

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC MỞ HÀ NỘI



LUẬN VĂN ĐỒ ÁN THẠC SĨ

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã ngành: 8420201

**Đề tài: NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG
ĐÔNG ĐẾN CHẤT LƯỢNG TINH TRỪNG ĐÔNG LẠNH
SỐ LƯỢNG ÍT BẰNG CRYOTOP**

HỌC VIÊN THỰC HIỆN: CAO XUÂN NGỌC

HƯỚNG DẪN KHOA HỌC : TS. ĐINH THỊ THU LÊ

Hà Nội, tháng 5 năm 2026

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC MỞ HÀ NỘI



LUẬN VĂN ĐỒ ÁN THẠC SĨ

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã ngành: 8420201

**Đề tài: NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG
ĐÔNG ĐẾN CHẤT LƯỢNG TINH TRỪNG ĐÔNG LẠNH
SỐ LƯỢNG ÍT BẰNG CRYOTOP**

HỌC VIÊN THỰC HIỆN: CAO XUÂN NGỌC

HƯỚNG DẪN KHOA HỌC : TS. ĐINH THỊ THU LÊ

Hà Nội, tháng 5 năm 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Cao Xuân Ngọc, học viên cao học khóa 23-25, Trường Đại học Mở Hà Nội, chuyên ngành Công nghệ sinh, xin cam đoan:

1. Luận văn này do chính tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của TS. Đinh Thị Thu Lê.
2. Nội dung nghiên cứu của luận văn không trùng lặp với bất kỳ công trình nghiên cứu nào đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu, tài liệu và thông tin sử dụng trong nghiên cứu đều bảo đảm tính chính xác và trung thực.

Hà Nội, ngày 28 tháng 05 năm 2026.

Học viên

Cao Xuân Ngọc

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, em xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới các thầy cô giáo và các cán bộ thuộc Viện Công nghệ sinh học và công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Mở Hà Nội đã tạo điều kiện thuận lợi để em hoàn thành luận văn này.

Em xin gửi lời cảm ơn chân thành tới TS. Đinh Thị Thu Lê cùng các thầy cô trong viện đã tận tình chỉ bảo, định hướng và đóng góp nhiều ý kiến quý báu giúp em hoàn thiện đề tài nghiên cứu.

Em xin chân thành cảm ơn các anh, chị cán bộ công tác tại trung tâm hỗ trợ sinh sản Bệnh Viện phụ sản An Thịnh đã nhiệt tình hỗ trợ và tạo điều kiện cho em trong quá trình thực hiện đề tài.

Em cũng xin gửi lời cảm ơn tới gia đình, bạn bè và người thân đã luôn động viên, khích lệ và là nguồn động lực tinh thần to lớn để em yên tâm học tập và nghiên cứu.

Trong quá trình thực hiện luận văn em kính mong nhận được sự góp ý của các thầy cô và các bạn để em có thể tiếp tục hoàn thiện những phần còn thiếu sót.

Em xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 28 tháng 05 năm 2026.

Học viên

Cao Xuân Ngọc

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC BẢNG.....	vii
DANH MỤC HÌNH.....	viii
MỞ ĐẦU.....	1
1. Tính cấp thiết của đề tài.....	1
2. Mục tiêu của đề tài.....	2
3. Nội dung nghiên cứu.....	2
PHẦN I. TỔNG QUAN.....	4
1.1 Bảo quản tinh trùng số lượng ít.....	4
1.1.1 Khái niệm về bảo quản tinh trùng số lượng ít trong HTSS.....	4
1.1.2 Nguyên lý và các phương pháp bảo quản tinh trùng.....	5
1.1.3 Ảnh hưởng của quá trình đông rã đến chất lượng tinh trùng.....	5
1.2 Vai trò của dụng cụ chứa.....	7
1.2.1 Giới thiệu về các dụng cụ chứa tinh trùng số lượng ít.....	7
1.2.2 Ứng dụng của cryotop trong bảo quản tinh trùng số lượng ít.....	8
1.3 Vai trò của chất bảo vệ đông lạnh (CPA).....	10
1.3.1 Nguồn gốc và lịch sử phát triển của CPA trong hỗ trợ sinh sản.....	10
1.3.2 Phân loại chất bảo vệ đông lạnh (CPA).....	11
1.4 Phương pháp thu tinh trùng từ chọc hút màng tinh (PESA).....	13
1.4.1 Giới thiệu về kỹ thuật PESA.....	13
1.4.2 Quy trình thực hiện kỹ thuật PESA.....	14
1.5 Phương pháp thu tinh trùng từ phẫu thuật trích tinh hoàn (TESE).....	15
1.6 Tình hình nghiên cứu trong nước và trên thế giới.....	16
1.6.1 Nghiên cứu trong nước.....	16
1.6.2 Nghiên cứu trên thế giới.....	16

PHẦN II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.1 Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu	18
2.1.1 Đối tượng.....	18
2.1.2 Tiêu chuẩn loại trừ.....	18
2.1.3 Địa điểm và thời gian nghiên cứu.....	18
2.2 Vật liệu nghiên cứu.....	18
2.2.1 Vật tư, thiết bị dùng trong nghiên cứu	18
2.2.2 Hóa chất.....	19
2.3 Phương pháp nghiên cứu.....	19
2.3.1 Xét nghiệm tinh dịch đồ	20
2.3.2 Quy trình thu hồi và xử lý mẫu tinh trùng thu được từ mào tinh (PESA) trước khi đông lạnh.....	22
2.3.2 Quy trình thu và xử lý mẫu tinh trùng thu được từ phẫu thuật trích tinh hoàn (TESE).....	24
2.3.4 Quy trình đông lạnh tinh trùng số lượng ít.....	26
2.3.5 Quy trình rã đông tinh trùng số lượng ít.....	26
2.3.6 Đánh giá tỷ lệ thu hồi và tỷ lệ sống của tinh trùng sau rã đông	27
2.4 Nội dung nghiên cứu	28
2.5 Phương pháp thống kê.....	29
PHẦN III. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN.....	31
3.1 Kết quả nghiên cứu.....	31
3.1.1 Kết quả nhóm 1 (sử dụng Glycerol).....	31
3.1.2 Kết quả nhóm 2 (sử dụng Sucrose).....	34
3.1.3 Kết quả nhóm 3 (sử dụng Glycerol và Sucrose với tỷ lệ 1:1).....	35
3.1.4 Kết quả nhóm 4 (sử dụng Glycerol và Sucrose với tỷ lệ 0.5:1).....	37
3.2 Phân tích yếu tố liên quan đến tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng sau rã đông.....	39
3.2.1 Ảnh hưởng của chất lượng tinh trùng thu được từ chọc hút mào tinh PESA	40
3.2.2 Ảnh hưởng của chất lượng tinh trùng thu được từ trích xuất tinh hoàn TESE.....	40

3.2.3 Ảnh hưởng của chất bảo vệ đông lạnh chứa CPA ngoại bào (Sucrose) và CPA nội bào (Glycerol).....	41
3.2.4. Phân tích đồng thời tỷ lệ thu hồi và tỷ lệ sống sau rã đông.....	43
3.2.5. Bàn luận về vai trò của tỷ lệ phối hợp Glycerol và Sucrose	46
PHẦN IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	48
4.1 Kết luận	48
4.2. Kiến nghị.....	48
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	50

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ART	Assisted Reproductive Technology	Hỗ trợ sinh sản
TESE	Testicular Sperm Extraction	Phẫu thuật rạch bìu lấy tinh trùng trực tiếp từ tinh hoàn
PESA	Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration	Phương pháp chọc hút tinh trùng từ mào tinh qua da
BN	Patient	Bệnh nhân
DNA	Axit Deoxyribonucleic	Vật liệu di truyền của tế bào
IVF	In vitro fertilization	Thụ tinh trong ống nghiệm
CPA	Cryoprotective Agent	Chất bảo vệ đông lạnh
ICSI	Intra-Cytoplasmic Sperm Injection	Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1 Vật tư, thiết bị dùng trong nghiên cứu.....	25
Bảng 2.2 Môi trường dùng trong nghiên cứu.....	26
Bảng 2.3 Chỉ tiêu đánh giá theo tiêu chuẩn của WHO 2010.....	27
Bảng 3.1 Ảnh hưởng của Glycreol đến tỷ lệ thu hồi và sống của hai loại tinh trùng PESA, TESE.....	30
Bảng 3.2 Ảnh hưởng của Sucrose đến tỷ lệ thu hồi và sống của hai loại tinh trùng PESA, TESE.....	30
Bảng 3.3 Ảnh hưởng của Glycreol và Sucrose với tỷ lệ 1:1 đến tỷ lệ thu hồi và sống của hai loại tinh trùng PESA, TESE.....	30
Bảng 3.4 Ảnh hưởng của Glycreol và Sucrose với tỷ lệ 0.5:1 đến tỷ lệ thu hồi và sống của hai loại tinh trùng PESA, TESE.....	31

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1 Hình ảnh dụng cụ chứa cryotop [26].....	19
Hình 1.2 Vai trò của chất bảo vệ đông lạnh lên tế bào [29].....	21
Hình 1.3 Mô tả quy trình thu tinh trùng từ mẫu PESA.....	24
Hình 2.1 Mẫu tinh trùng thu nhận từ PESA (Nguồn: IVFMD).....	33
Hình 2.2 Hình ảnh các ống sinh tinh ghi nhận khi thực hiện Micro-TESE.....	35
Hình 2.3 Tinh trùng dương tính với HOST	37
Hình 2.4 Quy trình nghiên cứu.....	40
Hình 3.1 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng PESA.....	42
Hình 3.2 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng TESE.....	42
Hình 3.3 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng PESA.....	44
Hình 3.4 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng TESE.....	44
Hình 3.5 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng PESA.....	45
Hình 3.6 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng TESE.....	46
Hình 3.7 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng PESA.....	47
Hình 3.8 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng TESE.....	48

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Trong thời gian gần đây, cùng với sự tiến bộ nhanh chóng của những kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (ART), nhu cầu lưu trữ tinh trùng ngày càng gia tăng, nhất là trong các tình huống tinh trùng có số lượng rất thấp hoặc thu được từ các can thiệp xâm lấn như sinh thiết mô tinh hoàn (TESE, micro-TESE) hoặc chọc hút mào tinh (PESA, MESA) [1, 2]. Đối với nhóm đối tượng này, từng tinh trùng thu nhận được đều mang ý nghĩa rất quan trọng, việc mất mẫu hoặc suy giảm chất lượng của tinh trùng trong giai đoạn đông lạnh - rã đông có thể làm mất hoàn toàn cơ hội sinh con sinh học của bệnh nhân [3].

Quá trình đông lạnh và rã đông tinh trùng được xem là một kỹ thuật phức tạp, trong đó giai đoạn rã đông có ý nghĩa then chốt đối với sự phục hồi hình thái và khả năng vận động cùng khả năng tham gia thụ tinh của tinh trùng sau bảo quản. Các nghiên cứu cho thấy ở những BN có số lượng tinh trùng rất hạn chế hoặc tinh trùng được lấy qua phẫu thuật tinh hoàn thì các tế bào tinh trùng dễ bị tác động mạnh bởi sự thay đổi nhiệt độ, áp suất thẩm thấu và ảnh hưởng của stress oxy hóa trong suốt quá trình đông rã [4, 5]. Việc lựa chọn và kiểm soát các điều kiện rã đông không phù hợp có thể khiến tổn thương màng tế bào gia tăng, ty thể, DNA của tinh trùng, dẫn đến giảm tỷ lệ sống và tác động bất lợi đến kết quả thụ tinh trong các chu kỳ ICSI [6,7].

Dù đã có các công trình hướng trọng tâm vào kỹ thuật đông nhanh và hóa kính cho tinh trùng số lượng ít, song các nghiên cứu chuyên sâu về ảnh hưởng của các điều kiện rã đông (như vận tốc rã, mức nhiệt khi rã, loại môi trường rã đông, thời lượng tiếp xúc với cryoprotectant) đối với chất lượng tinh trùng sau lưu trữ vẫn còn hạn chế, nhất là trong bối cảnh thực hành lâm sàng tại các trung tâm hỗ trợ sinh sản ở Việt Nam [8]. Trong thực tiễn, các phòng lab IVF hiện nay vẫn áp dụng các quy trình rã đông khác nhau cho việc đông rã tinh trùng số lượng ít.

Việc tối ưu hóa điều kiện đông rã không chỉ góp phần nâng cao khả năng sống sót và chất lượng của tinh trùng sau khi rã đông, mà còn giúp giảm thiểu nguy cơ mất mẫu, tiết kiệm chi phí, giảm thời lượng thao tác và cải thiện hiệu quả điều trị cho bệnh

nhân. Điều này có ý nghĩa đặc biệt trong bối cảnh quy mô bệnh nhân vô sinh nam có xu hướng tăng lên và yêu cầu cá thể hóa phác đồ điều trị ngày càng được chú trọng [9].

Xuất phát từ những vấn đề nêu trên, đề tài **“Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đông đến chất lượng tinh trùng đông lạnh số lượng ít bằng cryotop”** đã được tiến hành. Kết quả nghiên cứu kỳ vọng sẽ cung cấp cơ sở khoa học cho việc lựa chọn và chuẩn hóa quy trình đông rã tinh trùng số lượng ít, góp phần nâng cao chất lượng bảo quản mẫu, cải thiện kết quả hỗ trợ sinh sản và đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng trong thực hành lâm sàng hiện nay.

2. Mục tiêu của đề tài

Đánh giá ảnh hưởng của chất bảo vệ đông lạnh (CPA) đến tỷ lệ thu hồi và tỷ lệ sống của **tinh trùng số lượng ít (từ mào tinh và tinh hoàn) được đông lạnh bằng kỹ thuật cryotop**, nhằm tối ưu hóa hiệu quả sử dụng cho kỹ thuật ICSI.

3. Nội dung nghiên cứu

Ảnh hưởng của CPA nội bào và ngoại bào đến chất lượng tinh trùng thu được từ chọc hút mào tinh (PESA) và trích xuất tinh hoàn (TESE).

So sánh 4 loại môi trường đông lạnh, bao gồm: môi trường chứa Glycerol, môi trường chứa Sucrose, phối hợp Glycerol và Sucrose (tỷ lệ 1:1), và phối hợp Glycerol và Sucrose (tỷ lệ 0,5:1).

Đánh giá chất lượng tinh trùng sau rã đông qua 2 chỉ tiêu chính là tỷ lệ thu hồi (khả năng bảo toàn mẫu) và tỷ lệ sống (dựa trên độ di động hoặc phản ứng dương tính với HOST).

