

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**

Ngành: KHOA HỌC Y SINH
Mã số: 9720101

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HUẾ - 2023

Công trình đã được hoàn thành tại:
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y - DƯỢC, ĐẠI HỌC HUẾ

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. LÊ MINH TÂM
PGS.TS. ĐẶNG CÔNG THUẬN

Phản biện 1: **PGS.TS Hoàng Thị Ngọc Lan**

Phản biện 2: **PGS.TS Lê Lam Hương**

Phản biện 3: **TS. Phạm Chí Không**

Luận án sẽ bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp Đại học, họp tại:
Đại học Huế.

Vào hồi 08 giờ 00 ngày 30 tháng 5 năm 2023

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia.
- Thư viện Trường Đại học Y Dược Huế.

**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**

**Ngành: KHOA HỌC Y SINH
Mã số: 9720101**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HUẾ - 2023

ĐẶT VẤN ĐỀ

Xét nghiệm đo lường mức độ phân mảnh DNA tinh trùng có ý nghĩa trong chẩn đoán, tìm nguyên nhân vô sinh. 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, tuy nhiên, có báo cáo không tìm thấy mối liên quan. Ở Việt Nam, đã có một số nghiên cứu về phân mảnh DNA tinh trùng và chất lượng phôi thực hiện với kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn. Tuy nhiên, với cỡ mẫu nhỏ và chưa có những đánh giá chi tiết về chất lượng của phôi theo từng giai đoạn phát triển.

Chọn lọc tinh trùng sinh lý là kỹ thuật thu nhận tinh trùng trưởng thành dựa trên đặc điểm tại đầu tinh trùng trưởng thành có thụ thể đặc hiệu với acid hyaluronic. 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. Tuy nhiên, hiện nay chưa nhiều nghiên cứu phân tích hiệu quả của kỹ thuật này, ở Việt Nam hiện tại chỉ có 1 nghiên cứu báo cáo về sử dụng môi trường có chứa acid hyaluronic để chọn lọc tinh trùng.

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 và kết quả chuyển phôi? Bên cạnh đó, 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? 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.*

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Nghiên cứu xác định được mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng và một số chỉ số tinh dịch đồ ở nam giới cặp vợ chồng vô sinh tại Việt Nam. Kết quả ghi nhận được một số mối liên quan, tương quan giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và tỉ lệ thụ tinh, đặc điểm phôi phân chia ngày 2, phôi nang.

Đánh giá tác động kỹ thuật chọn lọc tinh trùng dựa trên so sánh sự thụ tinh, phát triển phôi ngày thứ 2, ngày thứ 5 khi thực hiện song song hai kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý để tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (PICSI) và kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn thường quy (ICSI), khi chia đôi số noãn chị em trong mỗi chu kỳ. Đây là nghiên cứu sử dụng đĩa PICSI chuyên dụng thực hiện với chu kỳ noãn chị em. Ở 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.

BỐ CỤC CỦA LUẬN ÁN

Luận án gồm 121 trang:

- Đặt vấn đề	2 trang
- Chương I: Tổng quan tài liệu	42 trang
- Chương II: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu	21 trang
- Chương II: Kết quả nghiên cứu	28 trang
- Chương IV: Bàn luận	25 trang
- Kết luận	2 trang
- Kiến nghị	1 trang

Luận án có 38 bảng, 18 hình, 4 biểu đồ và 173 tài liệu tham khảo gồm 16 tài liệu tiếng Việt, 157 tài liệu tiếng Anh; 5 bài báo liên quan đến đề tài đã được công bố (3 bài báo tiếng Việt và 2 bài báo tiếng Anh)

Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH SẢN NAM GIỚI

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... dựa vào kết quả của một tinh dịch đồ, có thể đánh giá một cách khái quát về khả năng sinh sản của nam giới. Các

đơn vị hỗ trợ sinh sản (HTSS) và các phòng xét nghiệm đánh giá tình dịch đồ dựa theo cẩm nang của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO).

