprod Biol Endocrinol*, pp. 1-9.
23. Aitken R.J., & Bakos H.W. (2021), "Should we be measuring DNA damage in human spermatozoa? New light on an old question", *Human Reproduction*, 36,(5), pp. 1175-1185.
24. Aitken R.J., Gibb Z., Baker M.A.,... *et al* (2016), "Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa", *Reprod Fertil Dev*, 28,(1-2), pp. 1-10.
25. Ajduk A., Yamauchi Y., & Ward M.A. (2006), "Sperm chromatin remodeling after intracytoplasmic sperm injection differs from that of in vitro fertilization", *Biol Reprod*, 75,(3), pp. 442-451.
26. Al Omrani B., Al Eisa N., Javed M.,... *et al* (2018), "Associations of sperm DNA fragmentation with lifestyle factors and semen parameters of Saudi men and its impact on ICSI outcome", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16,(49), pp. 1-6.

27. Allamaneni S.S.R., Naughton C.K., Sharma R.K.,... *et al* (2004), "Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size", *Fertility sterility*, 82,(6), pp. 1684-1686.
28. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011), "The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting", *Human reproduction*, 26,(6), pp. 1270-1283.
29. Alvarez Sedo C., Bilinski M., Lorenzi D.,... *et al* (2017), "Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects", *JBRA Assist Reprod*, 21,(4), pp. 343-350.
30. Asadi A., Ghahremani R., Abdolmaleki A.,... *et al* (2021), "Role of sperm apoptosis and oxidative stress in male infertility: A narrative review", *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 19,(6), pp. 493–504.
31. Avendano C., Franchi A., Duran H.,... *et al* (2010), "DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome", *Fertil Steril*, 94,(2), pp. 549-557.
32. Barbagallo F., La Vignera S., Cannarella R.,... *et al* (2021), "The relationship between seminal fluid hyperviscosity and oxidative stress: a systematic review", *Antioxidants*, 10,(356), pp. 1 -13.
33. Bazrgar M., Gourabi H., Yazdi P. E.,... *et al* (2014), "DNA repair signalling pathway genes are overexpressed in poor-quality pre-implantation human embryos with complex aneuploidy", *European Journal of Obstetrics Gynecology Reproductive Biology*, 175, pp. 152-156.
34. Beck-Fruchter R., Shalev E., & Weiss A. (2016), "Clinical benefit using sperm hyaluronic acid binding technique in ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis", *Reprod Biomed Online*, 32,(3), pp. 286-298.
35. Borges E., Zanetti B.F., Setti A.S.,... *et al* (2019), "Sperm DNA fragmentation is correlated with poor embryo development, lower implantation rate, and higher miscarriage rate in reproductive cycles of non-male factor infertility", *Fertil Steril*, 112,(3), pp. 483-490.

36. Bradley C.K., McArthur S.J., Gee A.J.,... *et al* (2016), "Intervention improves assisted conception intracytoplasmic sperm injection outcomes for patients with high levels of sperm DNA fragmentation: a retrospective analysis", *Andrology*, 4,(5), pp. 903-910.
37. Brison DR, Houghton FD, Falconer D,... *et al* (2004), "Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover", *Human reproduction*, 19,(10), pp. 2319-2324.
38. Chen L., Fang J., Jiang W.,... *et al* (2020), "Effects of the sperm DNA fragmentation index on the clinical and neonatal outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles", *Journal of ovarian research*, 13,(1), pp. 1-7.
39. Chi H.J., Kim S.G., Kim Y.Y.,... *et al* (2017), "ICSI significantly improved the pregnancy rate of patients with a high sperm DNA fragmentation index", *Clin Exp Reprod Med*, 44,(3), pp. 132-140.
40. Choe S.A., Tae J.C., Shin M.Y.,... *et al* (2012), "Application of sperm selection using hyaluronic acid binding in intracytoplasmic sperm injection cycles: a sibling oocyte study", *J Korean Med Sci*, 27,(12), pp. 1569-73.
41. Cissen M., Wely M., Scholten I.,... *et al* (2016), "Measuring sperm DNA fragmentation and clinical outcomes of medically assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis", *J PloS one*, 11,(11), pp. 1-23.
42. Collins J.A, Barnhart K.T, & Schlegel P.N (2008), "Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization?", *Fertil Steril*, 89,(4), pp. 823-831.
43. Consultation WHO Expert (2004), "Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies", *Lancet*, 363,(9403), pp. 157-163.
44. Daris B., Goropevšek A., Hojnik N.,... *et al* (2010), "Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI", *Archives of gynecology and obstetrics*, 281, pp. 363-367.

45. Deenadayal Mettler A., Govindarajan M., Srinivas S.,... *et al* (2020), "Male age is associated with sperm DNA/chromatin integrity", *The Aging Male*, 23,(5), pp. 822-829.
46. Eini F., Kutenaei M.A., Zareei F.,... *et al* (2021), "Effect of bacterial infection on sperm quality and DNA fragmentation in subfertile men with Leukocytospermia", *BMC Molecular Cell Biology*, 22,(1), pp. 1-10.
47. Erberelli R.F., Salgado R.M., Pereira D.H.M.,... *et al* (2017), "Hyaluronan-binding system for sperm selection enhances pregnancy rates in ICSI cycles associated with male factor infertility", *JBRA assisted reproduction*, 21,(1), pp. 1 - 6.
48. Esbert M., Pacheco A., Soares S.R.,... *et al* (2018), "High sperm DNA fragmentation delays human embryo kinetics when oocytes from young and healthy donors are microinjected", *Andrology*, 6,(5), pp. 697-706.
49. Esteves S.C., Roque M., Bradley C.K.,... *et al* (2017), "Reproductive outcomes of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with high levels of DNA fragmentation in semen: systematic review and meta-analysis", *Fertility Sterility*, 108,(3), pp. 456-467.
50. Esteves S.C., Santi C., & Simoni M. (2020), "An update on clinical and surgical interventions to reduce sperm DNA fragmentation in infertile men", *Andrology*, 8,(1), pp. 53-81.
51. Evenson D.P. (2016), "The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA(®)) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility", *Anim Reprod Sci*, 169, pp. 56-75.
52. Fatehi A.N., Bevers M.M., Schoevers E.,... *et al* (2006), "DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages", *Journal of andrology*, 27,(2), pp. 176-188.
53. Feijó C.M., & Esteves S.C. (2014), "Diagnostic accuracy of sperm chromatin dispersion test to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with unexplained infertility", *Fertility Sterility*, 101,(1), pp. 58-63.