PHẦN I. TỔNG QUAN

1.1 Bảo quản tinh trùng số lượng ít

1.1.1 Khái niệm về bảo quản tinh trùng số lượng ít trong HTSS

Đông lạnh tinh trùng là một kỹ thuật đem lại nhiều lợi ích trong điều trị vô sinh và duy trì khả năng sinh sản cho nam giới. Ở những trường hợp cần đông lạnh tinh trùng từ tinh dịch hoặc mô tinh hoàn, tinh dịch hoặc mô tinh hoàn sau khi sinh thiết sẽ được xử lý và đông lạnh theo phương pháp hơi nitơ lỏng. Khi cần sử dụng tinh trùng sẽ được làm ấm trở lại và trải qua các bước xử lý chuyên biệt để thu nhận tinh trùng phục vụ cho IVF. Tại Việt Nam, tỉ lệ di động sau rã đông của tinh trùng thu nhận từ các mẫu mô tinh hoàn ở bệnh nhân vô tinh do tắc đạt 30% và tỉ lệ có thai với TTTON khi sử dụng nguồn tinh trùng này là 28%[10].

BN có tinh trùng số lượng thấp được hiểu là tình trạng trong đó lượng tinh trùng thu được rất hạn chế, thậm chí chỉ có vài tinh trùng trong toàn bộ mẫu, thường gặp ở các trường hợp thiếu tinh mức độ nặng cryptozoospermia hoặc vô tinh không bế tắc. Trong thực hành hỗ trợ sinh sản hiện nay, tinh trùng với số lượng hạn chế có thể được thu nhận từ tinh dịch sau lọc rửa hoặc từ các thủ thuật xâm lấn như chọc hút mào tinh (PESA) và phẫu thuật tinh hoàn (TESE) [11]. Nhờ sự tiến bộ của kỹ thuật vi thao tác, nam giới không có tinh trùng trong tinh dịch vẫn có khả năng có con mang huyết thống của mình thông qua phẫu thuật lấy tinh trùng từ mào tinh hay tinh hoàn. Tuy nhiên việc phẫu thuật nhiều lần có thể gây ra những ảnh hưởng không thuận lợi cho người chồng, đồng thời làm tăng chi phí điều trị. Do đặc tính của tinh trùng từ phẫu thuật, nhất là những trường hợp sinh thiết tinh hoàn, việc bảo quản lạnh bằng các kỹ thuật thông thường thường không đem lại hiệu quả cao sau khi rã đông.

Đối với nhóm BN này, mỗi tinh trùng đều có giá trị sinh học đặc biệt. Việc lưu giữ tinh trùng số lượng ít không chỉ giúp chủ động về mặt thời gian trong các chu

trình hỗ trợ sinh sản mà còn góp phần hạn chế việc phải lặp lại các can thiệp xâm lấn, giảm nguy cơ tai biến và gánh nặng tâm lý cho bệnh nhân. Do đó đã trở thành một yêu cầu thiết yếu trong các trung tâm hỗ trợ sinh sản hiện đại.

1.1.2 Nguyên lý và các phương pháp bảo quản tinh trùng

Kỹ thuật đông lạnh tinh trùng là phương pháp lưu trữ tinh trùng ở điều kiện nhiệt độ rất thấp nhằm làm chậm hoặc ngưng hoàn toàn những hoạt động sinh học của tế bào. Nguyên lý cơ bản của quá trình này là hạ nhiệt độ một cách có kiểm soát, đồng thời kết hợp sử dụng các chất bảo vệ lạnh (cryoprotectants – CPA) nhằm giảm thiểu tổn thương tế bào do hình thành tinh thể đá, thay đổi áp suất thẩm thấu và stress oxy hóa [12].

Hiện nay, các kỹ thuật bảo quản tinh trùng bao gồm đông lạnh tốc độ chậm, đông nhanh và phương pháp thủy tinh hóa. Đối với tinh trùng số lượng ít, đặc biệt là tinh trùng được thu nhận thông qua phẫu thuật tinh hoàn, các phương pháp đông nhanh và thủy tinh hóa thường được ưu tiên do giúp giảm thể tích mẫu, hạn chế hình thành tinh thể đá và tăng khả năng hồi phục tinh trùng sau khi rã đông [13].

1.1.3 Ảnh hưởng của quá trình đông rã đến chất lượng tinh trùng

Mặc dù đông lạnh là phương pháp bảo quản hiệu quả, quá trình đông rã vẫn có thể gây ra nhiều tổn hại sinh học đối với tinh trùng. Các nghiên cứu cho thấy tinh trùng rất dễ bị ảnh hưởng bởi các biến động về nhiệt độ và áp suất thẩm thấu trong suốt giai đoạn đông và rã đông. Những biến đổi đột ngột này có thể gây tổn thương màng tế bào, rối loạn chức năng ty thể và làm giảm khả năng vận động của tinh trùng [14, 15].

Bên cạnh đó, quá trình đông rã còn làm gia tăng stress oxy hóa, từ đó thúc đẩy sự sinh ra các gốc oxy phản ứng tự do (ROS), gây tổn thương lipid màng, protein và DNA tinh trùng [16, 17]. Tình trạng đứt gãy DNA tinh trùng sau quá trình đông rã đã được ghi nhận là một yếu tố có thể tác động bất lợi đến kết quả thụ tinh và quá trình phát triển của phôi trong các chu kỳ ICSI [18].

Thách thức lớn nhất trong bảo quản tinh trùng số lượng ít là khả năng mất mẫu, sự suy giảm rõ rệt chất lượng tinh trùng sau khi rã đông và các trở ngại trong thao tác

kỹ thuật [19]. Do đó, việc lựa chọn và tối ưu hóa các điều kiện đông rã phù hợp giữ vai trò quan trọng trong việc cải thiện hiệu quả bảo quản nhóm tinh trùng này [20].

Đối với tinh trùng số lượng ít, ảnh hưởng của quá trình đông rã cần được nhìn nhận nghiêm ngặt hơn so với các mẫu tinh dịch thông thường. Ở mẫu tinh dịch có mật độ cao, sự suy giảm một phần số lượng hoặc chất lượng tinh trùng sau rã đông có thể vẫn còn đủ tinh trùng để lựa chọn cho ICSI. Ngược lại, trong các mẫu PESA, TESE thì số lượng tinh trùng ban đầu thường rất hạn chế vì vậy chỉ cần mất một tỷ lệ nhỏ tinh trùng trong quá trình xử lý, đông lạnh hoặc rã đông cũng có thể làm giảm đáng kể khả năng sử dụng mẫu sau bảo quản [43].

Tổn thương sau đông rã không chỉ biểu hiện ở việc tinh trùng mất vận động, mà còn có thể biểu hiện dưới dạng giảm tính toàn vẹn màng tế bào, giảm đáp ứng với môi trường kiểm tra sống/chết, hoặc không còn khả năng phục hồi vận động sau khi tiếp xúc với môi trường hỗ trợ đánh giá di động [44]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, việc đánh giá chất lượng tinh trùng sau rã đông không nên chỉ dừng ở quan sát di động tức thời, mà cần kết hợp thêm thử nghiệm HOST để nhận diện những tinh trùng còn sống nhưng không biểu hiện vận động rõ ràng sau rã đông.

Một điểm quan trọng khác là quá trình đông rã có thể ảnh hưởng khác nhau lên tinh trùng tùy theo nguồn gốc mẫu. Tinh trùng thu được từ mào tinh thường đã trải qua giai đoạn trưởng thành sinh lý nhất định, trong khi tinh trùng thu từ mô tinh hoàn có thể chưa hoàn thiện đầy đủ về khả năng vận động và tính ổn định màng tế bào. Do đó, cùng một quy trình đông lạnh và cùng một môi trường CPA có thể tạo ra kết quả khác nhau giữa mẫu PESA và mẫu TESE. Đây là cơ sở quan trọng để luận văn không chỉ so sánh các môi trường đông nói chung, mà còn cần phân tích riêng từng nguồn tinh trùng.

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của quá trình đông rã được xem xét thông qua hai hậu quả chính: mất tinh trùng sau rã đông và giảm tỷ lệ tinh trùng sống trong số tinh trùng thu hồi được. Hai hậu quả này có thể xảy ra độc lập với nhau. Một mẫu có thể thu hồi được nhiều tinh trùng nhưng tỷ lệ tinh trùng còn sống thấp; ngược lại, một mẫu có thể có tỷ lệ sống tương đối tốt nhưng số lượng tinh trùng thu hồi lại không

cao. Vì vậy, khi đánh giá chất lượng tinh trùng sau rã đông, không nên chỉ dựa vào một chỉ tiêu đơn lẻ.

Đặc biệt, với tinh trùng số lượng ít, sai lệch nhỏ trong quá trình xử lý, đông lạnh, rã đông hoặc tìm kiếm tinh trùng sau rã đông đều có thể ảnh hưởng đến kết quả cuối cùng. Chính vì vậy, việc sử dụng cùng một dụng cụ chứa, cùng thể tích môi trường đông, cùng số lượng tinh trùng đưa vào mỗi cọng và cùng phương pháp đánh giá sau rã đông là điều kiện quan trọng để hạn chế sai số giữa các nhóm nghiên cứu. Trong thiết kế của đề tài, các yếu tố này đã được kiểm soát, nhờ đó việc so sánh giữa các nhóm môi trường đông có cơ sở rõ ràng hơn.

1.2 Vai trò của dụng cụ chứa

1.2.1 Giới thiệu về các dụng cụ chứa tinh trùng số lượng ít

Do đặc thù số lượng tinh trùng hạn chế thường được thu nhận từ các can thiệp xâm lấn như chọc hút mào tinh hoặc sinh thiết tinh hoàn, các dụng cụ chứa quy ước hiện không còn đáp ứng đầy đủ yêu cầu về giảm thiểu thất thoát mẫu và tối ưu hóa chất lượng tinh trùng sau quá trình đông lạnh - rã đông. Vì vậy, nhiều loại dụng cụ chứa chuyên biệt đã được phát triển và ứng dụng trong thực hành lâm sàng cũng như trong các nghiên cứu liên quan như:

Ống cryovial là loại dụng cụ chứa phổ biến trong bảo quản tinh trùng với số lượng lớn, có dung tích tương đối lớn (thường từ 0,5–2,0 mL) [21]. Ưu điểm của cryovial là dễ sử dụng, giá thành thấp và thuận lợi cho việc ghi nhận, quản lý mẫu. Tuy nhiên, đối với tinh trùng số lượng ít cryovial bộc lộ hạn chế như khó thu hồi mẫu sau rã đông và tốc độ làm lạnh không tối ưu.

Ống hút đông lạnh Straw là dụng cụ chứa dạng ống nhựa mảnh, có dung tích nhỏ hơn cryovial (thường 0,25–0,5 mL), được sử dụng rộng rãi trong bảo quản tinh trùng cũng như phôi [22]. Đối với tinh trùng số lượng ít, các loại micro-straw với dung tích siêu nhỏ đã được phát triển nhằm giảm thể tích chứa và tăng khả năng thu hồi tinh trùng; tuy vậy, việc định vị và thu hồi tinh trùng sau rã đông vẫn gặp khó khăn ở một số tình huống nhất định [23].

Cryotop được xem là một trong những thiết bị chứa tiên tiến và hiện được áp dụng phổ biến nhất hiện nay trong kỹ thuật vitrification. Cho phép cố định mẫu tại vị

trí xác định, giảm nguy cơ thất thoát và nâng cao khả năng thu nhận lại tinh trùng sau khi rã đông. Nhờ những ưu điểm này, Cryotop ngày càng được quan tâm trong các nghiên cứu và trong ứng dụng lâm sàng [24].

Ngoài các dụng cụ nêu trên, một số hệ thống chứa vi thể khác như cryopiece, cell sleeper hoặc các thiết bị vi lưu cũng đã được nghiên cứu hướng tới việc tối ưu hóa bảo quản tinh trùng với số lượng cực ít. Các dụng cụ này cho phép cố định từng tinh trùng riêng lẻ, thuận lợi cho ICSI, tuy nhiên chi phí còn cao và vẫn chưa được triển khai phổ biến trong thực hành thường quy.

1.2.2 Ứng dụng của cryotop trong bảo quản tinh trùng số lượng ít

Cryotop là một dụng cụ chuyên biệt được thiết kế để phục vụ kỹ thuật đông lạnh siêu nhanh (vitrification) trong mảng hỗ trợ sinh sản và đã được ứng dụng phổ biến trong bảo quản noãn, phôi và gần đây là tinh trùng số lượng rất ít. Cryotop ra đời nhằm cải thiện các điểm hạn chế của những kỹ thuật đông lạnh thông thường, trong đó tốc độ làm lạnh chậm có thể gây hình thành tinh thể đá nội bào, làm tổn hại cấu trúc tế bào, đồng thời tác động đến khả năng sống và hoạt tính sinh học của mẫu sau khi rã đông [25].

Về cấu tạo, Cryotop gồm một thanh nhựa mỏng, phẳng, có diện tích tiếp xúc rất nhỏ, cho phép đặt một thể tích rất nhỏ. Phần chứa mẫu được bảo vệ bằng một nắp nhựa giúp giảm nguy cơ nhiễm chéo trong quá trình lưu trữ nitơ lỏng. Chính đặc điểm thể tích tối thiểu này giúp Cryotop đạt được tốc độ hạ nhiệt và làm ấm trở lại cực cao, lên tới hàng chục nghìn độ C trong mỗi phút, từ đó tạo điều kiện cho quá trình thủy tinh hóa diễn ra hiệu quả, hạn chế sự xuất hiện của tinh thể đá.



Hình 1.1 Hình ảnh dụng cụ chứa cryotop [26]

Cryotop cũng làm phát sinh một số khó khăn cần được lưu ý, bao gồm yêu cầu cao về kỹ năng thao tác của chuyên viên, kiểm soát chặt chẽ thời gian tiếp xúc cùng cryoprotectant và nguy cơ nhiễm chéo nếu không tuân thủ nghiêm ngặt các quy trình đảm bảo an toàn sinh học. Do đó, việc thiết lập và tiêu chuẩn hóa quy trình áp dụng Cryotop là yếu tố có vai trò quyết định trong việc duy trì hiệu quả và độ an toàn của phương pháp.

Việc ứng dụng Cryotop không chỉ hỗ trợ cải thiện chất lượng bảo quản mẫu mà còn mở ra nhiều cơ hội trong điều trị vô sinh hiếm muộn, nhất là trong điều kiện số lượng các trường hợp cần thu và bảo quản tinh trùng từ các can thiệp xâm lấn đang có xu hướng tăng lên [45].