1.1.1. Xét nghiệm tình 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, bao gồm: Đánh giá đại thể bao gồm sự ly giải, độ nhớt, thể tích, pH; Khảo sát vi thể bao gồm độ di động, tỉ lệ sống của tinh trùng, mật độ tinh trùng, hình dạng tinh trùng.

1.1.2. Xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng

Tính toàn vẹn của DNA tinh trùng đóng vai trò quan trọng trong quá trình xử lý thông tin di truyền của người cha vào noãn trong quá trình thụ tinh, phân mảnh DNA là sự đứt gãy chuỗi DNA đơn và chuỗi DNA kép.

Cấu tạo DNA tinh trùng

Tinh trùng người là một đơn vị có tổ chức cao, 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.

Đặc điểm và nguyên nhân phân mảnh DNA tinh trùng

Sự phân mảnh DNA là sự đứt gãy mạch DNA đơn và đôi. Nguyên nhân của phân mảnh DNA tinh trùng là đa yếu tố và được chia thành yếu tố bên trong và bên ngoài. 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: (1) Sự phân mảnh DNA trong quá trình sinh tinh; (2) Chết tế bào theo chương trình không hoàn toàn của tế bào mầm sinh dục; (3) Hậu quả của việc tiếp xúc với các gốc oxy hóa hoạt động.

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

Phương pháp Comet

Phương pháp khảo sát cấu trúc chất nhuộm sắc tinh trùng

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

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

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, 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. Noãn được xem là thụ tinh bình thường khi xuất hiện hai tiền nhân. Thông thường cả hai tiền nhân xuất hiện cùng thời gian trong khoảng 16 – 20 giờ sau khi thụ tinh với noãn trưởng thành.

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. 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 màng của màng trong suốt, độ phát triển của phôi bào, và số lượng nhân tế bào.

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. 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 liên với nhau.

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. 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. 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.

1.3. KỸ THUẬT CHỌN LỌC TINH TRÙNG

Acid hyaluronic có trong phức hợp tế bào hạt xung quanh noãn, chỉ những tinh trùng trưởng thành, đã hoàn tất quá trình tái sắp xếp các cấu trúc chức năng mới có thụ thể với acid hyaluronic ở màng bào tương đầu tinh trùng. Do đó khi tinh trùng gắn được với phức hợp tế bào hạt quanh noãn mới có thể trải qua được những bước tiếp theo của quá trình thụ tinh tự nhiên. Hiện tại, một số phương pháp chọn lọc tinh trùng tiên tiến đã được phát triển để 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 sẽ dùng để thực hiện ICSI (gọi là kỹ thuật chọn lọc tinh trùng sinh lý thực hiện ICSI - Physiological ICSI).

Các tác giả Huszar và cộng sự, 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 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. Do đó, 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.

Thực hiện lựa chọn tinh trùng dựa trên khả năng gắn kết của tinh trùng với acid hyaluronic ở các vị điểm acid hyaluronic trên bề mặt đĩa PICSI, 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. 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.

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 thể giới

Đánh giá về mối liên quan giữa phân mảnh DNA và chỉ số tinh trùng tác giả Sivanarayana và cộng sự (2014) báo cáo số lượng tinh

trùng trung bình cao hơn đáng kể ở nhóm DFI < 30%. Di động tiến tới nhanh và tiến tới chậm ở nhóm DFI < 30% cao hơn đáng kể so với nhóm DFI ≥ 30%, lần lượt là ($21,40 \pm 11,53$ so với $13,58 \pm 11,31$) ($31,23 \pm 14,97$ so với $22,37 \pm 12,70$) ($p < 0,001$). Tỷ lệ hình dạng tinh trùng bất thường ở nhóm DFI < 30% ít hơn so với nhóm DFI ≥ 30%: ($90,06 \pm 7,12$ so với $92,90 \pm 5,55$) ($p < 0,001$).

Tác giả Borges và cộng sự (2019) sử dụng kỹ thuật phân tán chất nhuộm sắc có kết quả tỷ lệ nam giới có DFI ≥ 30% là 8,84%. Nhóm DFI < 30% có tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới cao hơn so với nhóm DFI ≥ 30% ($54,90 \pm 14,27\%$ so với $46,50 \pm 16,77\%$, $p < 0,001$).