54. Fernández J.L., Muriel L., Rivero M.T.,... *et al* (2003), "The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation", *Journal of andrology*, 24,(1), pp. 59-66.
55. Finelli R., Mottola F., & Agarwal A. (2021), "Impact of alcohol consumption on male fertility potential: A narrative review", *International Journal of Environmental Research Public Health*, 19,(328), pp. 1-17.
56. Fischer M.A., Willis J., & Zini A. (2003), "Human sperm DNA integrity: correlation with sperm cytoplasmic droplets", *Urology*, 61,(1), pp. 207-211.
57. Fragouli E, Alfarawati S, Spath K,... *et al* (2014), "Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos", *Molecular human reproduction*, 20,(2), pp. 117-126.
58. Fuentes-Mascorro G., Serrano H., & Rosado A. (2000), "Sperm chromatin", *Arch Androl*, 45,(3), pp. 215-225.
59. Garcia-Segura S., Ribas-Maynou J., Garcia-Peiró A.,... *et al* (2020), "Relationship of Seminal Oxidation-Reduction Potential with Sperm DNA Integrity and pH in Idiopathic Infertile Patients", *Biology*, 9,(262), pp. 1-12.
60. Gardner DK, & Schoolcraft WB (1999), "Culture and transfer of human blastocysts", *Current Opinion in Obstetrics Gynecology*, 11,(3), pp. 307-311.
61. Gardner DK, Wale PL, Collins R,... *et al* (2011), "Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome", *Human reproduction*, 26,(8), pp. 1981-1986.
62. Gardner K.D., & Balaban B. (2016), "Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important?", *Molecular Human Reproduction*, 22,(10), pp. 704–718.
63. Ghaleno L.R., Valojerdi M.R., Chehrazi M.,... *et al* (2016), "Hyaluronic acid binding assay is highly sensitive to select human spermatozoa with good progressive motility, morphology, and nuclear maturity", *Gynecologic Obstetric Investigation*, 81,(3), pp. 244-250.

64. Gill K., Jakubik-Uljasz J., Rosiak-Gill A.,... *et al* (2020), "Male aging as a causative factor of detrimental changes in human conventional semen parameters and sperm DNA integrity", *The Aging Male*, 23,(5), pp. 1321-1332.
65. Gill K., Jakubik J., Rosiak-Gill A.,... *et al* (2019), "Utility and predictive value of human standard semen parameters and sperm DNA dispersion for fertility potential", *International Journal of Environmental Research Public Health*, 16,(11), pp. 2004.
66. Green K.A., Patounakis G., Dougherty M.P.,... *et al* (2020), "Sperm DNA fragmentation on the day of fertilization is not associated with embryologic or clinical outcomes after IVF/ICSI", *Journal of assisted reproduction and genetics*, 37,(1), pp. 71-76.
67. Gunes S., Hekim G.N.T., Arslan M.A.,... *et al* (2016), "Effects of aging on the male reproductive system", *Journal of assisted reproduction genetics*, 33,(4), pp. 441-454.
68. Hammoud S.S, Nix D.A, Zhang H,... *et al* (2009), "Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development", *Nature Reviews Urology*, 460,(7254), pp. 473-478.
69. Hao S.L., Ni F.D., & Yang W.X. (2019), "The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis", *Gene*, 706, pp. 201-210.
70. Hasanen E., Elqusi K., ElTanbouly S.,... *et al* (2020), "PICS1 vs. MACS for abnormal sperm DNA fragmentation ICSI cases: a prospective randomized trial", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37,(10), pp. 2605-2613.
71. Houghton¹ FD, Hawkhead JA, Humpherson PG,... *et al* (2002), "Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity", *Human reproduction*, 17,(4), pp. 999-1005.
72. Hozyen M., Hasanen E., Elqusi K.,... *et al* (2021), "Reproductive Outcomes of Different Sperm Selection Techniques for ICSI Patients with Abnormal Sperm DNA Fragmentation: a Randomized Controlled Trial", *Reproductive Sciences*, 29,(1), pp. 220-228.