Trong bối cảnh nghiên cứu này, cryotop có ý nghĩa đặc biệt vì mỗi cọng trữ đông chỉ chứa số lượng tinh trùng rất nhỏ, được đặt trong giọt môi trường đông có thể tích 2 μ l. Việc đặt tinh trùng tại vị trí xác định trên cryotop giúp chuyên viên phối học chủ động hơn trong quá trình tìm kiếm và thu hồi tinh trùng sau rã đông. Điều này phù hợp với mục tiêu nghiên cứu là đánh giá tỷ lệ thu hồi và tỷ lệ sống sau rã đông, bởi nếu dụng cụ chứa gây khó khăn trong việc định vị mẫu thì kết quả thu hồi có thể bị ảnh hưởng không chỉ bởi môi trường đông mà còn bởi thao tác kỹ thuật [46].

Tuy nhiên, chính ưu điểm thể tích nhỏ của cryotop cũng đòi hỏi thao tác vi phẫu và vi thao tác phải chính xác. Trong quy trình nghiên cứu, tinh trùng được gom

bằng kim ICSI và chuyển vào giọt môi trường đông trên đầu cryotop. Do đó, các yếu tố như vị trí đặt giọt môi trường, thời gian thao tác, thao tác tránh gây kim và khả năng kiểm soát quá trình hơ trên bề mặt nitơ đều là những điểm cần được chuẩn hóa để đảm bảo sự khác biệt giữa các nhóm chủ yếu phản ánh ảnh hưởng của môi trường đông, thay vì sai lệch do thao tác.

1.3 Vai trò của chất bảo vệ đông lạnh (CPA)

1.3.1 Nguồn gốc và lịch sử phát triển của CPA trong hỗ trợ sinh sản

Trong chu kỳ đông lạnh–rã đông, đá kết tinh khi nhiệt độ giảm là yếu tố then chốt chi phối tỷ lệ tế bào còn sống. Vì vậy, kiểm soát hiện tượng này là điều kiện cốt lõi để quy trình đông lạnh hiệu quả. Các hợp chất bảo vệ tế bào trong giai đoạn làm lạnh và rã đông, như glycerol, được gọi là tác nhân bảo vệ lạnh (cryoprotectant agents – CPA). CPA rất cần thiết khi lưu giữ ở nhiệt độ thấp các tế bào và mô sinh sản, nhất là tinh trùng, noãn và phôi người [27].

CPA tan trong nước, tương tác với cấu trúc sinh học và có thể “thế chỗ nước” nội bào, qua đó giảm kết tinh khi nhiệt độ hạ xuống. Chúng cũng che chở tế bào trong điều kiện lạnh. Do không tự kết tinh, CPA hạn chế tăng nồng độ chất tan và bám vào màng bào tương để bảo vệ tế bào lúc nước ngoại bào chuyển sang dạng tinh thể. Tuy vậy, tác dụng của mỗi CPA trên từng kiểu tế bào chủ yếu mới dựa vào quan sát, chưa được chứng minh rõ về cơ chế CPA thường gồm hai nhóm: thẩm qua màng và không thẩm qua màng. Dù khác đặc tính và cơ chế, chúng bổ trợ nhau trong khử nước nội bào, giúp giảm tạo tinh thể đá bên trong tế bào. Cần lưu ý, đa số CPA có độc tính; mức độ tăng theo nồng độ và thời gian tiếp xúc, nhất là ở mức nhiệt của cơ thể.

Song hành với những tiến bộ của kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm (IVF), nhu cầu bảo quản noãn và phôi ngày càng tăng. Điều này thúc đẩy sự nghiên cứu và ứng dụng những hợp chất bảo quản lạnh thế hệ mới như ethylene glycol (EG), propylene glycol cùng các polyol khác. Các chất này có đặc tính thẩm thấu nhanh, độc tính thấp hơn và phù hợp hơn đối với những tế bào lớn, chứa nhiều nước, điển hình là noãn và phôi người. Trong giai đoạn này, những tác nhân bảo vệ trong đông lạnh không thẩm thấu như sucrose, trehalose cũng được đưa vào sử dụng nhằm kiểm

soát áp lực thẩm thấu và hỗ trợ quá trình khử lượng nước trong tế bào trước khi đông lạnh [28].



Hình 1.2 Vai trò của chất bảo vệ đông lạnh lên tế bào [29]

1.3.2 Phân loại chất bảo vệ đông lạnh (CPA)

Chất bảo quản lạnh có khả năng xuyên qua màng tế bào (Permeating CPA). Đây là nhóm CPAs có thể thẩm thấu qua màng tế bào, thay thế một phần lượng nước bên trong tế bào, qua đó làm giảm nguy cơ tạo thành các tinh thể băng trong nội bào. Một số CPA thẩm thấu thường dùng trong kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (ART) như Glycerol (chủ yếu dùng cho tinh trùng), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Ethylene glycol (EG), Propylene glycol (PROH) [30, 31].

Chất bảo quản lạnh không xuyên qua màng tế bào (Non-permeating CPA). Nhóm này không xâm nhập vào tế bào mà chủ yếu tác động lên khoang dịch bên ngoài tế bào, góp phần điều hòa cân bằng áp suất thẩm thấu và hỗ trợ làm mất nước tế bào có kiểm soát. Các CPA không thẩm thấu thường dùng trong ART như Sucrose, Trehalose, Ficoll, Polyvinylpyrrolidone [32, 33, 34].

Nhờ khả năng hỗ trợ làm mất nước tế bào và tăng hiệu quả bảo vệ ngoại bào, CPA không thẩm giúp rút ngắn thời gian tế bào phải tiếp xúc với CPA thẩm trong quá trình cân bằng và vitrification. Việc giảm thời gian tiếp xúc này có ý nghĩa thiết yếu

trong việc giảm thiểu độc tính tích lũy của CPA thấm đối với noãn, phôi và tinh trùng [35].

Trong đông lạnh tinh trùng, CPA nội bào và CPA ngoại bào có vai trò khác nhau nhưng không tách rời nhau. CPA nội bào như Glycerol có khả năng thấm vào trong tế bào, góp phần làm giảm lượng nước tự do có thể kết tinh trong quá trình hạ nhiệt. Cơ chế này có ý nghĩa quan trọng vì tinh thể đá nội bào là một trong những nguyên nhân gây tổn thương cấu trúc tế bào. Tuy nhiên, vì Glycerol có khả năng đi vào bên trong tinh trùng nên tế bào cũng phải trải qua quá trình thay đổi thẩm thấu khi CPA đi vào và đi ra khỏi tế bào. Nếu quá trình này không được kiểm soát tốt, tinh trùng có thể chịu stress thẩm thấu, ảnh hưởng đến màng tế bào và khả năng sống sau rã đông.

Ngược lại, CPA ngoại bào như Sucrose chủ yếu tác động bên ngoài tế bào. Sucrose không bảo vệ trực tiếp cấu trúc nội bào như Glycerol, nhưng có vai trò quan trọng trong điều hòa sự di chuyển nước qua màng tế bào. Khi môi trường ngoại bào trở nên ưu trương hơn, nước trong tế bào có xu hướng thoát ra ngoài, từ đó làm giảm lượng nước nội bào có thể tạo thành tinh thể đá khi hạ nhiệt. Với tinh trùng số lượng ít, việc kiểm soát mất nước tế bào có ý nghĩa đặc biệt vì mỗi tinh trùng đều có giá trị sử dụng thực tế.

Từ cơ sở này, việc phối hợp Glycerol và Sucrose trong nghiên cứu có ý nghĩa sinh học hợp lý. Glycerol có thể hỗ trợ bảo vệ nội bào, trong khi Sucrose hỗ trợ điều hòa môi trường ngoại bào và quá trình mất nước tế bào. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu quả của sự phối hợp này không giống nhau hoàn toàn giữa PESA và TESE. Vì vậy, luận văn cần trình bày CPA không chỉ như một nhóm hóa chất bảo vệ chung, mà như một yếu tố có tác động phụ thuộc vào đặc điểm nguồn tinh trùng, tình trạng màng tế bào và khả năng chịu đựng stress đông rã của từng loại mẫu.

Trong phạm vi đề tài, Glycerol được sử dụng như đại diện cho CPA nội bào, còn Sucrose được sử dụng như đại diện cho CPA ngoại bào. Sự khác biệt giữa hai nhóm CPA này tạo cơ sở cho thiết kế bốn nhóm nghiên cứu. Nhóm Glycerol đơn thuần cho phép đánh giá ảnh hưởng của CPA nội bào; nhóm Sucrose đơn thuần cho phép đánh giá ảnh hưởng của CPA ngoại bào; hai nhóm

phối hợp Glycerol và Sucrose cho phép xem xét tác động khi kết hợp hai cơ chế bảo vệ này trong cùng môi trường đông.

Điểm cần nhấn mạnh là CPA không chỉ ảnh hưởng đến khả năng bảo vệ tinh trùng trong quá trình hạ nhiệt mà còn có thể ảnh hưởng đến khả năng sống sau rã đông. Do đó, việc lựa chọn CPA cần được đánh giá bằng dữ liệu thực nghiệm cụ thể. Trong nghiên cứu này, kết quả cho thấy đáp ứng với CPA khác nhau giữa PESA và TESE, vì vậy không nên xem một loại môi trường đông là tối ưu chung cho mọi nguồn tinh trùng số lượng ít.

1.4 Phương pháp thu tinh trùng từ chọc hút mào tinh (PESA)

1.4.1 Giới thiệu về kỹ thuật PESA

Phương pháp hút tinh trùng mào tinh qua da (PESA) là kỹ thuật lấy tinh trùng bằng kim nhỏ đưa qua da vào mào tinh. Mào tinh là nơi tinh trùng trưởng thành và được bảo tồn sau khi quá trình tạo tinh diễn ra tại tinh hoàn. Ở các trường hợp bất tắc ống dẫn tinh, hoạt động sinh tinh vẫn diễn ra bình thường nhưng tinh trùng không thể thoát ra ngoài qua đường phóng tinh. Khi đó tinh trùng sẽ tích tụ tại mào tinh. Phương pháp PESA dùng kim mảnh xuyên qua vùng da bìu vào mào tinh để hút dịch có chứa tinh trùng. Dịch hút được sau đó được chuyển ngay cho labo hỗ trợ sinh sản để kiểm tra nồng độ và mức độ di động của tinh trùng.

Phương pháp PESA được áp dụng phổ biến trong các cơ sở hỗ trợ sinh sản nhờ ưu điểm thao tác nhanh, ít đau, ít biến chứng và có thể tiến hành ngoại trú. Mẫu tinh trùng lấy được từ PESA chủ yếu được sử dụng cho phương pháp tiêm trực tiếp tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) hoặc trữ đông dự trữ do lượng và chất lượng tinh trùng thường hạn chế.

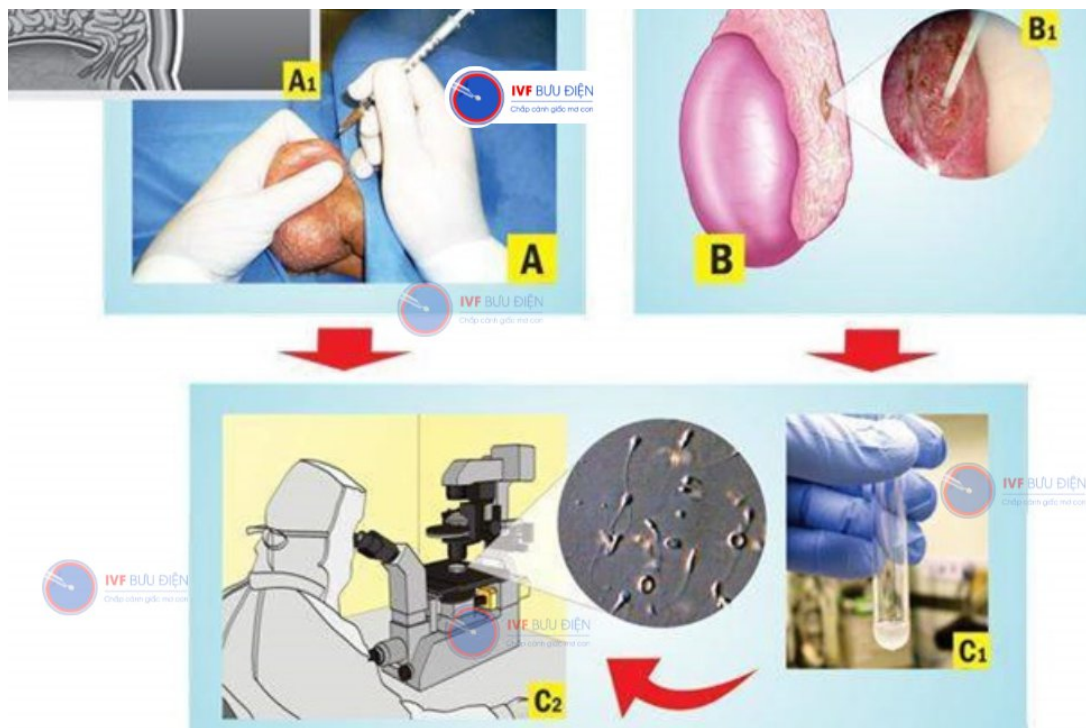
PESA thường được chỉ định trong các trường hợp:

- Vô tinh do tắc nghẽn đường dẫn tinh
- Bất sản ống dẫn tinh hai bên bẩm sinh
- Tắc mào tinh hoặc ống dẫn tinh sau viêm nhiễm.
- Bệnh nhân sau triệt sản nam muốn có con trở lại
- Không xuất tinh được nhưng chức năng sinh tinh còn bình thường

- Thu nhận tinh trùng để trữ đông trước điều trị ung thư hoặc các bệnh lý ảnh hưởng sinh sản.

1.4.2 Quy trình thực hiện kỹ thuật PESA

Đối với các trường hợp bệnh nhân bị vô tinh do tắc nghẽn (Obstructive Azoospermia – OA) thường có tiên lượng điều trị tốt thông qua việc thu nhận tinh trùng trực tiếp từ mào tinh hoặc tinh hoàn[36]. Kỹ thuật thường được áp dụng để lấy tinh trùng từ mào tinh là hút tinh trùng mào tinh qua da (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration – PESA)[37]. Đây là thủ thuật ít xâm lấn tránh phẫu thuật mở, sử dụng kim nhỏ đâm xuyên qua da bìu để hút tinh trùng, thường áp dụng cho nam giới bị vô sinh do tắc nghẽn đường dẫn tinh[38]. Các mẫu tinh trùng thu nhận từ mào tinh có thể được sử dụng ngay cho kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) hoặc được trữ lạnh nhằm sử dụng cho các chu kỳ điều trị sau[39].



Hình 1.3 Mô tả quy trình thu tinh trùng từ mẫu PESA

Nguồn: IVF Bưu Điện (chỉnh sửa từ website IVF Bưu Điện).