Nghiên cứu tại Việt Nam

Ở Việt Nam, tác giả Lê Minh Tâm (2019), đánh giá 318 nam giới thuộc các cặp vợ chồng hiếm muộn tại trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế. Kết quả ghi nhận mức độ phân mảnh tinh trùng tương quan dương với tỷ lệ bất thường đầu của tinh trùng ($r = 0,202$, $p = 0,0003$) và tương quan âm với khả năng di động tiến tới ($r = -0,168$, $p = 0,0027$).

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 tinh trùng. 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 ($r = -0,26$, $p = 0,02$), tỷ lệ sống của tinh trùng ($r = -0,32$ và $p < 0,001$).

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

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, kết quả có mối tương quan nghịch ($r = -0,5$) giữa mức độ phân mảnh DNA và tỷ lệ tạo phôi nang, tuy nhiên, tỷ lệ thụ tinh không bị ảnh hưởng. Sự phân mảnh DNA tinh trùng có tương quan nghịch với tỷ lệ phôi nang và tỷ lệ có thai ngay cả ở nồng độ chất lượng tốt. Kết quả của nhóm tác giả Zheng và cộng sự năm 2018, so sánh giữa các nhóm DFI ≤ 10%, 11 - 20% và > 20%: mặc dù tỷ lệ thụ tinh đều duy trì khoảng trên 75% ở cả 3 nhóm, tuy nhiên, tỷ 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%).

Nghiên cứu tại Việt Nam

Nhóm tác giả Nguyễn Minh Tài Lộc và cộng sự (2016), nghiên cứu phân mảnh DNA tinh trùng đo bằng phương pháp khảo sát cấu

trúc nhiễm sắc chất. Kết quả 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 ≤ 15% (91% so với 84%; $p=0,03$). Không tìm thấy sự tương quan có ý nghĩa thống kê giữa chỉ số DFI và chất lượng phôi. Nghiên cứu tác giả Nguyễn Thị Quỳnh Tiên và cộng sự năm 2018, đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng được đo bằng phương pháp khảo sát độ phân tán nhiễm sắc chất và kết quả ICSI. Kết quả 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.

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 Parmegiani và cộng sự năm 2010 báo cáo tỉ lệ tạo phôi chung ở nhóm PICSI (sử dụng môi trường hyaluronic acid-based SpermSlow) cao hơn ($95,0 \pm 0,8$) so với nhóm ICSI ($84,0 \pm 1,1$, $p < 0,001$). Tỉ lệ phôi chất lượng tốt nhất trong nhóm PICSI cao hơn so với trong nhóm ICSI (35,8% vs 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.

Tác giả Choe và cộng sự (2012) đánh giá trên 219 noãn từ 18 phụ nữ thực hiện chia đôi số noãn PICSI ($n = 107$)/ ICSI ($n = 112$). Kết quả tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ phôi ngày 2 ghi nhận ở PICSI thấp hơn so với nhóm ICSI, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tỉ lệ phôi ngày thứ 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.

Tại Việt Nam

Nghiên cứu của nhóm tác giả Lê Thụy Hồng Khả, 350 chu kỳ sử dụng môi trường acid hyaluronic, so sánh với 350 chu kỳ ICSI thường quy. Kết quả không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm về tỉ lệ thụ tinh, số phôi tốt. Tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ làm tổ của PICSI không khác biệt so với ICSI. Nhóm PICSI có tỉ lệ thai diễn tiến cao hơn nhóm ICSI sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê.

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) và 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

- 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 thông tin về lâm sàng, cận lâm sàng, xét nghiệm tinh dịch đồ, xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng.

- Kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm: bằng kỹ thuật ICSI, có kết quả theo sự thụ tinh, sự phát triển của phôi ngày 2, ngày 5/ngày 6, kết quả chuyển phôi nang (nếu có).

Mục tiêu 2

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

- Người chồng: đầy đủ thông tin về lâm sàng, cận lâm sàng, xét nghiệm tinh dịch đồ, xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng.

- Kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm: bằng kỹ thuật PICSI và ICSI, có kết quả theo sự thụ tinh, sự phát triển của phôi ngày 2, ngày 5/ngày 6.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

Mục tiêu 1

- Người chồng bị giãn tĩnh mạch thừng tinh, nhiễm trùng tiết niệu sinh dục, xuất tinh ngược dòng, hoặc có tiền sử phẫu thuật giãn tĩnh mạch thừng 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; bệnh nhân có số lượng tinh trùng rất thấp (dưới 1 triệu /mL) hoặc không có tinh trùng.

- Các chu kỳ có xin tinh trùng hiến tặng, xin noãn hiến tặng.

- Các trường hợp nuôi cấy phôi không đánh giá giai đoạn phôi ngày 2 và phôi nang.

Mục tiêu 2

- Người chồng: tiêu chuẩn loại trừ như mục tiêu 1, ngoài ra bệnh nhân có số lượng tinh trùng rất thấp (dưới 5 triệu /mL).
- Các chu kỳ có xin tinh trùng hiến tặng, xin noãn hiến tặng.
- Trường hợp số noãn thu nhận < 10.
- Các trường hợp không đánh giá giai đoạn phôi ngày 2 và phôi nang.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ CỖ MẪU

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Mục tiêu 1:

- Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang
- Cỡ mẫu nghiên cứu: theo công thức tính cỡ mẫu cho nghiên cứu mô tả cắt ngang. 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, 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

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

Người vợ

- Tuổi, chỉ số khối cơ thể
- Đặc điểm vô sinh, nguyên nhân vô sinh
- Đặc điểm nội tiết và noãn

Người chồng

- Tuổi, chỉ số khối cơ thể, thói quen: thuốc lá, uống bia, rượu

Biến số, chỉ số tinh dịch đồ, phân mảnh DNA tinh trùng

Các chỉ số tinh trùng (theo hướng dẫn của WHO 2010)

Phân mảnh DNA tinh trùng

- Chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng: DFI
 - + $DFI < 15\%$: Mức độ thấp
 - + $15\% \leq DFI < 30\%$: Mức độ trung bình
 - + $DFI \geq 30\%$: Mức độ cao

Tình trạng gắn kết acid hyaluronic

- Chỉ số tinh trùng gắn kết hyaluronic acid
- Phân nhóm mức độ gắn kết HBA $\leq 60\%$, HBA $> 60\%$

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

Mục tiêu 1

- Số noãn trưởng thành
- Tỷ lệ thụ tinh (%)
- Kết quả hình thành phôi phân chia ngày 2
 - + Tỷ lệ phôi phân chia ngày 2 (%)
 - + Tỷ lệ phôi phân chia độ 1 (%)
 - + Tỷ lệ phôi hữu dụng ngày 2/hợp tử (%)
 - + Tỷ lệ phôi hữu dụng ngày 2/noãn MII (%)
 - + Tỷ lệ phôi < 4 tế bào, 4 tế bào, > 4 tế bào (%)
 - + Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương 0 -< 10% , 10% ≤ Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương ≤ 25%, >25%
- Kết quả hình thành phôi nang:
 - + Tỷ lệ tạo phôi nang/phôi ngày 2 (%)
 - + Tỷ lệ tạo phôi nang độ 1/ phôi ngày 2 (%)
 - + Tỷ lệ tạo phôi nang /hợp tử (%)
 - + Tỷ lệ tạo phôi nang/ noãn MII (%)
- Kết quả chuyển phôi
 - + Số phôi chuyển, độ dày niêm mạc tử cung (mm)
 - + βhCG, túi thai, thai phát triển ≥12 tuần: có/không

Mục tiêu 2

- Số noãn MII, 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 ở PICSI – ICSI
- Số phôi có mảnh vỡ bào tương < 10%, số phôi có 10% ≤ mảnh vỡ bào tương ≤ 25%, số phôi có mảnh vỡ bào tương > 25% ở PICSI – ICSI
- Số phôi nang 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:

Thăm khám lâm sàng, cận lâm sàng

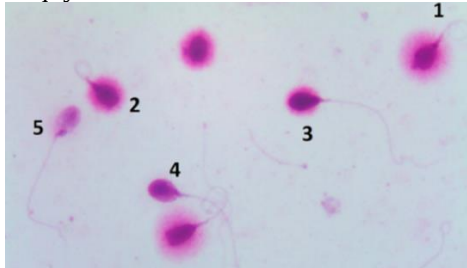
Xét nghiệm tinh dịch đồ, phân mảnh DNA tinh trùng

Xét nghiệm tinh dịch đồ

Theo hướng dẫn của WHO 2010

Xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng

Hóa chất và dụng cụ: Bộ kit Halosperm. Mẫu tinh dịch sau khi thu nhận và được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất Kit Halosperm, theo quy trình của nhà sản xuất.



Hình 2.2. Hình ảnh tinh trùng trong xét nghiệm phân tán chất nhuộm sắc

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 tính DFI:

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

Thực hiện các kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm

- Kích thích buồng trứng và chọc hút noãn
- Kỹ thuật lọc rửa tinh trùng chuẩn bị cho thụ tinh trong ống nghiệm
- Thụ tinh trong ống nghiệm: ICSI
- Kỹ thuật PICSI – Chọn lọc tinh trùng
- Đánh giá thụ tinh và phát triển của phôi: Theo đồng thuận Alpha (2011)
- Chuyển phôi và theo dõi sau chuyển phôi

2.2.4. Phân tích và xử lý số liệu

- Số liệu được nhập liệu và phân tích trên phần mềm SPSS 20.0, đảm bảo tính chính xác.

- Đánh giá mối tương quan giữa DFI và chỉ số tinh trùng, giữa DFI và kết quả phôi bằng kiểm định Pearson. So sánh giá trị trung bình giữa 2 nhóm phân loại bằng kiểm định Independent Sample Test. So sánh giá trị trung bình giữa 3 nhóm bằng kiểm định Anova. So sánh tỉ lệ các biến số giữa hai nhóm PICSI 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.

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.

3.1.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

3.1.1.1. Đặc điểm người vợ

Tuổi trung bình của người vợ trong độ tuổi sinh sản, người vợ lớn tuổi (≥ 35 tuổi) chiếm tỉ lệ 26,4%. Số noãn trưởng thành thu nhận được trung bình ở mỗi chu kỳ ICSI là $12,02 \pm 7,29$.

3.1.1.2. Đặc điểm người chồng

Độ tuổi trung bình của người chồng là $35,57 \pm 5,24$. Mức độ phân mảnh DNA tinh trùng trung bình là $23,65 \pm 13,80$ %. Các mức độ phân mảnh DNA tinh trùng với DFI thấp ($DFI < 15\%$), trung bình ($15\% \leq DFI < 30$) và cao ($DFI \geq 30\%$) có tỉ lệ lần lượt là: 27,7%, 47,9%, và 24,4%.

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 (10^6 /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	

Có sự khác nhau về độ pH, khả năng di động, mật độ, tỉ lệ sống, bất thường cổ đuôi tinh trùng giữa 3 nhóm mức độ DFI.

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	0,00

Có mối tương quan nghịch yếu giữa độ pH của tinh dịch, tỉ lệ tinh trùng sống; hình dạng bình thường với DFI.

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	12,33± 7,49	11,78± 6,91	12,12± 7,88	0,88
Tỉ lệ thụ tinh (%)	72,59± 17,64	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 hợp tử	95,98± 9,32	97,32± 5,56	94,73± 11,41	96,92± 7,87	0,13
Tỉ lệ phôi phân chia độ 1 /hợp tử	65,35± 25,10	67,94 ±23,82	64,77± 29,51	63,57± 29,51	0,59
Tỉ lệ phôi hữu dụng /hợp tử	81,05± 21,40	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	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	24,68± 22,77	21,81± 22,47	20,66± 24,10	0,58
Tỉ lệ phôi 4 tế bào	59,16± 26,29	54,88± 26,42	61,65± 25,88	59,14± 26,79	0,25
Tỉ lệ phôi > 4 tế bào	18,75± 19,89	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	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	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	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 ± 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 ± 22,21%) có giá trị thấp nhất, p = 0,77. Nhóm DFI ≥ 30% có tỉ lệ phôi có mảnh vỡ bào tương mức độ cao > 25% là cao nhất với 6,11±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 /hợp tử	- 0,07	0,30
Tỉ lệ tạo phôi hữu dụng /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 DFI và tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi hữu dụng ngày 2/noãn MII, tỉ lệ mảnh vỡ bào tương < 10% và tương quan thuận yếu với tỉ lệ mảnh vỡ bào tương >25%

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 Kết quả phôi	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

Nhóm DFI ≥30% có tỉ lệ hình thành phôi nang/noãn MII thấp nhất, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p=0,11).