73. Huszar G. (2012).Sperm testing and ICSI selection by hyaluronic acid binding: the hyaluronic acid-coated glass slide and petri dish in the andrology and IVF laboratories. In *Practical Manual of in Vitro Fertilization*, pp. 241-257.
74. Huszar G., Jakab A., Sakkas D.,... *et al* (2007), "Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects", *Reprod Biomed Online*, 14,(5), pp. 650-663.
75. Huszar G., Ozenci C.C., Cayli S.,... *et al* (2003), "Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status", *Fertil Steril*, 79 (3), pp. 1616-1624.
76. Ivec M., Kovacic B., & Vlasisavljevic V. (2011), "Prediction of human blastocyst development from morulas with delayed and/or incomplete compaction", *Fertil Steril*, 96,(6), pp. 1473-1478.
77. Jakubik-Uljasz J., Gill K., Rosiak-Gill A.,... *et al* (2020), "Relationship between sperm morphology and sperm DNA dispersion", *Translational Andrology Urology*, 9,(2), pp. 405 - 415.
78. Javed M., & Michael E. (2012).Intracytoplasmic Sperm Injection–Factors Affecting Fertilization. In *Enhancing Success of Assisted Reproduction*, pp. 117 - 143.
79. Jin J., Pan C., Fei Q.,... *et al* (2015), "Effect of sperm DNA fragmentation on the clinical outcomes for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in women with different ovarian reserves", *Fertility Sterility*, 103,(4), pp. 910-916.
80. Katz-Jaffe MG, Schoolcraft WB, & Gardner DK (2006), "Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos", *Fertility and sterility*, 86,(3), pp. 678-685.
81. Khalili M.A., AGHAEI M.F., Anvari M.,... *et al* (2006), "Sperm Nuclear DNA in Ejaculates of Fertile and Infertile Men Correlation with Semen Parameters", *Urology Journal*, 3,(3), pp. 154-158.

82. Kim G.Y. (2018), "What should be done for men with sperm DNA fragmentation?", *Clinical experimental reproductive medicine*, 45,(3), pp. 101–109.
83. Kim S.J., Kim H., Kim T.H.,... *et al* (2020), "Effect of sperm selection using hyaluronan on fertilization and quality of cleavage-stage embryos in intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles of couples with severe teratozoospermia", *Gynecological Endocrinology*, 36,(5), pp. 456-459.
84. Kim S.M., Kim S.K., Jee B.C.,... *et al* (2019), "Effect of Sperm DNA Fragmentation on Embryo Quality in Normal Responder Women in In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection", *Yonsei medical journal*, 60,(5), pp. 461-466.
85. Kim SG, Kim YY, Park JY,... *et al* (2018), "Early fragment removal on in vitro fertilization day 2 significantly improves the subsequent development and clinical outcomes of fragmented human embryos", *Clinical Experimental Reproductive Medicine*, 45,(3), pp. 122 - 128.
86. Kirkegaard K, Campbell A, Agerholm I,... *et al* (2014), "Limitations of a time-lapse blastocyst prediction model: a large multicentre outcome analysis", *Reproductive biomedicine online*, 29,(2), pp. 156-158.
87. Kirkman-Brown J., Pavitt S., Khalaf Y.,... *et al* (2019), "Sperm selection for assisted reproduction by prior hyaluronan binding: the HABSelect RCT", *J Efficacy mechanism evaluation*, pp. 1-79.
88. Komiya A., Kato T., Kawauchi Y.,... *et al* (2014), "Clinical factors associated with sperm DNA fragmentation in male patients with infertility", *The scientific world journal*, pp. 1-11.
89. Krzastek S.C., Farhi J., Gray M.,... *et al* (2020), "Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential", *Translational andrology urology*, 9,(6), pp. 2797 - 2813.
90. La Maestra S., De Flora S., & Micale R.T. (2015), "Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa", *International journal of hygiene environmental health*, 218,(1), pp. 117-122.

91. Laberge R.M., & Boissonneault G. (2005), "On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids", *Biol Reprod*, 73,(2), pp. 289-296.
92. Lee M.J., Lee R.K., Lin M.H.,... *et al* (2012), "Cleavage speed and implantation potential of early-cleavage embryos in IVF or ICSI cycles", *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29,(8), pp. 745 - 50.
93. Liang X., Mao Y., Wang Y.,... *et al* (2019), "Female age affects the utility of sperm DNA fragmentation in predicting IVF and ICSI outcomes", *Reproductive BioMedicine Online*, 39,(6), pp. 955-962.
94. Liu Y., Feenan K., Chapple V.,... *et al* (2017), "Intracytoplasmic sperm injection using hyaluronic acid or polyvinylpyrrolidone: a time-lapse sibling oocyte study", *Human Fertility*, 22,(1), pp. 39-45.
95. Lu J., Jing J., Chen L.,... *et al* (2018), "Analysis of human sperm DNA fragmentation index (DFI) related factors: a report of 1010 subfertile men in China", *Reproductive Biology Endocrinology*, 16,(1), pp. 1-9.
96. Luo Y., Wu S., Zhang M.,... *et al* (2022), "Sperm DNA integrity is critically impacted by male age but does not influence outcomes of artificial insemination by husband in the Chinese infertile couples", *Aging*, 14,(10), pp. 4326 - 4335.
97. Majumdar G., & Majumdar A. (2013), "A prospective randomized study to evaluate the effect of hyaluronic acid sperm selection on the intracytoplasmic sperm injection outcome of patients with unexplained infertility having normal semen parameters", *J Assist Reprod Genet*, 30,(11), pp. 1471-1475.
98. Marchlewska K., Filipiak E., Walczak-Jedrzejowska R.,... *et al* (2016), "Sperm DNA fragmentation index and hyaluronan binding ability in men from infertile couples and men with testicular germ cell tumor", *BioMed Research International*, 2016, pp. 1-8.
99. McQueen D.B, Zhang J., & Robins J.C (2019), "Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis", *Fertility sterility*, 112,(1), pp. 54-60.