Khác với mẫu tinh dịch xuất tinh tự nhiên, tinh trùng thu được từ mào tinh thường có số lượng ít, xen lẫn nhiều tế bào biểu mô, hồng cầu, mảnh mô và có độ nhớt cao. Do đó việc xử lý mẫu trước khi đông lạnh tinh trùng đóng vai trò rất quan trọng.

trọng giúp tối ưu khả năng sống, di động của tinh trùng, hạn chế tổn thương do quá trình đông – rã gây ra. Để đảm bảo an toàn và tránh nhầm lẫn mẫu trước khi xử lý mẫu cần phải :

- Hai chuyên viên phôi học cần kiểm tra chéo thông tin bệnh nhân
- Xác nhận họ tên, mã số, ngày sinh
- Đối chiếu chính xác trên tất cả dụng cụ chứa mẫu

Mục tiêu của quá trình xử lý mẫu bao gồm:

- Thu nhận tối đa tinh trùng sống có khả năng sử dụng
- Loại bỏ máu, tế bào chết, mảnh mô và các tạp chất
- Giảm stress oxy hóa và tổn thương màng tế bào
- Chuẩn bị môi trường phù hợp cho quá trình quản lạnh (Cryoprotectant – CPA)
- Tối ưu hóa khả năng sống sau rã đông

Do đặc điểm mẫu thường có thể tích rất nhỏ và mật độ tinh trùng thấp, mọi thao tác được thực hiện nhẹ nhàng, hạn chế ly tâm mạnh nhằm nâng cao hiệu quả lâm sàng trong việc thu hồi tinh trùng sau rã đông.

1.5 Phương pháp thu tinh trùng từ phẫu thuật trích tinh hoàn (TESE)

Phẫu thuật trích tinh hoàn (Testicular Sperm Extraction – TESE) là kỹ thuật lấy mô tinh hoàn nhằm tìm kiếm tinh trùng phục vụ cho kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) hoặc trữ đông tinh trùng dự phòng trong tương lai. Đây là một trong những phương pháp quan trọng trong điều trị vô sinh nam nặng, đặc biệt ở các bệnh nhân vô tinh không bế tắc (Non-obstructive Azoospermia – NOA) hoặc thất bại với các phương pháp ít xâm lấn[40].

Khác với phương pháp chọc hút tinh trùng từ mào tinh PESA thì phương pháp TESE tác động trực tiếp lên nhu mô tinh hoàn nên thường được áp dụng cho các trường hợp suy giảm sinh tinh nặng hoặc không có tinh trùng trong mào tinh[41].

Mục tiêu của quy trình là:

- Thu nhận mô tinh hoàn chứa các ống sinh tinh
- Tìm kiếm tinh trùng trưởng thành sử dụng cho ICSI hoặc trữ đông

- Hạn chế tối đa tổn thương nhu mô tinh hoàn và mạch máu nuôi tinh hoàn

Sau khi mô tinh hoàn được lấy ra:

- Mô được nghiền nhỏ bằng cơ học
- Các ống sinh tinh được phá vỡ
- Tinh trùng được giải phóng vào môi trường nuôi cấy
- Chuyên viên phôi học tìm kiếm tinh trùng dưới kính hiển vi đảo ngược.

Mẫu TESE có đặc điểm khác biệt rõ so với PESA vì tinh trùng được thu trực tiếp từ mô tinh hoàn. Trong phần phương pháp, mẫu TESE được mô tả là chứa nhiều thành phần nền như ống sinh tinh đã xé nhuyễn, tế bào trong ống sinh tinh, hồng cầu và mảnh vụn tế bào. Những thành phần này làm cho quá trình tìm kiếm, lựa chọn và xử lý tinh trùng trước trữ đông trở nên phức tạp hơn.

Chính vì đặc điểm này, việc đánh giá kết quả TESE cần được tách riêng khỏi PESA. Nếu gộp chung hai nguồn mẫu, sự khác biệt về bản chất mẫu có thể làm sai lệch cách hiểu về hiệu quả của môi trường đông. Trong dữ liệu hiện có, TESE có tỷ lệ thu hồi thấp hơn PESA ở cả bốn nhóm môi trường đông, đồng thời tỷ lệ sống cũng không tăng theo cùng xu hướng với PESA. Điều này cho thấy TESE cần được phân tích như một nhóm mẫu có đặc điểm riêng, thay vì chỉ xem là một phần của nhóm tinh trùng số lượng ít nói chung.

1.6 Tình hình nghiên cứu trong nước và trên thế giới

1.6.1 Nghiên cứu trong nước

Nghiên cứu của Nguyễn Thanh Tùng, Hồ Sỹ Hùng, Trịnh Thế Sơn và cộng sự (2024) là nghiên cứu thực nghiệm đầu tiên ở Việt Nam đánh giá hiệu quả vitrification không sử dụng chất bảo vệ đông lạnh (CPA-free) trên tinh trùng người số lượng thấp trong ống PCR. Nghiên cứu tiến hành vitrification các mẫu tinh trùng từ 30 nam giới bị oligospermia, sau đó đánh giá tỉ lệ sống, tính di động và chất lượng sau rã đông ở nhiều mốc thời gian lưu trữ khác nhau. Kết quả sơ bộ: Nhóm vitrification không sử dụng CPA cho tỉ lệ sống và di động đáng kể sau rã đông (~50–45% sống và ~43–37% di động). Đây là minh chứng cho khả năng ứng dụng vitrification CPA-free đối với tinh trùng số lượng ít trong điều kiện phòng thí nghiệm tại Việt Nam[42].

1.6.2 Nghiên cứu trên thế giới

Nghiên cứu của Yuji Endo và cộng sự (2012) phát triển phương pháp vitrification đơn giản cho số lượng nhỏ tinh trùng và so sánh hiệu quả giữa nhiều phương pháp, trong đó bao gồm Cryotop. Kết quả cho thấy các quy trình và dụng cụ đông lạnh thông thường không phù hợp với tinh trùng từ tinh hoàn do số lượng ít và khả năng vận động tại chỗ kém, và nhiều loại dụng cụ khác nhau đã được sử dụng để đông lạnh một lượng nhỏ tinh trùng. Nghiên cứu này đã cố gắng phát triển một phương pháp thủy tinh hóa cho một lượng nhỏ tinh trùng bằng cách sử dụng Cell Sleeper, một loại dụng cụ bảo quản lạnh tế bào kín. Tinh trùng trong dụng cụ được làm lạnh trong hơi nitơ lỏng và sau đó được bảo quản trong nitơ lỏng. Các thông số về khả năng vận động của tinh trùng được cải thiện đáng kể ($P < 0,05$) bằng phương pháp thủy tinh hóa. Sau khi thủy tinh hóa năm tinh trùng mỗi dụng cụ. Tỷ lệ phục hồi, khả năng vận động và khả năng sống sót của tinh trùng được làm đông lạnh và rã đông tương tự nhau giữa nhóm Cell Sleeper và nhóm CryoTop[43]. Nghiên cứu của Y. Chen và cộng sự (2014) sử dụng Cryotop để bảo quản tinh trùng người trong thể tích rất nhỏ, với hai nhóm: không sử dụng CPA và chỉ sử dụng Sucrose (là CPA không thẩm thấu). Kết quả cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về tỉ lệ thu hồi và tỷ lệ di động tinh trùng giữa hai nhóm, và nhóm không sử dụng CPA có tỉ lệ sống sau rã đông cao hơn so với nhóm sử dụng sucrose[44].

PHẦN II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

2.1.1 Đối tượng

Nghiên cứu trên 300 mẫu tinh trùng thu được từ phẫu thuật tinh hoàn và mào tinh. BN có độ tuổi trung bình 20-50 đã được kiểm tra xét nghiệm tinh dịch đồ để đánh giá chất lượng tinh trùng

2.1.2 Tiêu chuẩn loại trừ

Nghiên cứu chỉ tập trung vào các mẫu tinh trùng có số lượng rất ít là các mẫu thu được từ phẫu thuật tinh hoàn và mào tinh (PESA, TESE)

2.1.3 Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Từ tháng 10 năm 2024 đến tháng 12 năm 2025 tại phòng Lab nuôi cấy phôi, Bệnh viện phụ sản An Thịnh. Tất cả các mẫu tinh trùng sử dụng nghiên cứu đều là các mẫu đã được BN cam kết loại bỏ không còn sử dụng. Các mẫu sau khi sử dụng nghiên cứu đều bị loại bỏ không sử dụng cho bất kỳ mục đích nào khác.

2.2 Vật liệu nghiên cứu

2.2.1 Vật tư, thiết bị dùng trong nghiên cứu

Bảng 2.1 Vật tư, thiết bị dùng trong nghiên cứu

Thông tin	Hãng/Nước sản xuất
Pipet 10	Eppendorf - Đức
Cộng cryotop	Kitazato – Nhật Bản
Đầu tip pipet 10	Eppendorf - Đức
Hộp xốp đựng nitơ	Trung Quốc
Kẹp inox	Trung Quốc
Đĩa 35mm	Thermo Fisher Scientific – Mỹ
Bút ghi nhãn	Việt Nam
Đồng hồ bấm giờ	Việt Nam

Kính hiển vi đảo ngược	Zeiss – Đức
Bộ vi thao tác	Narishige – Nhật Bản
Kim bắt tinh trùng	Sunlight – Mỹ
Tủ thao tác vô trùng	IVF tech – Thụy Điển
Kính hiển vi soi nổi	Zeiss – Đức
Máy ly tâm	Centrifuge - Ependorf
Ống Falcol 15ml	Corning – Mexico
Bình nitơ lỏng	Việt Nam

2.2.2 Hóa chất

Bảng 2.2 Môi trường dùng trong nghiên cứu

Thông tin	Hãng/Nước sản xuất
Môi trường đông lạnh tinh trùng chứa Glycerol (SpermFreeze)	FertiPro – Bỉ
Môi trường rửa tinh trùng MHMC (Multipurpose Handling Medium Complete)	Fujifilm Irvine Scientific -Mỹ
Môi trường đông lạnh tinh trùng chứa Sucrose (Oligospemia Cryo Media)	Kitazato – Nhật Bản
Môi trường rã đông tinh trùng Oligospemia Cryo Media	Kitazato – Nhật Bản
Môi trường lọc rửa tinh trùng Silselect	Fertipro – Bỉ
Dầu phủ Ovoil	Vitrolife – Thụy Điển
Nitơ lỏng	Việt Nam

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Xét nghiệm tinh dịch đồ

Bảng 2.3 Chỉ tiêu đánh giá theo tiêu chuẩn của WHO 2010

Chỉ tiêu đánh giá tinh dịch đồ (WHO, 2010)	
Thời gian ly giải	15 - 60 phút
pH	$\geq 7,2$
Thể tích (ml)	$\geq 1,5$
Tổng số tinh trùng (triệu tinh trùng)	≥ 39
Mật độ (triệu tinh trùng/ml)	≥ 15
Di động (%)	
PR (tiến tới)	≥ 32 hay
NP (không tiến tới)	$PR + NP \geq 40$
IM (bất động)	
Tỉ lệ sống (%)	≥ 58
Hình dạng tinh trùng bình thường (%)	≥ 4
Tế bào lạ (triệu tế bào/ml)	≥ 1

Các chỉ số đánh giá bao gồm :

Độ di động của tinh trùng:

Khả năng vận động được đánh giá thông qua việc theo dõi chuyển động tự phát của tinh trùng, rồi quy đổi số tinh trùng có chuyển động so với toàn bộ tinh trùng đã xem xét thành giá trị phần trăm. Phần trăm tinh trùng có hướng di chuyển tiến lên được ghi nhận là có mối liên hệ với khả năng thụ thai vì vậy chỉ số này cần được xác định với độ chính xác cao. Năng lực vận động của tinh trùng có thể thay đổi dưới tác động của nhiều yếu tố, chẳng hạn độ tuổi và tình trạng thể chất của nam giới. Ngoài ra, khoảng kiêng xuất tinh, phương pháp thu nhận bệnh phẩm và độ trễ từ thời điểm xuất tinh đến lúc tiến hành phân tích cũng có thể làm biến đổi kết quả. Vì thế, chỉ tiêu vận động nên được kiểm tra ngay khi tinh dịch đã hóa lỏng hoàn toàn, tốt nhất không quá 30 phút.

Vận động tinh trùng hiện được chia thành ba nhóm gồm: (1) chuyển động tiến lên (progressive-PR), (2) chuyển động nhưng không tiến lên rõ rệt (non progressive-NP) và (3) bất động (immotile-IM). Khâu chọn khu vực quan sát có ý nghĩa lớn; cần tránh những trường nhìn tập trung chủ yếu các tinh trùng đang chuyển động. Trong phạm vi đã chọn, ở cùng một thời điểm, nhóm PR được ghi nhận trước, tiếp theo là NP và IM. Không đợi tinh trùng di chuyển vào vùng xét rồi mới bắt đầu ghi nhận. Thứ tự đánh giá cũng có thể thay đổi bằng cách xem NP và IM trước, nhằm giảm nguy cơ ước lượng PR cao hơn thực tế. Cần chú ý chỉ tính những tinh trùng có cấu trúc đầu và đuôi đầy đủ, đồng thời tổng số quan sát tối thiểu phải đạt 200 tinh trùng. Nếu đã đủ 200 tinh trùng trước khi hoàn tất việc ghi nhận tất cả nhóm vận động trong cùng trường đánh giá, vẫn phải tiếp tục đếm các nhóm còn lại, kể cả khi tổng số vượt quá 200. Để giảm sai lệch, phép khảo sát cần thực hiện hai lần; nếu chênh lệch giữa hai lượt nằm trong khoảng sai số chấp nhận được, kết quả sau cùng được lấy bằng giá trị trung bình của hai lần ghi nhận, với sai số được đối chiếu theo bảng giới hạn cho phép. Ngưỡng tối thiểu đối với tổng tinh trùng có vận động (PR + NP) là 40%, còn riêng nhóm PR là 32%.