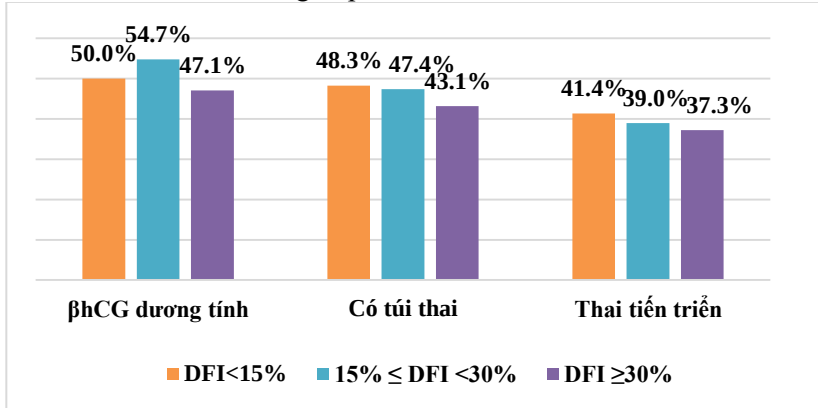
Bảng 3.16. Mối tương quan giữa DFI và kết quả phôi nang nang

Đặc điểm phôi nang	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

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

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%.



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 ≥ 30% thấp nhất trong 3 nhóm.

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 thu nhận được 74 cặp vợ chồng vô sinh đáp ứng được tiêu chuẩn lựa chọn.

3.3.1. Đặc điểm mẫu tinh trùng

Sau lọc rửa: mật độ tinh trùng đạt $23,96 \pm 8,88.10^6/\text{mL}$, di động tiến tới $83,96 \pm 9,94\%$, chỉ số gắn kết HBA trung bình là $48,16 \pm 28,99\%$, trong đó số mẫu gắn kết acid hyaluronic thấp HBA ≤ 60% chiếm ưu thế với 58,1%.

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% ≤ Mạch 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%, $p = 0,003$.

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 ống 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

Nghiên cứu ghi nhận giá trị DFI trung bình của người nam giới cặp vợ chồng vô sinh 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: Dương Thị Nhân (2020), $21,58 \pm 15,53 \%$ và Hồ Mạnh Tường (2021), $19,16 \pm 13,68 \%$. 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. Tỷ lệ nam giới có DFI $\geq 30\%$ trong nghiên cứu này là 24,4%; tỷ lệ nam giới có DFI $\geq 30\%$ chiếm khoảng 19 – 25% cũng được báo cáo trong các nghiên cứu ở Việt Nam.

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

pH, thể tích tinh dịch, mật độ

Trong nghiên cứu của chúng tôi giá trị trung bình của pH 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. 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 ($r = -0,21$, $p = 0,001$). 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 ($p = -0,347$, $p < 0,05$), 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.

Sự khác nhau về thể tích tinh dịch giữa các nhóm mức độ phân mảnh DNA tinh trùng, kết quả quan sát thấy ở những mẫu có DFI $\geq 30\%$ có thể tích tinh dịch ít hơn so với mẫu có DFI $< 30\%$, và không có mối tương quan giữa DFI và thể tích tinh dịch. Đa số các nghiên cứu đều không thấy có mối liên quan giữa thể tích và DFI.