100. McReynolds S, Vanderlinden L, Stevens J,... *et al* (2011), "Lipocalin-1: a potential marker for noninvasive aneuploidy screening", *Fertility and sterility*, 95,(8), pp. 2631-2633.
101. Michailidou-Ahmed C., Sharpe A.A., Burrell E.V.,... *et al* (2016), "HBA score in relation to donor semen profiles and live birth rates: a preliminary study", *Human Fertility*, 19,(4), pp. 289-298.
102. Miller D., Pavitt S., Sharma V.,... *et al* (2019), "Physiological, hyaluronan-selected intracytoplasmic sperm injection for infertility treatment (HABSelect): a parallel, two-group, randomised trial", *The Lancet*, 393,(10170), pp. 416-422.
103. Mokanszki A., Tothne E.V., Bodnar B.,... *et al* (2014), "Is sperm hyaluronic acid binding ability predictive for clinical success of intracytoplasmic sperm injection: PICSi vs. ICSI?", *Syst Biol Reprod Med*, 60,(6), pp. 348-354.
104. Muriel L., Meseguer M., Fernandez J.L.,... *et al* (2006), "Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study", *Hum Reprod*, 21,(3), pp. 738-744.
105. Nasr-Esfahani M.H., Razavi S., Vahdati A.A.,... *et al* (2008), "Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome", *Journal of assisted reproduction and genetics*, 25,(5), pp. 197-203.
106. Niakan K.K., Han J., Pedersen R.A.,... *et al* (2012), "Human pre-implantation embryo development", *Development*, 139,(5), pp. 829-841.
107. Nishihara T., Matsumoto K., Hosoi Y.,... *et al* (2018), "Evaluation of antioxidant status and oxidative stress markers in follicular fluid for human in vitro fertilization outcome", *Reproductive Medicine Biology*, 17,(4), pp. 481-486.
108. Nogales MDC, Bronet F, Basile N,... *et al* (2017), "Type of chromosome abnormality affects embryo morphology dynamics", *Fertility and sterility*, 107,(1), pp. 229-235. e2.
109. Novoselsky - Persky M., Hershko-Klement A., Solnica A.,... *et al* (2021), "Conventional ICSI vs. physiological selection of spermatozoa for ICSI (picsi) in sibling oocytes", *Andrology*, 9,(3), pp. 873-877.

110. Oleszczuk K., Giwercman A., & Bungum M. (2016), "Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome", *Andrology*, 4,(2), pp. 290-296.
111. Omolaoye T.S., El Shahawy O., Skosana B.T.,... *et al* (2021), "The mutagenic effect of tobacco smoke on male fertility", *Environmental Science Pollution Research*, pp. 1-12.
112. Osaka A., Okada H., Onozuka S.,... *et al* (2022), "Evaluation of the sperm DNA fragmentation index in infertile Japanese men by in-house flow cytometric analysis", *Asian Journal of Andrology*, 24,(1), pp. 40 - 44.
113. Osman A., Alsomait H., & Seshadri S. (2015), "The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis", *Reprod Biomed Online*, 30 (2), pp. 120-127.
114. Oumaima A., Tesnim A., Zohra H.,... *et al* (2018), "Investigation on the origin of sperm morphological defects: oxidative attacks, chromatin immaturity, and DNA fragmentation", *Environmental Science Pollution Research*, 25,(14), pp. 13775-13786.
115. Parmegiani L., Cognigni G.E., Bernardi S.,... *et al* (2010), ""Physiologic ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality", *Fertil Steril*, 93,(2), pp. 598-604.
116. Petersen C.G., Massaro F.C., Mauri A.L.,... *et al* (2010), "Efficacy of hyaluronic acid binding assay in selecting motile spermatozoa with normal morphology at high magnification", *J Reproductive Biology Endocrinology*, 8,(1), pp. 1-7.
117. Petersen C.G., Mauri A.L., Vagnini D.,... *et al* (2018), "The effects of male age on sperm DNA damage: an evaluation of 2,178 semen samples", *JBRA assisted reproduction*, 22,(4), pp. 323 - 330.
118. Pino V., Sanz A., Valdés N.,... *et al* (2020), "The effects of aging on semen parameters and sperm DNA fragmentation", *JBRA assisted reproduction*, 24,(1), pp. 82 - 86.

119. Pourmasumi S., Sabeti P., Rahiminia T.,... *et al* (2017), "The etiologies of DNA abnormalities in male infertility: an assessment and review", *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 15,(6), pp. 331 - 344.
120. Pribenszky C, Nilselid AM, & Montag M (2017), "Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis", *Reproductive biomedicine online*, 35,(5), pp. 511-520.
121. Prinosilova P., Kruge T., Sati L.,... *et al* (2009), "Selectivity of hyaluronic acid binding for spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology", *Reproductive biomedicine online*, 18,(2), pp. 177-183.
122. Racowsky C, Vernon M, Mayer J,... *et al* (2010), "Standardization of grading embryo morphology", *Journal of Assisted Reproduction Genetics*, 27,(8), pp. 437-439.
123. Ribas-Maynou J., García-Peiró A Fau - Fernandez-Encinas A., Fernandez-Encinas A Fau - Amengual M.J.,... *et al* (2012), "Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor", *PLoS One*, 7,(9), pp. 1-9.
124. Ribas-Maynou J., Garcia-Peiró A., Abad C.,... *et al* (2012), "Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups", *Human reproduction*, 27 (3), pp. 652–658.
125. Ribas-Maynou J., & Yeste M. (2020), "Oxidative stress in male infertility: causes, effects in assisted reproductive techniques, and protective support of antioxidants", *Biology*, 9,(4), pp. 1-16.
126. Ricci E., Noli S., Ferrari S.,... *et al* (2018), "Alcohol intake and semen variables: cross-sectional analysis of a prospective cohort study of men referring to an Italian Fertility Clinic", *Andrology*, 6,(5), pp. 690-696.
127. Rijdsdijk M. (2015), "A comparison of three spermatozoa selection techniques for Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) using swim-up, Cumulus Oophorus Model and PICSI® Dish", Doctor in Reproductive Medical Science, Stellenbosch: Stellenbosch University.