Tỉ lệ sống của tinh trùng:

Chỉ số sống của tinh trùng giữ vai trò đặc biệt trong những mẫu tinh dịch xuất tinh có toàn bộ tinh trùng không vận động. Bên cạnh đó, kết quả về khả năng sống còn giúp đối chiếu lại với dữ liệu đánh giá vận động. Việc phân biệt tinh trùng còn sống hay đã chết dựa trên cơ sở rằng tế bào sống thường duy trì được màng bao nguyên vẹn. Nhờ lớp màng này, chất nhuộm không thể đi vào bên trong tinh trùng. Ngược lại, khi tinh trùng đã chết, thuốc nhuộm sẽ thấm vào tế bào và làm chúng bắt màu. Có thể áp dụng nhiều kỹ thuật nhuộm khác nhau, chẳng hạn eosin đơn, trypan blue hoặc phối hợp eosin-nigrosin. Trong kỹ thuật eosin-nigrosin, nigrosin được dùng nhằm làm rõ độ tương phản giữa tinh trùng với nền lam kính; đồng thời, tiêu bản sau nhuộm có thể được bảo quản hoặc sử dụng cho mục đích kiểm tra lại. Quá trình đánh giá cũng cần dựa trên 200 tinh trùng và được lặp lại hai lượt để kiểm soát sai lệch theo bảng giới hạn sai số chấp nhận được. Ngưỡng thấp nhất được chấp nhận cho chỉ số sống là 58%. Xét nghiệm khả năng sống của tinh trùng đặc biệt cần thiết khi tinh trùng

mất vận động hoặc vận động yếu. Tuy vậy, các kỹ thuật nhuộm đã nêu đều gây độc cho tế bào nên không phù hợp để dùng trong điều trị. Khi cần một phương án thay thế, có thể sử dụng thử nghiệm phản ứng trong môi trường nhược trương (Hypo osmotic swelling test - HOST). Tinh trùng được đưa vào dung dịch có áp suất thẩm thấu thấp; những tinh trùng còn sống sẽ biểu hiện bằng hiện tượng đuôi phồng căng và cuộn lại.

Mật độ tinh trùng:

Khi hiện tượng phóng tinh diễn ra bình thường, đường dẫn tinh không bị tắc nghẽn và khoảng thời gian kiêng xuất tinh đủ phù hợp, tổng số tinh trùng thu được trong mỗi lần xuất tinh có mối liên quan với kích thước tinh hoàn. Trước khi xác định mật độ, mẫu cần được hòa trộn đồng nhất; sau khi đưa mẫu vào buồng đếm, nên để yên khoảng 1 phút nhằm ổn định rồi mới bắt đầu quan sát.

2.3.2 Quy trình thu hồi và xử lý mẫu tinh trùng thu được từ mào tinh (MESA, PESA) trước khi đông lạnh

Các bước thu mẫu tinh trùng từ mào tinh:

- Bước 1: Sát khuẩn bộ phận sinh dục, vùng bẹn, đùi . Trải sẵn vô khuẩn để hờ vùng bìu để làm thủ thuật.
- Bước 2: Giảm đau gây tê tại chỗ .Xác định và cố định mào tinh (lựa chọn bên mào tinh căng, to).
- Bước 4: Chuẩn bị bơm tiêm 1ml có chứa sẵn 0,5 ml môi trường nuôi dưỡng MHMC. Bác sĩ cùng điều dưỡng cố định tinh hoàn và mào tinh.
- Bước 5: Bác sĩ tiến hành chọc kim vào mào tinh hoàn, vừa hút vừa kéo kim ra. Dịch mào tinh hút ra được nhỏ vào đĩa Petri. Đĩa Petri và ống nghiệm sẽ được chuyển cho chuyên viên phôi tại phòng Lab

- Bước 6: Chuyên viên phôi học sẽ đọc kết quả dưới kính hiển vi để tìm và đánh giá tinh trùng. Sau khi xác định có tinh trùng, bác sĩ sẽ sát khuẩn lại vị trí chọc hút và kết thúc thủ thuật.



Hình 2.1 Mẫu tinh trùng thu nhận từ PESA/MESA (Nguồn: IVFMD)

Các bước xử lý mẫu tinh trùng thu được:

- Bước 1: Mẫu được lọc rửa theo phương pháp ly tâm thang nồng độ với lớp lọc có thể tích 0,3 - 0,3 ml.
- Bước 2: Đặt mẫu lên ống nghiệm đã chuẩn bị lớp lọc. Đối với mẫu có số lượng tinh trùng quá ít, chỉ sử dụng một lớp lọc (lớp upper) với thể tích 0,3 ml.
- Bước 2: Ly tâm mẫu ở 1500 vòng trong 10 phút. Loại bỏ các dịch nổi. Phần cặn lắng được chuyển vào ống nghiệm chứa 3 ml môi trường chuẩn bị tinh trùng.
- Bước 3: Ly tâm ống nghiệm ở 1500 vòng trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi, để lại 0,2 ml phần dịch có chứa tinh trùng.

Đối với mẫu tinh trùng thu được từ mào tinh, khâu xử lý trước đông lạnh có vai trò quan trọng vì mẫu thường có thể tích nhỏ, mật độ tinh trùng thấp và có thể lẫn nhiều thành phần không mong muốn như tế bào biểu mô, hồng cầu, mảnh mô hoặc dịch có độ nhớt cao. Trong quy trình nghiên cứu, mẫu được xử lý bằng ly tâm thang nồng độ và sau đó được rửa lại trong môi trường chuẩn bị tinh trùng trước khi giữ lại phần dịch có chứa tinh trùng. Các bước này nhằm tập trung tinh trùng, giảm tạp chất và tạo

điều kiện thuận lợi cho việc tìm kiếm, lựa chọn tinh trùng sống trước khi đưa vào cryotop.

Việc chỉ sử dụng một lớp lọc trong trường hợp mẫu có số lượng tinh trùng quá ít cho thấy quy trình đã được điều chỉnh theo đặc điểm thực tế của mẫu. Cách tiếp cận này giúp hạn chế nguy cơ thất thoát tinh trùng trong quá trình xử lý, điều đặc biệt quan trọng đối với nhóm bệnh nhân mà số lượng tinh trùng thu được ban đầu đã rất hạn chế.

2.3.2 Quy trình thu và xử lý mẫu tinh trùng thu được từ phẫu thuật trích tinh hoàn (TESE)

Các bước thu mẫu tinh trùng:

Bước 1: Sát khuẩn bộ phận sinh dục, vùng bẹn, đùi, trái sáng vô khuẩn. Phẫu thuật viên dùng tay nâng tinh hoàn và ổ định tinh hoàn sát thành bìu

Bước 2: Bộc lộ tinh hoàn bằng cách rạch giữa bìu hoặc rạch ngang bên tinh hoàn cần lấy mẫu từ từ bóc tách nhẹ nhàng đến lớp bao tinh hoàn

Bước 3: Sử dụng dao mổ rạch tinh hoàn một đường khoảng 3-5mm để bộc lộ các ống sinh tinh

Bước 4: Sử dụng kẹp vi phẫu và kéo cắt các mảnh mô có chứa ống sinh tinh, chuyển mảnh mô vào đĩa có môi trường nuôi dưỡng MHMC

Bước 5: Chuyển mẫu cho phòng Lab để chuyên viên phôi học xử lý mẫu và tìm tinh trùng

Các bước xử lý mẫu mô tinh chứa các ống sinh tinh:

Đặc trưng của mẫu thu nhận từ tinh hoàn là có chứa nhiều thành phần như các ống sinh tinh đã xé nhuyễn, các loại tế bào trong ống sinh tinh và rất nhiều hồng cầu, do đó mẫu cần được lọc rửa và xử lý cẩn thận

- Bước 1: Các chuyên viên phôi học sử dụng kẹp nhọn vi phẫu để xé và nghiền cơ học các mẫu mô để giải phóng tinh trùng trong các ống sinh tinh
- Bước 2: Đặt dịch huyền phù sau khi xé nhuyễn mô tinh hoàn vào ống nghiệm đã chuẩn bị lớp lọc 0,3 ml lớp lọc dưới (lower)
- Bước 3: Ly tâm mẫu ở 1500 vòng trong 5 phút. Loại bỏ các dịch nổi. Phần cặn lắng được chuyển vào ống nghiệm chứa 3ml môi trường chuẩn bị tinh trùng

- Bước 4: Ly tâm ống nghiệm ở 1500 vòng trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi, để lại 0,2 ml phần dịch có chứa tinh trùng
- Bước 5: Hút phần dịch có chứa tinh trùng load vào dải môi trường MHMC trên đĩa peptri có phủ dầu. Đưa đĩa lên kính hiển vi đảo ngược để tìm kiếm tinh trùng
- Bước 6: Tinh trùng tìm được sẽ được hút bằng kim ICSI và đưu sang giọt môi trường sạch để gom lại đem đi trữ đông.



Hình 2.2 Hình ảnh các ống sinh tinh ghi nhận khi thực hiện Micro-TESE

(Nguồn: IVFMD)

Khác với mẫu từ mào tinh, mẫu TESE là mô tinh hoàn đã được lấy ra và xử lý cơ học để giải phóng tinh trùng từ các ống sinh tinh. Vì vậy, mẫu thường chứa nhiều thành phần nền như tế bào mô, hồng cầu và mảnh vụn tế bào. Điều này khiến quá trình tìm kiếm và lựa chọn tinh trùng trước trữ đông trở nên khó khăn hơn so với mẫu PESA/MESA. Trong quy trình nghiên cứu, chuyên viên phôi học phải xé nhỏ mô, lọc rửa, ly tâm và sau đó đưa phần dịch chứa tinh trùng lên đĩa có môi trường MHMC phủ dầu để tìm tinh trùng dưới kính hiển vi đảo ngược.

Việc tinh trùng tìm được được hút bằng kim ICSI và chuyển sang giọt môi trường sạch trước khi trữ đông là bước có ý nghĩa quan trọng. Bước này giúp tách tinh trùng ra khỏi nền mẫu phức tạp, đồng thời tạo điều kiện để tinh trùng được đưa vào môi trường đông trong trạng thái được kiểm soát tốt hơn. Đối với mẫu TESE,

thao tác này càng cần thiết vì chất lượng tinh trùng ban đầu thường thấp hơn và số lượng tinh trùng sử dụng cho đông lạnh rất hạn chế.

2.3.4 Quy trình đông lạnh tinh trùng số lượng ít

Bước 1: Chuẩn bị cọng trữ đông (cryotop) có ghi đầy đủ thông tin (mã cọng, số lượng tinh trùng đông, ngày đông).

Bước 2: Bật kính hiển vi đảo ngược và bàn ấm, lắp kim bắt tinh trùng vào bộ vi thao tác, căn chỉnh kim vào đúng vị trí.

Bước 3: Đặt đĩa đã có tinh trùng lên bàn ấm của kính hiển vi, đưa kim bắt tinh trùng vào dải môi trường. Quan sát ở vật kính 40X, di chuyển bàn kính khi tìm thấy tinh trùng còn sống sẽ dùng kim hút lại và đưa sang giọt môi trường sạch.

Bước 4: Đặt cọng cryotop lên bàn kính hiển vi, nhỏ 2 μ l môi trường chất bảo vệ đông lạnh lên đầu cọng cryotop, vị trí đặt giọt ở gần vị trí đánh dấu màu đen trên đầu cọng cryotop.

Bước 5: Gom 5 tinh trùng đã tìm được từ giọt môi trường sạch bằng kim ICSI và đặt vào giọt môi trường đông, cần lưu ý thao tác tránh làm gãy kim (dẫn đến làm mất tinh trùng tìm được).

Bước 6: Hơ cọng cryotop đã có tinh trùng trên bề mặt nitơ với khoảng cách 4cm/2 phút. Đậy nắp bình nitơ để tránh làm bay hơi.

Bước 7: Hết 2 phút đưa cọng cryotop có tinh trùng vào trong nitơ lỏng, đậy nắp bảo vệ.

2.3.5 Quy trình rã đông tinh trùng số lượng ít

Bước 1: Chuẩn bị đĩa petri để rã đông tinh trùng. Đĩa petri 35mm được nhỏ 2 giọt môi trường HTF môi giọt 2 μ l, 1 giọt môi trường kiểm tra di động của tinh trùng Pentoxifyline 2 μ l, 1 giọt HOST 50 μ l. Đĩa được ủ ấm ở 37°C ít nhất 30 phút trước khi sử dụng.

Bước 2: Bật kính hiển vi đảo ngược, gắn kim bắt tinh trùng vào bộ vi thao tác, căn chỉnh kim vào đúng vị trí.

Bước 3: Lấy cọng trữ tinh trùng ra khỏi nitơ lỏng, kiểm tra thông tin ghi trên thân (mã số cọng, số lượng tinh trùng đông, thời gian đông). Mở nắp và đưa nhanh (1-2 giây) vào giọt môi trường rửa HTF thứ 1 để lấy tinh trùng ra khỏi cọng trữ, tiếp

tục đưa vào giọt môi trường rửa HTF số 2 để thu nốt các tinh trùng còn sót lại trên cọng trũ.

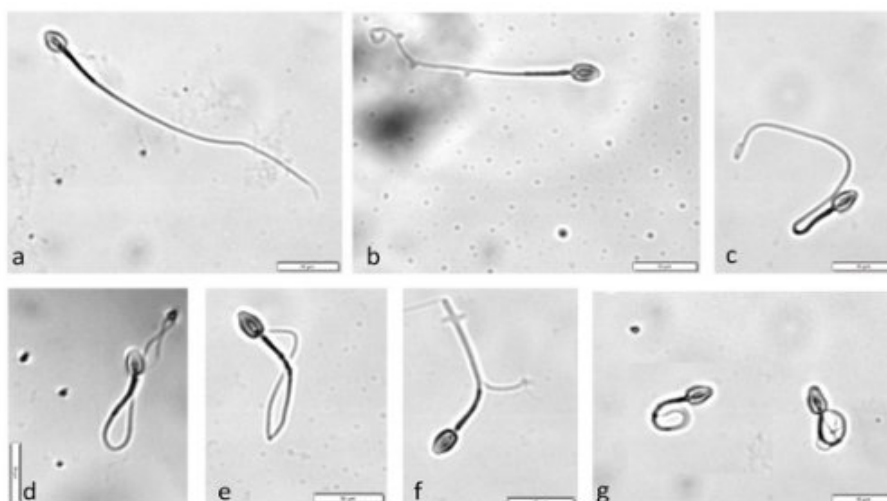
Bước 4: Đưa đĩa lên bàn kính hiển vi soi nổi để kiểm tra số lượng và chất lượng tinh trùng thu hồi được. Các tinh trùng di động sẽ được đánh giá là tinh trùng sống.

Bước 5: Dùng kim ICSI đưa các tinh trùng bất động sang giọt môi trường Pentoxifyline để kiểm tra tính di động. Nếu các tinh trùng có di động sẽ được đánh giá là tinh trùng sống.

Bước 6: Các tinh trùng sau khi kiểm tra ở môi trường Pentoxifyline vẫn bất động sẽ được đưa sang giọt môi trường HOST để kiểm tra sống/chết. Những tinh trùng có phản ứng (cong, cuộn tròn đuôi) được đánh giá là tinh trùng sống.