Kết quả 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 $p = 0,03$. Tuy nhiên, không ghi nhận mối tương quan giữa hai chỉ /số này. Một số nghiên cứu khác có ghi nhận mối tương quan chặt chẽ giữa phân mảnh DNA tinh trùng và mật độ: Osaka A (2022) ghi nhận mối tương quan nghịch giữa DFI và mật độ tinh trùng với $r = -0,416$, $p < 0,001$. Nghiên cứu của Dương Thị Nhân, có mối tương quan nghịch với $r = -0,26$, $p = 0,02$; nhóm mật độ $< 15.10^6$ / mL có DFI là $26,66 \pm 18,77\%$, nhóm $\geq 15.10^6$ /mL có DFI là $19,43 \pm 13,46\%$, $p = 0,008$.

Độ di động tinh trùng

Mối liên quan về độ di động và phân mảnh DNA tinh trùng cũng được báo cáo trong nhiều nghiên cứu: 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). Nghiên cứu tại Việt Nam của tác giả Hồ Mạnh Tường cũng ghi nhận DFI tương quan nghịch với độ di động của tinh trùng ($r = -0,477$, $p < 0,001$). 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 $43,21 \pm 15,11\%$, $p < 0,001$). 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. Có thể thấy rằng, những mẫu có độ di động tốt thì tinh trùng ít phân mảnh DNA. Những minh chứng này cho thấy 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

Khi phân tích tương quan thì 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 $r = 0,23$, $p = 0,00$. Các nghiên cứu gần đây cũng ghi nhận mối tương quan, báo cáo của tác giả Osaka A (2022) có tương quan nghịch giữa DFI và hình dạng tinh trùng bình thường với $r = -0,378$, $p < 0,001$; Tác giả Muriel và cộng sự chỉ ra mối tương quan nghịch giữa DFI và hình dạng tinh trùng ($r = -0,29$, $p = 0,04$). Nam giới có tinh trùng dị dạng nhiều gia tăng chất oxy hóa, DNA biến tính và DNA phân mảnh cao hơn đáng kể. 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. 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.

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

Kết quả thụ tinh

Kết quả 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. Nghiên cứu của Oleszczuk K (2016) báo cáo không ghi nhận sự ảnh hưởng của DFI với kết quả thụ tinh ở kỹ thuật ICSI mặc dù kết quả phân tích 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 $DFI > 30\%$ ($p > 0,05$).

Nghiên cứu của Xue LT (2016) ghi nhận 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 trong các chu kỳ IVF. 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 ($r = -0,20$, $p = 0,002$). Nghiên cứu của tác giả Nguyễn Minh Tài Lộc cũng ghi nhận mối tương quan nghịch với $r = -0,28$; $p = 0,02$. Ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng tác động giai đoạn sớm ở quá trình thụ tinh, 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 có thai tự nhiên.

Phôi phân chia ngày 2

Trong nghiên cứu này, chưa ghi nhận sự ảnh hưởng rõ rệt của phân mảnh DNA đến kết quả của phôi giai đoạn phân chia ngày 2. Tuy nhiên, có ghi nhận thấy mối tương quan nghịch yếu giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và tỉ lệ tạo phôi hữu dụng ngày 2/noãn MII ($r = -0,16$, $p = 0,01$). Tác giả Nguyễn Thị Quỳnh Tiên thấy rằng tỉ lệ tạo phôi ngày 3 là tỷ lệ giữa số phôi ngày 3 trong tổng số hợp tử kết quả ghi nhận không tìm thấy mối tương quan giữa tỷ lệ tạo phôi

ngày 3 và chỉ số DFI ($r = 0,16$, $p = 0,53$), với cách tính tỉ lệ này chúng tôi cũng không ghi nhận được mối tương quan ($r = 0,01$, $p = 0,87$), nhưng với cách tính tỉ lệ phôi trên tổng số noãn MII thì chúng tôi lại ghi nhận được mối tương quan nghịch yếu giữa DFI và tỉ lệ phôi hữu dụng ngày 2/ noãn MII ($r = - 0,16$, $p = 0,01$).