128. Rilcheva V.S, Ayvazova N.P, Ilieva L.O,... *et al* (2016), "Sperm DNA integrity test and assisted reproductive technology (Art) outcome", *Journal of Biomedical Clinical Research*, 9,(1), pp. 21-29.
129. Ruvolo G., Fattouh R.R., Bosco L.,... *et al* (2013), "New molecular markers for the evaluation of gamete quality", *Journal of assisted reproduction genetics*, 30,(2), pp. 207-212.
130. Sabeti P., Pourmasumi S., Rahiminia T.,... *et al* (2016), "Etiologies of sperm oxidative stress", *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 14,(4), pp. 231 - 240.
131. Said T.M., Paasch U., Glander H.J.,... *et al* (2004), "Role of caspases in male infertility", *Hum Reprod Update*, 10,(1), pp. 39-51.
132. Sakkas D., Mariethoz E., & St John J.C. (1999), "Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway", *Exp Cell Res*, 251,(2), pp. 350-355.
133. Sakkas D., Seli E., Bizzaro D.,... *et al* (2003), "Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis", *Reproductive biomedicine online*, 7,(4), pp. 428-432.
134. Sansone A., Di Dato C., de Angelis C.,... *et al* (2018), "Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility", *Reproductive biology endocrinology*, 16,(1), pp. 1-11.
135. Scott L, Alvero R, Leondires M,... *et al* (2000), "The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation", *Hum Reprod*, 15,(11), pp. 2394-403.
136. Scott L.A. (2000), "Oocyte and embryo polarity", *Semin Reprod Med*, 18,(2), pp. 171-83.
137. Sepaniak S., Forges T., Gerard H.,... *et al* (2006), "The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation", *Toxicology*, 223,(1-2), pp. 54-60.
138. Setti A.S., Braga D.P.A.F., Provenza R.R.,... *et al* (2021), "Oocyte ability to repair sperm DNA fragmentation: the impact of maternal age on intracytoplasmic sperm injection outcomes", *Fertility and Sterility*.

139. Shaman J.A., Yamauchi Y., & Ward W.S. (2007), "The sperm nuclear matrix is required for paternal DNA replication", *J Cell Biochem*, 102,(3), pp. 680-688.
140. Sharma R., Ahmad G., Esteves S.C.,... *et al* (2016), "Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control", *J Assist Reprod Genet*, 33,(2), pp. 291-300.
141. Simon L., Murphy K., Shamsi M.B.,... *et al* (2014), "Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development", *Hum Reprod*, 29,(11), pp. 2402-2412.
142. Simon L., Zini A., Dyachenko A.,... *et al* (2017), "A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome", *Asian journal of andrology*, 19,(1), pp. 80 - 90.
143. Singh A., & Agarwal A. (2011), "The Role of Sperm Chromatin Integrity and DNA Damage on Male Infertility ", *The Open Reproductive Science Journal*, 3, pp. 65-71.
144. Sivanarayana T., Ravi Krishna C., Jaya Prakash G.,... *et al* (2014), "Sperm DNA fragmentation assay by sperm chromatin dispersion (SCD): correlation between DNA fragmentation and outcome of intracytoplasmic sperm injection", *Reprod Med Biol*, 13,(2), pp. 87-94.
145. Smit M., Romijn J.C., Wildhagen M.F.,... *et al* (2010), "Decreased sperm DNA fragmentation after surgical varicocelelectomy is associated with increased pregnancy rate", *The Journal of urology*, 183,(1), pp. 270-274.
146. Tam Le Minh Tam, Nguyen Dac Nguyen, Le Dinh Duong,... *et al* (2020), "Impact of body mass index and metabolic syndrome on sperm DNA fragmentation in males from infertile couples: A cross-sectional study from Vietnam", *Metabolism open*, 7, pp. 1-6.

147. Tam Le Minh Tam, Nguyen Thi Tam An , Nguyen Thi Hiep Tuyet ,... *et al* (2019), "Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters?", *Reproductive Medicine and Biology*, 18,(4), pp. 390-396.
148. Tam Le Minh Tam, Nguyen Thi Tam An, Nguyen Thi Thai Thanh,... *et al* (2018), "Thinning and drilling laser-assisted hatching in thawed embryo transfer: A randomized controlled trial", *Clinical experimental reproductive medicine*, 45,(3), pp. 129–134.
149. Tan J., Taskin O., Albert A.,... *et al* (2019), "Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis", *Reproductive BioMedicine Online*, 38,(6), pp. 951-960.
150. Tarozzi N., Nadalini M., Bizzaro D.,... *et al* (2009), "Sperm–hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law", *Reproductive biomedicine online*, 19, pp. 35-43.
151. Utsuno H., Oka K., Yamamoto A.,... *et al* (2013), "Evaluation of sperm head shape at high magnification revealed correlation of sperm DNA fragmentation with aberrant head ellipticity and angularity", *Fertil Steril*, 99,(6), pp. 1573-1580.
152. Van Bui Tan., Blizzard C.L., Luong Khue Ngoc.,... *et al* (2016), "Alcohol consumption in Vietnam, and the use of ‘standard drinks’ to measure alcohol intake", *Alcohol alcoholism*, 51,(2), pp. 186-195.
153. van der Heijden G.W., Ramos L., Baart E.B.,... *et al* (2008), "Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans", *BMC Dev Biol*, 8,(34), pp. 1-6.
154. Vinnakota C., Cree L., Peek J.,... *et al* (2019), "Incidence of high sperm DNA fragmentation in a targeted population of subfertile men", *Systems biology in reproductive medicine*, 65,(6), pp. 451-457.
155. Walczak–Jedrzejowska R., Wolski J.K., & Slowikowska–Hilczer J. (2013), "The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility", *Central European journal of urology*, 66,(1), pp. 60 - 67.