2.3.6 Đánh giá tỷ lệ thu hồi và tỷ lệ sống của tinh trùng sau rã đông

Tinh trùng thu được sau rã đông sẽ được đánh giá các chỉ tiêu là tỷ lệ sống, tỷ lệ thu hồi



Hình 2.3 Tinh trùng dương tính với HOST (b,c,d,e,f,g)

Tỷ lệ thu hồi (%) = số tinh trùng thu được sau rã/ số tinh trùng đông Tỷ lệ sống (%) = số tinh trùng di động và dương tính với HOST/ số tinh trùng thu được sau rã
Chỉ tiêu đánh giá tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng sau rã đông

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ thu hồi và tỷ lệ sống cần được hiểu là hai chỉ tiêu có ý nghĩa khác nhau. Một nhóm môi trường đông có thể cho tỷ lệ thu hồi cao, nghĩa là sau rã đông tìm lại được nhiều tinh trùng hơn, nhưng điều đó chưa đồng nghĩa với việc tất cả tinh trùng thu hồi được đều còn sống. Ngược lại, tỷ lệ sống cho biết trong số tinh trùng đã thu hồi, có bao nhiêu tinh trùng còn di động hoặc có phản ứng dương tính với HOST.

Cách đánh giá tinh trùng sống bằng quan sát di động, kiểm tra đáp ứng với Pentoxifyline và thử nghiệm HOST là phù hợp với đặc điểm của tinh trùng số lượng ít. Đặc biệt, với những tinh trùng bất động sau rã đông, việc tiếp tục kiểm tra bằng HOST giúp hạn chế bỏ sót các tinh trùng còn sống nhưng không biểu hiện vận động rõ ràng. Vì vậy, khi diễn giải kết quả, cần phân tích đồng thời cả hai tỷ lệ thay vì chỉ dựa vào một chỉ tiêu đơn lẻ.

2.4 Nội dung nghiên cứu

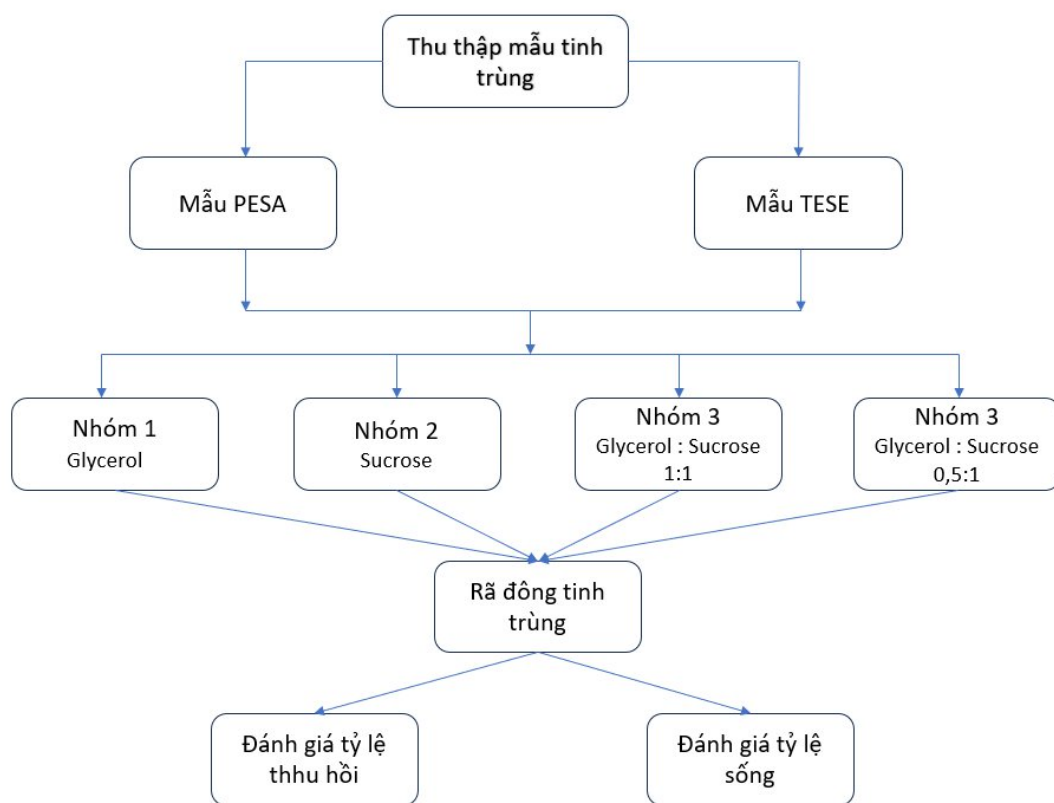
Nội dung 1: Ảnh hưởng của CPA nội bào và ngoại bào đến chất lượng tinh trùng thu được từ chọc hút mào tinh (PESA) và trích xuất tinh hoàn (TESE).

Nội dung 2: So sánh 4 loại môi trường đông lạnh, bao gồm: môi trường chứa Glycerol, môi trường chứa Sucrose, phối hợp Glycerol và Sucrose (tỷ lệ 1:1), và phối hợp Glycerol và Sucrose (tỷ lệ 0,5:1).

Nội dung 3: Đánh giá chất lượng tinh trùng sau rã đông qua 2 chỉ tiêu chính là tỷ lệ thu hồi (khả năng bảo toàn mẫu) và tỷ lệ sống (dựa trên độ di động hoặc phản ứng dương tính với HOST).

2.5 Phương pháp thống kê

Các dữ liệu được nhập trên Microsoft Excel (bản 2019), sau đó phân tích bằng SPSS (version 20.0)



Hình 2.4 Quy trình nghiên cứu

PHẦN III. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1 Kết quả nghiên cứu

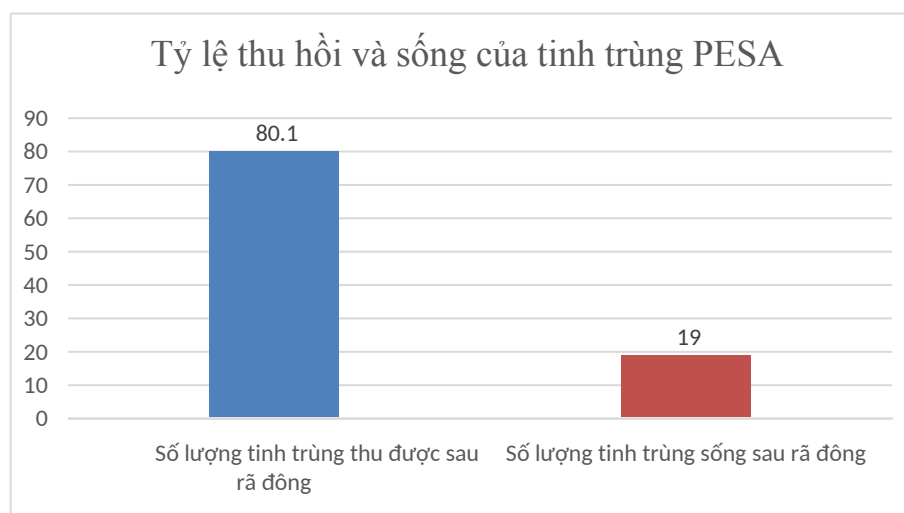
Các nhóm nghiên cứu có điểm chung là cùng sử dụng cryotop làm dụng cụ chứa, cùng quy trình đông lạnh, cùng điều kiện rã đông và cùng phương pháp tính kết quả. Điều này giúp hạn chế sự khác biệt do dụng cụ, thao tác rã đông hoặc phương pháp đánh giá gây ra.

3.1.1 Kết quả nhóm 1 (sử dụng Glycerol)

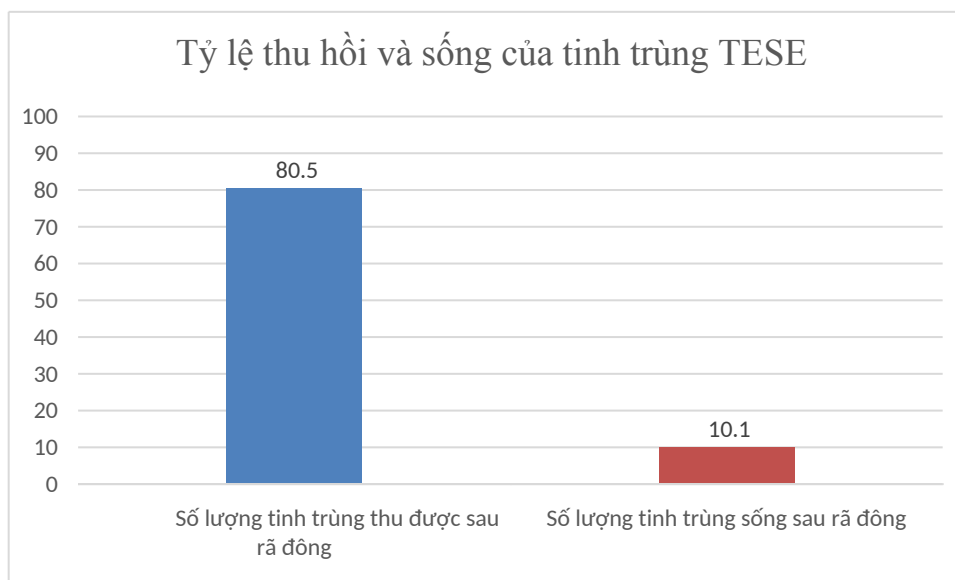
Bảng 3.1 Ảnh hưởng của Glycreol đến tỷ lệ thu hồi và sống của hai loại tinh trùng PESA,TESE

Nguồn TT	Số lượng TT trữ đông (tinh trùng)	Số lượng TT thu hồi sau rã đông (tinh trùng)	Số lượng TT sống sau rã đông (tinh trùng)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Tỷ lệ sống (%)
PESA	1000	801	153	80.1	19.1
TESE	1000	805	81	80.5	10.1

Sự khác biệt về tỷ lệ thu hồi, $P > 0,05$
Sự khác biệt về tỷ lệ sống, $P < 0,001$



Hình 3.1 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng PESA



Hình 3.2 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng TESE

Ở nhóm 1 sử dụng môi trường đông chứa Glycerol tỷ lệ thu hồi tinh trùng PESA đạt 80,1%, tỷ lệ thu hồi tinh trùng TESE đạt 80,5%. Như vậy chưa ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa về tỷ lệ thu hồi giữa các nhóm môi trường đông lạnh trong phạm vi nghiên cứu.

Tỷ lệ sống của PESA đạt 19,1% còn TESE đạt khoảng 10,1%. Từ đó cho thấy đối với mẫu tinh trùng TESE, PESA thì Glycerol đơn thuần cho thấy hiệu quả thấp trong bảo tồn khả năng sống của tinh trùng sau rã đông.

Nhóm Glycerol là nhóm có kết quả thấp nhất về tỷ lệ sống ở cả hai mẫu tinh trùng PESA và TESE. Tuy nhiên cũng không kết luận Glycerol “không có tác dụng” trong bảo quản lạnh tinh trùng vì đối với những mẫu tinh trùng thu được từ xuất tinh bình thường (mẫu có mật độ lớn, tinh trùng trưởng thành và di động tốt) Glycerol vẫn được lựa chọn sử dụng.

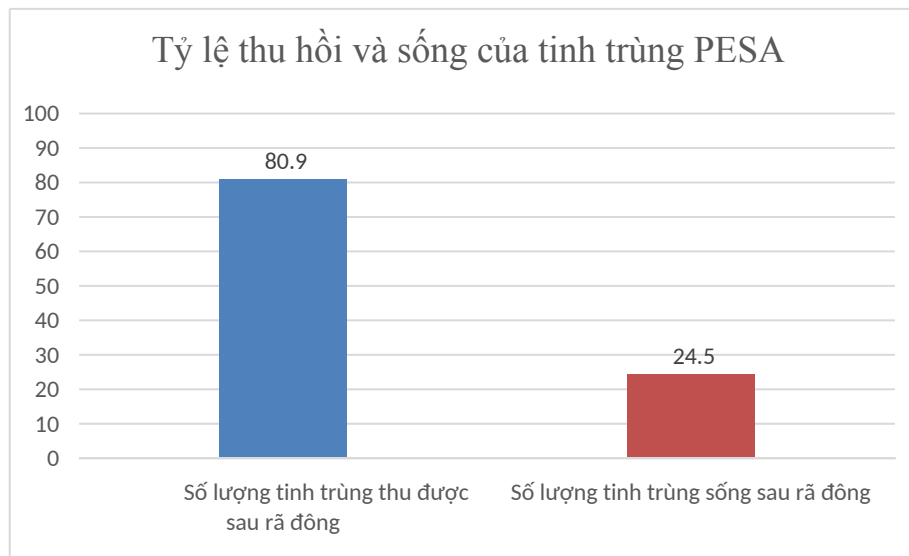
Glycerol có khả năng thấm vào trong tế bào và hỗ trợ hạn chế tạo tinh thể đá nội bào, nhưng quá trình thấm vào và thoát ra khỏi tế bào cũng có thể làm tinh trùng chịu thay đổi áp suất thẩm thấu. Đối với tinh trùng PESA và TESE (đa số là tinh trùng có màng tế bào chưa trưởng thành hoàn toàn) thì sự thay đổi thẩm thấu này có thể ảnh hưởng đến khả năng duy trì tính toàn vẹn, làm tổn thương màng tế bào sau rã đông.

3.1.2 Kết quả nhóm 2 (sử dụng Sucrose)

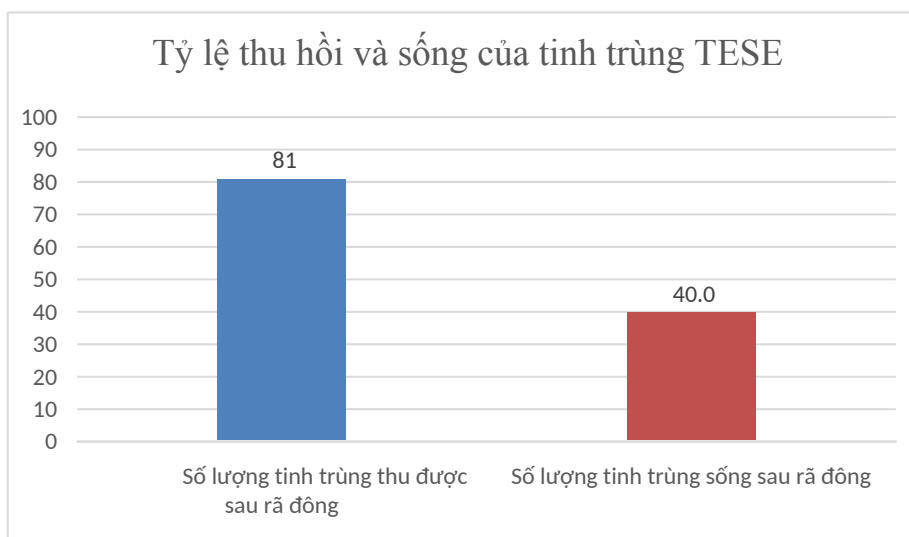
Bảng 3.2 Ảnh hưởng của Sucrose đến tỷ lệ thu hồi và sống của hai loại tinh trùng PESA, TESE

Nguồn TT	Số lượng TT trữ đông (tinh trùng)	Số lượng TT thu hồi sau rã đông (tinh trùng)	Số lượng TT sống sau rã đông (tinh trùng)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Tỷ lệ sống (%)
PESA	1000	808	198	80.8	24.5
TESE	1000	810	324	81	40.0

Sự khác biệt về tỷ lệ thu hồi, $P > 0,05$
Sự khác biệt về tỷ lệ sống, $P < 0,001$



Hình 3.3 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng PESA



Hình 3.4 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng TESE

Ở nhóm sử dụng Sucrose đơn thuần tỷ lệ thu hồi tinh trùng PESA đạt 80,8%, còn TESE đạt 81%. Như vậy chưa ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa về tỷ lệ thu hồi giữa các nhóm môi trường đông lạnh trong phạm vi nghiên cứu. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Y. Chen (2014) hay Yuji Endo (2012).