Phân mảnh DNA tinh trùng 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), 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 $DFI < 30\%$. Kết quả của nghiên cứu cho thấy phân mảnh DNA tinh trùng không ảnh hưởng đến tốc độ phân chia phôi khi quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược, tuy nhiên phân mảnh DNA ảnh hưởng đến sự xuất hiện mảnh vỡ bào tương phôi bào. Ở nhóm $DFI \geq 30\%$, tỉ 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. 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 $< 10\%$ và tương quan thuận với tỉ lệ mảnh vỡ bào tương $> 25\%$. Năm 2017, nghiên cứu của Alvarez Sedo C và cộng sự ghi nhận kết quả 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%, $p < 0,05$). Những phôi bào được hình thành từ mẫu 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.

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

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%, $p = 0,35$). Với nghiên cứu của chúng tôi, không quan sát được sự khác biệt có ý nghĩa giữa ba nhóm DFI, và cũng không thấy mối tương quan; tuy nhiên khi đánh giá tỉ lệ phôi nang/noãn MII, mặc dù không có sự khác biệt nhưng quan sát thấy mối tương quan nghịch yếu với $r = - 0,15$, $p = 0,02$.

Ngoài ra, chúng tôi ghi nhận nhóm tỉ lệ tạo phôi nang/MIII $< 50\%$, có mức độ phân mảnh DNA tinh trùng xu hướng cao hơn so với

nhóm $\geq 50\%$ ($p = 0,06$). Phân tích tổng hợp của Adiga PK và cộng sự (2021) cũng 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 ICSI. Nhưng đã cho thấy sự gia tăng tỉ lệ phôi nang khi thực hiện IVF, tỉ lệ xuất hiện cao hơn trong kỹ thuật IVF 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.

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

Kết quả của chúng tôi không có sự ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng tới kết quả lâm sàng, có túi thai, và thai tiến triển, mặc dù vậy đều quan sát thấy tỉ lệ các giá trị 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. Ảnh hưởng của DFI đối với kết quả lâm sàng trong HTSS hiện nay chưa được thể rõ. Cissen và cộng sự đã phân tích 30 nghiên cứu để đánh giá giá trị của phân mảnh DNA tinh trùng trong việc dự đoán khả năng mang thai với 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 mang thai trong HTSS rất hạn chế. Kết quả sau chuyển phôi còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố của người phụ nữ về nội tiết, niêm mạc tử cung....

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

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

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 ở nhóm PICSI cao hơn nhóm ICSI nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê: 61,99% so với 58,10%, $p = 0,26$. Kết quả này được cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Majumdar G và Majumdar A (2013): 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%, $p = 0,460$). Choe S.A. và

cộng sự (2012) sử dụng môi trường chứa acid hyaluronic, chia đôi số noãn cho kết quả PICSI không cải thiện rõ tỉ lệ thụ tinh và tạo phôi so với ICSI: 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, tỉ lệ phôi phân chia ngày 3 thấp hơn đáng kể ở nhóm PICSI (56,0% so với 69,6%, $p = 0,038$).

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%, $p = 0,712$). Dữ liệu báo cáo của tác giả Kirkman-Brown: 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%).

Có một số nguyên nhân giải thích cho kết quả chưa thực sự hiệu quả của kỹ thuật chọn lọc tinh trùng: kỹ thuật thu nhận tinh trùng lên khỏi mặt đĩa PICSI tại vị điểm acid hyaluronic là cơ học nâng tinh trùng dính khỏi đĩa PICSI dẫn đến nguy cơ làm tổn thương màng bào tương phía đầu của tinh trùng từ đó có thể ảnh hưởng đến kết quả phôi. Mặt khác, trong quá trình chọn lọc tinh trùng 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.

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. 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.

1.1. Mối 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 có độ phân mảnh DNA mức 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 nhóm phân mảnh DNA mức thấp di động tiến tới cao nhất ($p = 0,05$).
- Mật độ tinh trùng trong nhóm DFI $\geq 30\%$ là thấp nhất ($p = 0,03$).
- Có mối tương quan nghịch yếu $r = -0,13$, $p = 0,04$ giữa DFI và hình dạng bình thường.

1.2. Mối 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.

- Tỉ lệ hình thành phôi nang nở kỹ thuật PICSI có xu hướng cao hơn ICSI, tuy nhiên không có ý nghĩa thống kê. Ở 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.

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.