156. Ward W.S. (2010), "Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development", *Mol Hum Reprod*, 16,(1), pp. 30-36.
157. Wdowiak A., Bakalczuk S., & Bakalczuk G. (2015), "The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmatic sperm injection", *Reproductive biology*, 15,(2), pp. 94-100.
158. West R., Coomarasamy A., Frew L.,... *et al* (2022), "Sperm selection with hyaluronic acid improved live birth outcomes among older couples and was connected to sperm DNA quality, potentially affecting all treatment outcomes", *Human Reproduction*, 37,(6), pp. 1106-1125.
159. WHO (2020)"Infertility," <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>.
160. WHO, *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 6 Edition ed., Switzerland, 2021.
161. WHO, *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 5 Edition ed., Switzerland, 2010.
162. Xue L.T., Wang R.X., He B.,... *et al* (2016), "Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcomes for Chinese couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection", *Journal of International Medical Research*, 44,(6), pp. 1283-1291.
163. Yagci A., Murk W., Stronk J.,... *et al* (2010), "Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study", *Journal of andrology*, 31,(6), pp. 566-572.
164. Yang H., Li G., Jin H.,... *et al* (2019), "The effect of sperm DNA fragmentation index on assisted reproductive technology outcomes and its relationship with semen parameters and lifestyle", *Translational andrology urology*, 8,(4), pp. 356 - 365.
165. Ye H., Huang G., Gao Y.,... *et al* (2006), "Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization", *Human Reproduction*, 21,(6), pp. 1545-1550.

166. Yildirim M., Duvan C.I., Pekel A.,... *et al* (2015), "Can hyaluronan binding assay predict the outcome of intrauterine insemination in couples with unexplained or mild male factor infertility?", *Journal of Reproduction Infertility*, 16,(1), pp. 1- 14.
167. Yu Eun Jeong, & Lyu Sang Woo (2021), "Cumulus and granulosa cell biomarkers: a good predictor for successful oocyte and embryo developmental competence in human in vitro fertilization", *Journal of Genetic Medicine*, 18,(1), pp. 1-7.
168. Zhao J., Zhang Q., Wang Y.,... *et al* (2014), "Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis", *Fertility sterility*, 102,(4), pp. 998-1005.
169. Zhen W.W., Song G., Wang Q.L.,... *et al* (2018), "Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following in vitro fertilization", *Asian J Androl*, 20,(1), pp. 75-79.
170. Zini A. (2011), "Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic?", *Systems biology in reproductive medicine*, 57,(1-2), pp. 78-85.
171. Zini A., Bielecki R., Phang D.,... *et al* (2001), "Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men", *Fertil Steril*, 75,(4), pp. 674-677.
172. Zini A., Boman J.M , Belzile E.,... *et al* (2008), "Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis", *Hum Reprod*, 23,(12), pp. 2663-2668.
173. Zini A., & Sigman M. (2009), "Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons", *J Androl*, 30,(3), pp. 219-229.

PHỤ LỤC

QUY TRÌNH KỸ THUẬT

TIÊM TINH TRÙNG VÀO BÀO TƯƠNG NOãn

1. Chuẩn bị trang thiết bị, môi trường

1.1. Chuẩn bị trang thiết bị

- Kính hiển vi đảo ngược, hệ thống vi thao tác, hệ thống vi tiêm và đĩa gia nhiệt.

- Tủ nuôi cấy với % CO₂ thích hợp (tối ưu nồng độ O₂ thấp: 5 – 7%)

- Dụng cụ vi tiêm (kim chích ICSI, kim giữ Holding). Cả 2 kim có góc gập xấp xỉ 30- 35⁰ cách đầu kim 1mm, đường kính 5 – 6 µm để có thể thực hiện quy trình tiêm với đầu kim ở vị trí nằm ngang với đĩa ICSI.

- Pipette chuyển tế bào

- Đĩa ICSI hoặc sử dụng đĩa nắp 35mm./ Đĩa PICSI.

- Kính hiển vi soi nổi.

- Đầu côn vàng tiệt trùng từng cái.

- Thiết bị bơm hút môi trường

- Micropipette

1.2. Chuẩn bị môi trường cần thiết

- Môi trường ICSI: 7µL môi trường polyvinylpyrrolidone (PVP) hoặc sản phẩm thay thế để làm chậm tinh trùng.

- Môi trường tiêm ICSI là môi trường thao tác bên ngoài tủ cấy: ví dụ G – MOPS PLUS (Vitrolife, Thụy điển): 0,2 mL (đã chuẩn bị sẵn trước 1 ngày).

- Dầu phủ Ovoil: 2,5mL

- Môi trường nuôi cấy phôi sau ICSI: môi trường nuôi cấy liên tục G-TL (Vitrolife, Thụy điển).

1.3. Chuẩn bị đĩa ICSI

- Đĩa ICSI được chuẩn bị vào đầu ngày tiến hành ICSI

- Ghi nhãn: viết đầy đủ thông tin: số thứ tự - tên bệnh nhân, ngày chọc hút, số thứ tự các giọt vào dưới đáy đĩa.

- Sử dụng pipette 5 mL hút 2,5 mL Ovoil.

- Hút 7 μL dung dịch ICSI bằng micropipette rồi tạo giọt dài tại trung tâm đĩa và dàn mỏng thành vệt dài để tiện cho thao tác tìm và bắt động tinh trùng.

- Dùng micropipette trên tráng trong G-MOPS PLUS. Sau đó, hút môi trường G-MOPS PLUS và đặt thành 6 giọt (7 μL /giọt). Đặt các giọt môi trường thao tác bên trái, dọc theo giọt PVP.

- Phủ 2,5 mL Ovoil lên đĩa ICSI để tránh bay hơi.

- Đĩa được bảo quản ở nhiệt độ 37°C .