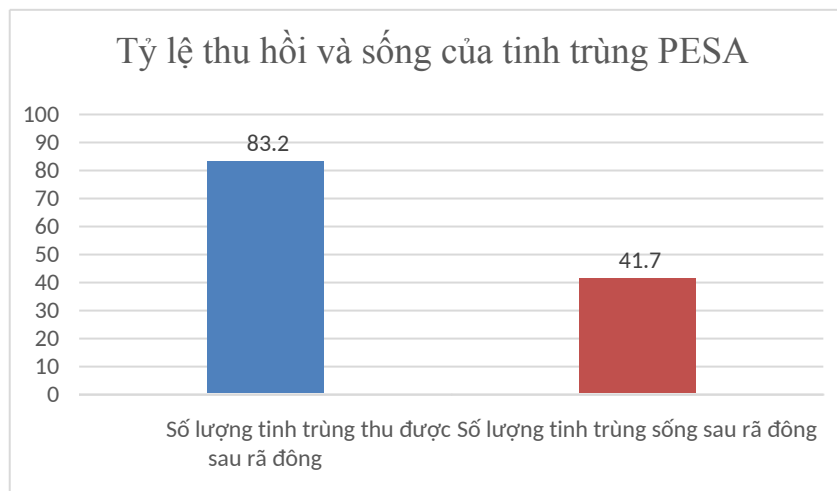
Sự khác biệt rõ hơn được ghi nhận ở tỷ lệ sống. Ở mẫu PESA tỷ lệ sống tăng lên 25,4%, ở mẫu TESE tỷ lệ sống tăng lên 40%. Như vậy, so với Glycerol thì Sucrose cho kết quả tốt hơn đặc biệt là về tỷ lệ sống của tinh trùng thu được ở mẫu tinh trùng thủ thuật.

Kết quả này cho thấy với tinh trùng TESE phần lớn là tinh trùng có màng tế bào chưa trưởng thành thì yếu tố kiểm soát môi trường ngoại bào và quá trình mất nước tế bào có thể đóng vai trò quan trọng trong bảo tồn khả năng sống sau rã đông. Vậy nên việc sử dụng Sucrose đã ghi nhận tỷ lệ sống ở tinh trùng TESE cao nhất. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Yuji Endo (2012) khi cho tỷ lệ tinh trùng sống của nhóm sử dụng Sucrose là 65,3% so với nhóm Glycerol là 37,3%.

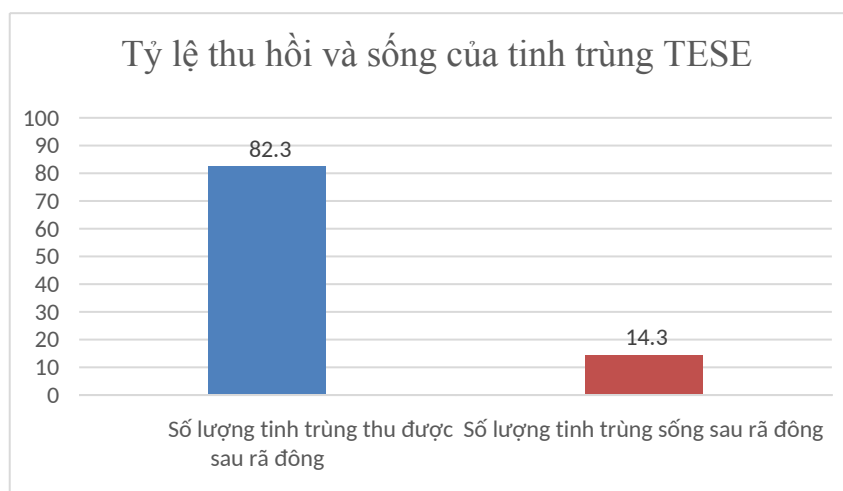
3.1.3 Kết quả nhóm 3 (sử dụng Glycerol và Sucrose với tỷ lệ 1:1)

Bảng 3.3 Ảnh hưởng của môi trường đông chứa Glycerol và Sucrose với tỷ lệ 1:1 đến tỷ lệ thu hồi và sống của hai loại tinh trùng PESA, TESE

Nguồn TT	Số lượng TT trữ đông (tinh trùng)	Số lượng TT thu hồi sau rã đông (tinh trùng)	Số lượng TT sống sau rã đông (tinh trùng)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Tỷ lệ sống (%)
PESA	1000	832	347	83.2	41.7
TESE	1000	823	118	82.3	14.3
Sự khác biệt về tỷ lệ thu hồi, $P > 0,05$ Sự khác biệt về tỷ lệ sống, $P < 0,001$					



Hình 3.5 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng PESA



Hình 3.6 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng TESE

Ở nhóm phối hợp Glycerol và Sucrose tỷ lệ 1:1, tỷ lệ thu hồi tinh trùng PESA đạt 83,2%, còn TESE đạt 82,3%. Như vậy chưa ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa về tỷ lệ thu hồi giữa các nhóm môi trường đông lạnh trong phạm vi nghiên cứu.

Tuy nhiên tỷ lệ sống của nhóm 3 cần được phân tích riêng theo nguồn mẫu. Với mẫu PESA, tỷ lệ sống đạt khoảng 41,7%, cao hơn rõ rệt so với nhóm Glycerol và nhóm Sucrose đơn thuần. Điều này cho thấy với tinh trùng từ mào tinh thì việc sử dụng phối hợp Glycerol và Sucrose tỷ lệ 1:1 đã cải thiện tỷ lệ tinh trùng sống sau rã đông.

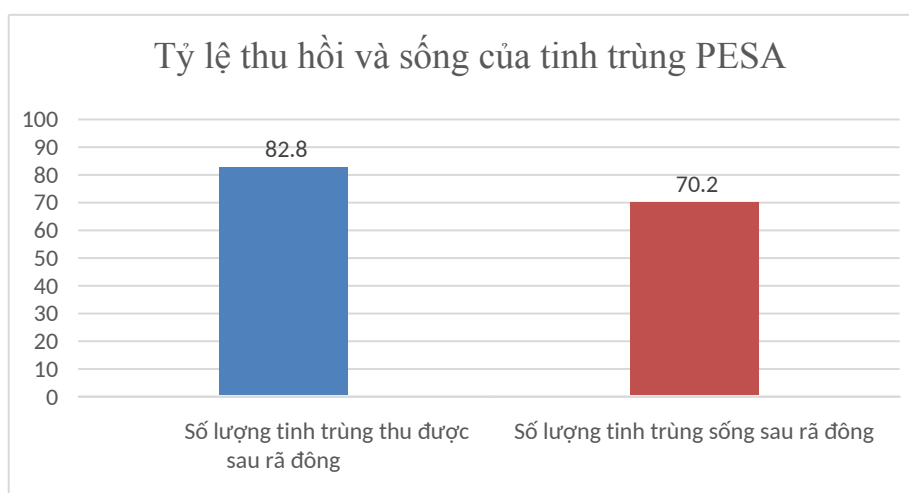
Với mẫu TESE thì tỷ lệ sống của nhóm 3 chỉ đạt khoảng 14,3%, thấp hơn nhóm Sucrose đơn thuần. Vì vậy xét tỷ lệ sống nhóm 3 lại không phải lựa chọn tốt nhất cho tình trạng TESE.

3.1.4 Kết quả nhóm 4 (sử dụng Glycerol và Sucrose với tỷ lệ 0.5:1)

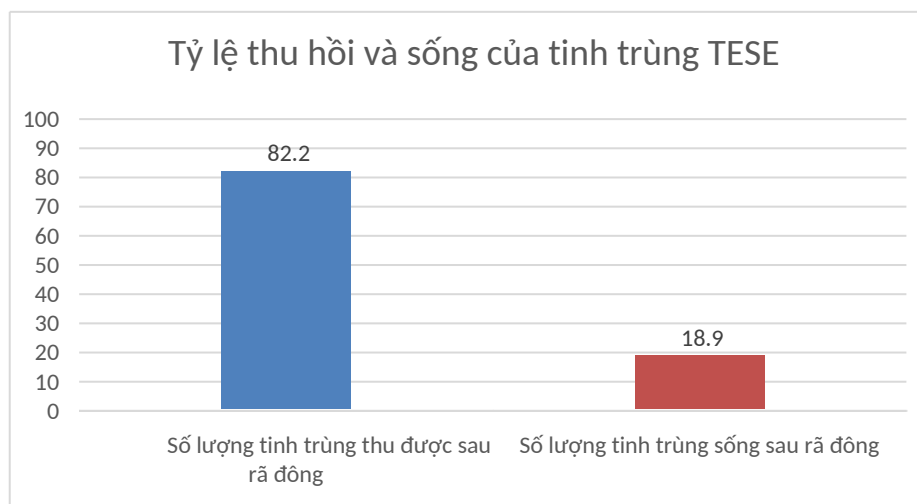
Bảng 3.4 Ảnh hưởng của môi trường đông chứa Glycerol và Sucrose với tỷ lệ 0,5:1 đến tỷ lệ thu hồi và sống của hai loại tinh trùng PESA, TESE

Nguồn TT	Số lượng TT trữ đông (tinh trùng)	Số lượng TT thu hồi sau rã đông (tinh trùng)	Số lượng TT sống sau rã đông (tinh trùng)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Tỷ lệ sống (%)
PESA	1000	828	581	82.8	70.2
TESE	1000	822	155	82.2	18.9

Sự khác biệt về tỷ lệ thu hồi, $P > 0,05$
Sự khác biệt về tỷ lệ sống, $P < 0,001$



Hình 3.7 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng PESA



Hình 3.8 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng TESE

Ở nhóm phối hợp Glycerol và Sucrose tỷ lệ 0,5:1, tỷ lệ thu hồi của PESA đạt 82,6% và TESE đạt 82,2% thì kết quả tương đương với nhóm phối hợp tỷ lệ 1:1. Như vậy về, việc thay đổi tỷ lệ phối hợp Glycerol và Sucrose từ tỷ lệ 1:1 sang 0,5:1 chưa ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa về tỷ lệ thu hồi giữa các nhóm môi trường đông lạnh trong phạm vi nghiên cứu.

Điểm khác biệt lớn nhất của nhóm 4 nằm ở tỷ lệ sống của tinh trùng PESA. Tỷ lệ sống PESA ở nhóm này đạt 70,2%.

Kết quả này cho thấy với tinh trùng thu từ mào tinh, công thức phối hợp Glycerol và Sucrose tỷ lệ 0,5:1 có thể tạo điều kiện thuận lợi hơn cho việc duy trì tinh trùng sống sau rã đông so với các nhóm còn lại. Như vậy việc kết hợp Glycerol + Sucrose tỷ lệ 0,5:1 cho kết quả tốt với mẫu PESA. Sự khác biệt này một lần nữa cho thấy nguồn gốc tinh trùng là yếu tố có ảnh hưởng lớn đến đáp ứng sau đông rã.

3.2 Phân tích yếu tố liên quan đến tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng sau rã đông.

Trước khi phân tích các yếu tố liên quan cần nhấn mạnh rằng kết quả nghiên cứu nên được đọc theo hai lớp. Lớp thứ nhất là so sánh giữa các môi trường đông trong cùng một nguồn mẫu. Cách đọc này giúp xác định môi trường nào có kết quả thuận lợi hơn đối với PESA hoặc TESE. Lớp thứ hai là

so sánh giữa PESA và TESE trong cùng một môi trường đông. Cách đọc này giúp đánh giá ảnh hưởng của nguồn gốc tinh trùng đến kết quả sau rã đông.

3.2.1 Ảnh hưởng của chất lượng tinh trùng thu được từ chọc hút mào tinh PESA

Đặc điểm của tinh trùng thu nhận qua thủ thuật hút dịch từ mào tinh (PESA) phụ thuộc nhiều vào nguyên nhân vô sinh nam, tình trạng mào tinh và thời điểm thu mẫu. Tuy nhiên phần lớn tinh trùng từ PESA đã trải qua giai đoạn hoàn thiện, có khả năng di động tốt, màng tế bào ổn định, hình thái hoàn thiện hơn khi đối chiếu với mẫu tinh trùng lấy bằng kỹ thuật TESE. Do đó nhóm PESA có tỷ lệ tinh trùng sống cao hơn nhóm TESE, tuy nhiên tỷ lệ thu hồi không có sự khác biệt lớn (80,1%, 80,9%, 83,2% và 82,8%)

Bảng 3.5 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng sau rã đông ở mẫu PESA

Tỷ lệ thu hồi của tinh trùng sau rã đông ở mẫu PESA				
	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3	Nhóm 4
Tỷ lệ thu hồi (%)	80,1	80,9	83,2	82,8
Tỷ lệ sống của tinh trùng sau rã đông ở mẫu PESA				
	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3	Nhóm 4
Tỷ lệ sống (%)	19,1	24,5	41,7	70,2

Đối với mẫu PESA tỷ lệ tinh trùng sống sau rã cao nhất ở nhóm 4 (với tỷ lệ CPA Glycerol : Sucrose là 0,5:1) là 70,2%.

3.2.2 Ảnh hưởng của chất lượng tinh trùng thu được từ trích xuất tinh hoàn TESE

Vì màng tế bào vẫn chưa phát triển đầy đủ nên tinh trùng TESE dễ bị tổn thương cấu trúc và chức năng sau quá trình đông rã, làm giảm số lượng tinh trùng sống thu được sau rã đông.

Trong toàn bộ bốn nhóm nghiên cứu, tỷ lệ thu hồi của TESE đều thấp hơn PESA. Tuy nhiên tỷ lệ thu hồi của mẫu TESE cũng không có sự khác biệt lớn (80,5%, 81%, 82,3% và 82,2%).