2. Chuẩn bị tinh trùng

Mẫu tinh dịch được thu thập vào ngày chọc hút noãn bằng cách thủ dâm ít nhất sau 2 – 3 ngày kiêng giao hợp, sau đó để hóa lỏng khoảng 20 phút ở 37°C trước khi xử lý. Thực hiện quy trình phương pháp ly tâm theo thang nồng độ:

- Kiểm tra, ghi nhãn định danh tên bệnh nhân trên mỗi ống nghiệm chứa môi trường, pipette pasteur tương ứng với lọ chứa mẫu.

- Trộn đều mẫu tinh dịch đã ly giải, đánh giá mật độ, độ di động trước lọc rửa.

- Tiến hành đặt lớp môi trường trong ống nghiệm đáy nhọn 15mL với 1,5mL môi trường Sil – select plus (45%) ở trên và 1,5mL Sil – select plus (90%) ở dưới.

- Đặt nhẹ nhàng 1- 1,5mL tinh dịch ở trên lớp môi trường.

- Ly tâm với lực ly tâm 350g trong 15 phút.

- Loại bỏ phần dịch nổi, chứa lại 0,5mL cặn lắng. Hút cặn lắng vào 3mL môi trường Ferticult Flushing trong ống đáy nhọn 15mL và ly tâm với lực ly tâm 350g trong 10 phút.

- Loại bỏ phần dịch nổi, chứa 0,3mL. Thêm 3 mL môi trường Spermrise đã chuẩn bị trước vào ống, trộn đều mẫu. Sau đó tiến hành ly tâm với lực ly tâm 350g trong 10 phút.

- Phần dịch nổi được loại bỏ cho đến khi trong ống nghiệm còn 0,2 – 0,7mL tùy thuộc vào mật độ và chất lượng tinh trùng.

- Trộn đều và đánh giá mật độ và tỉ lệ tinh trùng di động tiến tới.

3. Thu nhận và xử lý noãn

Phức hợp noãn – cumulus (COC) được thu nhận sau chọc hút được ủ ở tủ nuôi cấy CO_2 trong 2 giờ, tế bào cumulus được loại bỏ bằng cách tiếp xúc với môi

trường đệm thao tác: HTF-HEPES có chứa hyaluronidase. Dưới kính hiển vi soi nổi, noãn được đánh giá dựa trên sự biến mất túi mầm và sự hiện diện thể cực. ICSI chỉ được thực hiện với các noãn MII.

4. Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn

ICSI được thực hiện sau khi chọc hút noãn 3 -5 giờ (39 – 41 giờ sau khi kích hoạt trưởng thành noãn) để cho kết quả tối ưu.

4.1. Chuẩn bị hệ vi thao tác

- Kim ICSI và kim Holding sẽ được gắn vào hệ vi thao tác trước khi thực hiện tiêm.

- Nhẹ nhàng đưa kim Holding vào vi trường bằng bộ điều chỉnh thô. Quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược và chỉnh rõ kim Holding ở vật kính 5X.

- Xoay và chỉnh kim Holding sao cho cạnh của kim song song với mặt phẳng bàn thao tác.

- Điều chỉnh sao cho cả 2 kim cùng quan sát rõ trong 1 vi trường.

- Xoay nhẹ kim ICSI sao cho 2 kim đồng phẳng và thẳng hàng. Cố định vị trí gắn của hai kim trước ICSI.

4.2. Chuyển giao tử vào đĩa ICSI

4.2.1. Chuyển tinh trùng vào đĩa ICSI

- Thời điểm: trước khi thực hiện ICSI

- Sau khi nhận mẫu tinh trùng từ labo nam học, đối chiếu tên bệnh nhân và ngày chọc hút. Kiểm tra thông tin về mật độ và độ di động của tinh trùng.

- Sử dụng micropipette hút một lượng tinh trùng vừa phải (thường < 2 μ L) vào giọt dung dịch ICSI.

- Quá trình này được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi 5X.

4.2.2. Chuyển noãn vào đĩa ICSI

- Thời điểm: vào thời điểm ICSI, sau khi tách noãn 1 giờ

- Dùng pipette load noãn ở đĩa nuôi cấy chuyển vào giữa giọt môi trường ở đĩa ICSI (1 noãn/giọt).

4.2.3. Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn

- Sau khi bắt được tinh trùng, nâng kim ICSI lên và di chuyển đến giữa giọt môi trường chứa noãn.

- Sử dụng kim ICSI di chuyển noãn để tìm kiếm thể cực và ổn định noãn tại vị trí thể cực thứ nhất hướng 12 giờ hoặc 6 giờ.

- Dùng kim Holding hút và giữ noãn ở hướng 9 giờ.

- Điều chỉnh kim ICSI rõ nét ở hướng 3 giờ.

- Đưa kim ICSI tiến sát noãn để đầu kim sát màng trong suốt

- Đẩy tinh trùng về phía đầu kim

- Đâm kim vào noãn nhẹ nhàng. Di chuyển kim đến 2/3 đường kính noãn rồi mới hút mạnh bào tương đi vào trong kim ICSI để kích hoạt noãn.

- Nhẹ nhàng đẩy bào tương và tinh trùng vào lại noãn. Quan sát kỹ để đảm bảo tinh trùng đã được đưa vào bào tương noãn và hạn chế lượng môi trường ICSI đưa vào noãn.

- Nhẹ nhàng rút kim ICSI ra khỏi noãn.

- Nhả noãn khỏi kim Holding nhẹ nhàng. Thời gian trung bình để tiêm 1 noãn là khoảng 30 – 40 giây.

4.2.4. Rửa và cấy noãn sau ICSI

- Đĩa ICSI sau khi thao tác xong được chuyển đến bàn ấm.

- Hút các noãn đã được ICSI theo thứ tự và chuyển sang giọt rửa đĩa nuôi cấy để rửa noãn.

- Hút noãn theo đúng thứ tự và phân phối vào từng giọt môi trường nuôi cấy

- Đặt đĩa nuôi cấy vào tủ cấy CO₂ và nồng độ O₂ thấp để nuôi cấy sau tiêm.

PHIẾU NGHIÊN CỨU
Nghiên cứu ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng và kỹ thuật chọn lọc
tinh trùng đến kết quả thụ tinh trong ống nghiệm

STT phiếu:	Mã bệnh viện:
Mã số bệnh án (ID):	Địa chỉ:
Đặc điểm chung	
Họ và tên vợ:	Họ và tên chồng:
Năm sinh vợ:	Năm sinh chồng:
Tuổi vợ: 1. <35 2. ≥ 35	Tuổi chồng: 1. <40 2. ≥ 40
Tiền sử sảy thai:	Thời gian vô sinh:
Tiền sử HTSS: 1. Có 2. Không	Phân loại vô sinh: 1. VS I, 2. VS II
Chiều cao vợ:	Nghề chồng 1.CBVC 2. LĐ/ND 3. Lái xe 4. Khác
Cân nặng vợ:	Hút thuốc: 1. Có 2. Không
BMI vợ:	Uống bia rượu: 1. Có 2. Không
FSH_ngày 2	Chiều cao chồng:
AMH:	Cân nặng chồng:
Nguyên nhân VS: 1.Vợ 2.Chồng 3. Cả hai 4. Không rõ	BMI chồng:
Nguyên nhân VS do vợ	
Do vòi TC: 1. Có 2. Không	Hội chứng buồng trứng đa nang: 1. Có 2. Không
Do tử cung: 1. Có 2. Không	LNMTCT 1. Có 2. Không
Giảm DTBT: 1. Có 2. Không	Tổng số nguyên nhân:
Đặc điểm chỉ số tinh dịch đồ	
pH	Thể tích tinh dịch:
Di động A: Di động B: Di động AB: Di động C: Di động D:	Phân loại di động AB_32% 1. < 32 2. $\geq 32\%$

Mật độ:	Phân loại mật độ 15tr/mL 1. < 15 2. ≥ 15
TL sống:	
Hình dạng bình thường:	Phân loại hình dạng bình thường 4% 1. < 4 2. ≥ 4
Bất thường đầu:	
Bất thường cổ đuôi:	
Phân loại tinh trùng: 1. Bình thường 2. Ít 3. Yếu 4. Dị dạng 5. Ít-Yếu-Dị dạng 6. Ít-Yếu 7. Ít-Dị dạng 8. Yếu-Dị dạng	
Do chồng 1. Có 2. Không	
Đặc điểm phân mảnh DNA tinh trùng	
Quầng lớn:	TL Quầng lớn:
Quầng trung bình:	TL Quầng trung bình:
Quầng nhỏ:	TL Quầng nhỏ
Không quầng:	TL Không quầng:
Thoái hóa:	TL Thoái hóa:
DFI:	Phân loại DFI 15: 1. < 15% 2. 30% > DFI $\geq 15\%$ 3. DFI $\geq 30\%$
Tinh trùng sau lọc rửa	
Mật độ:	Độ di động:
HBA:	
Đặc điểm thụ tinh trong ống nghiệm	
Số noãn:	
Số noãn MII:	Số noãn thụ tinh:
<i>Đặc điểm thụ tinh</i>	
TL thụ tinh	Phân loại TL thụ tinh 75% 1. < 75 2. ≥ 75
<i>Đặc điểm phôi ngày 2</i>	
Tổng phôi ngày 2:	TL phôi ngày 2/thụ tinh:
Số phôi A ngày 2:	TL phôi A ngày 2/ thụ tinh:

Số phôi B ngày 2:	TL phôi B ngày 2/ thụ tinh:
Số phôi C ngày 2:	TL phôi C ngày 2/ thụ tinh:
Tổng phôi AB ngày 2:	TL phôi AB ngày 2/thụ tinh:
TL phôi AB ngày 2/MII:	PL TL phôi AB ngày 2/MII 50%: 1. < 50 2. ≥ 50
Số phôi dưới 4TB:	TL phôi dưới 4TB:
Số phôi 4TB:	TL phôi 4TB:
Số phôi trên 4TB:	TL phôi trên 4TB:
Số phôi có mảnh vỡ < 10%:	TL phôi có mảnh vỡ < 10%:
Số phôi có mảnh vỡ ≥ 10%, < 25%:	TL phôi có mảnh vỡ ≥ 10%, < 25%:
Số phôi có mảnh vỡ > 25%:	TL phôi có mảnh vỡ > 25%:
Đặc điểm phôi ngày 5	
Số phôi nang A ngày 5:	TL phôi A ngày 5/tổng D2:
Số phôi nang B ngày 5:	TL phôi B ngày 5/tổng D2:
Số phôi C ngày 5:	
Tổng số phôi ngày 5:	
Tổng số phôi AB ngày 5:	TL phôi AB ngày 5/tổng D2
TL phôi AB ngày 5/MII:	PL TL phôi AB ngày 5/MII 50%: 1. < 50 2. ≥ 50
TL phôi AB ngày 5/thụ tinh:	
Kết quả chuyển phôi	
Chuyển phôi: 1. Có 2. Không	Số phôi chuyển:
Loại phôi chuyển:	Niêm mạc TC:
βhCG:	βhCG: 1. Có 2. Không
Túi thai: 1. Có 2. Không	Có tim thai: 1. Có 2. Không
Thai diễn tiến: 1. Có 2. Không	

Huế, Ngày tháng năm

Người thu thập

Người hướng dẫn khoa học 1

Học viên

PGS.TS LÊ MINH TÂM

NGUYỄN THỊ HIỆP TUYẾT

Người hướng dẫn khoa học 2

PGS.TS. ĐẶNG CÔNG THUẬN