Bảng 3.6 Tỷ lệ thu hồi và sống của tinh trùng sau rã đông ở mẫu PESA

Tỷ lệ thu hồi của tinh trùng sau rã đông ở mẫu TESE				
	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3	Nhóm 4
Tỷ lệ sống của tinh trùng sau rã đông ở mẫu TESE				
	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3	Nhóm 4
Tỷ lệ sống (%)	10,1	40	14,3	18,9

Đối với tỷ lệ sống TESE ở nhóm Sucrose đơn thuần đạt tỷ lệ sống 40%, cao hơn các nhóm còn lại. Vì vậy đối với tinh trùng TESE việc sử dụng Sucrose đem lại tỷ sống hiệu quả hơn các nhóm khác.

3.2.3 Ảnh hưởng của chất bảo vệ đông lạnh chứa CPA ngoại bào (Sucrose) và CPA nội bào (Glycerol)

Bảng 3.7 Tỷ lệ sống của tinh trùng sau rã đông khi sử dụng Glycerol

Tỷ lệ sống của tinh trùng sau rã đông khi sử dụng Glycerol	
PESA	19,1
TESE	10,1

CPA nội bào (Glycerol) có thể thẩm thấu qua màng tế bào để xâm nhập vào tinh trùng, qua đó bảo vệ cấu trúc tế bào trước những hư hại phát sinh trong giai đoạn bảo quản lạnh và rã đông gây ra. Glycerol có thể đảm nhận vai trò thay thế một phần lượng nước tự do ở trong tế bào. Khi thâm nhập vào bào tương, những phân tử Glycerol tạo liên kết với nước thông qua cầu nối hydro, góp phần giảm lượng nước có khả năng kết tinh. Đồng thời làm hạ điểm đông đặc của môi trường nội bào, nhờ vậy kìm hãm quá trình hình thành các tinh thể băng kích thước lớn.

Sự thay đổi áp suất thẩm thấu là một nguyên nhân chủ yếu dẫn đến hư hại tế bào trong giai đoạn đông lạnh và rã đông tinh trùng. Khi nhiệt độ giảm, nước ngoại bào bắt đầu đông kết sớm hơn, khiến hàm lượng các chất tan tăng lên ở môi trường ngoài tế bào. Điều này làm phát sinh sự khác biệt về áp suất thẩm thấu giữa môi

trường ngoại bào và nội bào, làm cho nước thoát khỏi tế bào. CPA nội bào giúp điều hòa quá trình dịch chuyển nước bằng cách gia tăng áp suất thẩm thấu nội bào. Khi CPA khuếch tán đến bên trong tinh trùng, mức khác biệt về nồng độ giữa nội bào và khu vực ngoại bào giảm xuống, từ đó giúp giảm thiểu hiện tượng mất nước hoặc hút nước quá mức.

CPA nội bào có nguy cơ tạo độc tính, stress thẩm thấu và tăng stress oxy hóa gây suy giảm chất lượng tinh trùng sau khi rã đông nếu tiếp xúc ở nồng độ lớn.

Bảng 3.8 Tỷ lệ sống của tinh trùng sau rã đông khi sử dụng Sucrose

Tỷ lệ sống của tinh trùng sau rã đông khi sử dụng Sucrose	
PESA	24,5
TESE	40

CPA ngoại bào (Sucrose) chủ yếu tác động lên môi trường ngoại bào bằng cách điều hòa áp suất thẩm thấu, giảm hình thành tinh thể đá và ổn định màng tế bào. Khi hạ nhiệt để bảo quản lạnh, phần nước bên ngoài tế bào sẽ kết băng sớm hơn vì nhiệt độ tiếp tục giảm xuống. Sucrose có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát quá trình kết tinh này bằng cách nâng hàm lượng chất tan ở khoang ngoại tế bào, nhờ vậy hạ nhiệt độ đóng băng của dung dịch và kìm hãm sự lớn lên của các tinh thể băng kích thước lớn.

Ngoài ra CPA ngoại bào có chức năng kiểm soát cân bằng thẩm thấu khi diễn ra quá trình làm lạnh. Khi phần nước bên ngoài tế bào chuyển sang trạng thái băng, độ ưu trương của môi trường gia tăng, khiến nước từ trong tế bào di chuyển ra ngoài theo cơ chế thẩm thấu. CPA ngoại bào hỗ trợ quá trình này thông qua việc hình thành môi trường ưu trương ở mức phù hợp, từ đó thúc đẩy sự thoát nước nội bào diễn ra từ từ và ổn định hơn. Nếu quá trình mất nước xảy ra quá nhanh, tinh trùng có thể bị co rút mạnh dẫn đến biến dạng màng và tổn thương cấu trúc tế bào. Ngược lại, nếu mất nước không đầy đủ, lượng nước còn lại trong tế bào có thể tạo thành tinh thể đá nội bào trong giai đoạn hạ nhiệt sâu. Do đó CPA ngoại bào giúp cân bằng quá trình khử nước và hạn chế hiện tượng co rút quá mức của tế bào.

Nhược điểm của CPA ngoại bào là không có khả năng thâm nhập hoặc chỉ thâm nhập rất hạn chế qua màng tế bào tinh trùng. Vì vậy CPA ngoại bào chủ yếu hoạt

động ở môi trường ngoại bào mà không bảo vệ trực tiếp các cơ quan như ty thể, DNA của tinh trùng.

Từ kết quả cho thấy môi trường phối hợp Glycerol và Sucrose có ưu thế rõ hơn đối với mẫu PESA, đặc biệt về tỷ lệ sống sau rã đông. Đối với mẫu TESE, Sucrose đơn thuần cần được xem là nhóm có kết quả đáng chú ý về tỷ lệ sống.

3.2.5. Phân tích về vai trò của tỷ lệ phối hợp Glycerol và Sucrose

Hai nhóm phối hợp trong nghiên cứu sử dụng Glycerol và Sucrose với hai tỷ lệ khác nhau: 1:1 và 0,5:1. Cả hai nhóm đều cho tỷ lệ thu hồi tương đương nhau ở PESA và TESE. Điều này cho thấy thay đổi tỷ lệ phối hợp chưa tạo ra khác biệt về khả năng tìm lại tinh trùng sau rã đông. Tuy nhiên, tỷ lệ sống lại có sự khác biệt rõ, đặc biệt ở PESA.

Bảng 3.9 Tỷ lệ sống của tinh trùng sau rã đông khi sử dụng Glycerol : Sucrose tỷ lệ 1:1 và 0,5:1

Tỷ lệ sống của tinh trùng sau rã đông khi sử dụng Glycerol : Sucrose tỷ lệ 1:1	
PESA	41,7
TESE	14,3
Tỷ lệ sống của tinh trùng sau rã đông khi sử dụng Glycerol : Sucrose tỷ lệ 0,5:1	
PESA	70,2
TESE	18,9

Ở mẫu PESA, tỷ lệ sống tăng từ 41,7% ở nhóm phối hợp 1:1 lên 70,2% ở nhóm phối hợp 0,5:1. Như vậy việc giảm tỷ lệ Glycerol trong công thức phối hợp có liên quan đến tỷ lệ sống ở mẫu PESA. Có thể diễn giải thận trọng rằng tỷ lệ 0,5:1 có thể tạo ra sự cân bằng tốt hơn giữa bảo vệ nội bào và giảm gánh nặng thẩm thấu do CPA nội bào.

Ở mẫu TESE, nhóm phối hợp 0,5:1 cũng có tỷ lệ sống cao hơn nhóm phối hợp 1:1, nhưng mức chênh lệch không lớn (14,3 % so với 18,9%) và đều thấp hơn nhóm Sucrose đơn thuần (40%).

PHẦN IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Nghiên cứu đánh giá 4 loại môi trường đông lạnh trên mẫu tinh trùng số lượng ít (PESA và TESE) bảo quản bằng cryotop rút ra các kết luận trọng tâm sau:

Tỷ lệ thu hồi: Loại môi trường đông lạnh không ảnh hưởng đáng kể đến khả năng thu hồi tinh trùng; cả 4 nhóm thử nghiệm đều đạt tỷ lệ thu hồi tốt (>80%).

Tỷ lệ sống theo đặc thù nguồn mẫu:

- Mẫu PESA: Sự phối hợp giữa chất bảo vệ đông lạnh nội bào và ngoại bào (Glycerol : Sucrose tỷ lệ 0,5 : 1) cho hiệu quả tối ưu, đạt tỷ lệ sống cao nhất (70,2%).

- Mẫu TESE: Sử dụng đơn thuần CPA ngoại bào (Sucrose) mang lại hiệu quả bảo tồn tỷ lệ sống sau rã đông cao hơn so với các công thức phối hợp (40%)

Một ý nghĩa khác của nghiên cứu là nhấn mạnh vai trò của chuẩn hóa thao tác. Vì mỗi cọng cryotop chỉ chứa số lượng tinh trùng rất ít, sai lệch nhỏ trong thao tác bất tinh trùng, đặt tinh trùng vào giọt môi trường, hơ trên bề mặt nitơ hoặc rã đông đều có thể ảnh hưởng đến kết quả. Do đó, ngoài lựa chọn môi trường đông, các labo cần xây dựng quy trình thao tác thống nhất, đào tạo chuyên viên phối hợp và kiểm soát chất lượng thường xuyên khi áp dụng kỹ thuật này.

4.2. Kiến nghị

- Nghiên cứu mức độ tổn thương DNA, chức năng ty thể của tinh trùng sau quá trình đông rã

- Nghiên cứu rõ hơn về sự khác biệt về đặc điểm bệnh nhân và chất lượng mẫu ban đầu

- Mở rộng nghiên cứu sâu hơn nhằm theo dõi kết quả thực tế sử dụng mẫu đông lạnh để có kết luận về ý nghĩa lâm sàng thực tế

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Esteves S.C., Miyaoka R., & Orosz J. (2013). *An update on sperm retrieval techniques for azoospermic males*. *Clinics*.68(Suppl 1):99–110 .
<https://doi.org/10.6061/clinics/2013>
2. Bernie, A. M., Mata, D. A., & Ramasamy, R. (2015). Comparison of microdissection testicular sperm extraction, conventional TESE, and testicular sperm aspiration for nonobstructive azoospermia: A systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 104(5), 1099–1103.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.07.1136>
3. Mangoli, V., Evgeni, E., & Wyns, C. (2025). Sperm cryopreservation protocol for micro-TESE-retrieved sperm. *Asian Journal of Andrology*, 27(3), 392–398. <https://doi.org/10.4103/aja202466>
4. Watson P.F. *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*. *Animal Reproduction Science*. 2000;60–61:481–492.
5. Mazur, P. (2004). Principles of cryobiology. In B. J. Fuller, N. Lane, & E. E. Benson (Eds.), *Life in the frozen state* (pp. xx–xx). CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9780203647073.ch1>
6. O’Connell, M., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17(3), 704–709.
<https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.704>
7. World Health Organization (WHO). *Laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed.
8. Đỗ, N. L., Nguyễn, T. T., Trịnh, T. S., Nguyễn, T. T. A., Lê, T. H., & Đào, N. H. (2025). Hiệu quả kỹ thuật thủy tinh hóa cải biên có và không chất bảo quản lạnh trên nhóm tinh trùng số lượng ít. *Tạp chí Y Dược học Quân sự*, 50(SI4), 453–460. Esteves, S. C., & Agarwal, A. (2011).

9. *Sperm retrieval techniques*. In *Human Assisted Reproductive Technology*. Cambridge University Press. Doi:10.1590/s1677-55382011000500002
10. Shah, R., & Gupta, C. (2017). Advances in sperm retrieval techniques in azoospermic men: A systematic review. *Arab Journal of Urology*, 15(2), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.010>
11. Borate, G. M., et al. (2022). Cryopreservation of sperm: A review. *Cureus*, 14(10), e29964. <https://doi.org/10.7759/cureus.29964>
12. Le, M. T., et al. (2019). Effects of conventional freezing versus vitrification on human sperm. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 12(3), 212–218. Doi: 10.1080/14647273.2019.1698774
13. Patel, D. D., et al. (2002). Effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Journal of Andrology*, 23(2), 263–270. Doi: 10.1093/humrep/17.3.704
14. Kim, J. H., et al. (2019). Does conventional freezing affect sperm DNA fragmentation? *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 46(4), 168–173. <https://doi.org/10.5653/cerm.2019.02945>
15. Li, Q., et al. (2012). Effect of freezing–thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. *Cryobiology*, 65(3), 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.07.004>
16. Smith, A. B., et al. (2008). *Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa*. *Fertility and Sterility*, 90(5), 1775–1784.
17. Pregnancy outcome and neonatal data after ICSI with different durations of testicular sperm cryopreservation. (2013). *Fertility and Sterility*, 100(4), 1234–1240. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg403>

18. Ozimic, S. (2023). Sperm cryopreservation today: Approaches, efficiency, cryodamage and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2156. <https://doi.org/10.3390/ijms24032156>
19. Kurihara, M. (2021). Comparative study of carriers for cryopreservation of very small numbers of sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 19, Article number. <https://doi.org/10.5653/cerm.2024.07241>
20. ESHRE. (2020). Good practice recommendations for cryopreservation of human gametes and embryos. *Human Reproduction*, 35(5), 1–15. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaf106>
21. World Health Organization. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (5th ed.). World Health Organization.
22. Day, J. G., & Stacey, G. N. (2007). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Humana Press.
23. CryoLetters. (2022). Review of cryodevices for gamete and gonadal tissue vitrification. *CryoLetters*, 43. <https://doi.org/10.54680/fr22310110112>
24. Kitazato Corporation. (2024). *Cryotop® oocyte/embryo vitrification device: Product information*. <https://www.kitazato.co.jp>
25. Intesco Co., LTD. (n.d.). *Dụng cụ trữ noãn/phôi Cryotop (Nhật) – mô tả sản phẩm và đặc tính*.
26. American Society for Reproductive Medicine. (2013). *Guidelines for cryopreservation of gametes and embryos*. *Fertility and Sterility*, 99(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.028>
27. WHO. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (5th ed.). World Health Organization.

28. Gao, D., & Critser, J. K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR Journal*, 41(4), 187–196. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187>
29. Mazur, P. (2004). *Principles of cryobiology*. In B. J. Fuller, N. Lane, & E. E. Benson (Eds.), *Life in the frozen state* (pp. xx–xx). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203647073.ch1>
30. ESHRE (2020). *Good practice recommendations for cryopreservation of human gametes and embryos*. *Human Reproduction*, 35(5), 1–15. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaf106>.
31. WHO (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (5th ed.).
32. ASRM (2013). *Guidelines for cryopreservation of gametes and embryos*. *Fertility and Sterility*.
33. Benjamin P Best. (2015). *Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction*. *Cryobiology*, 48(1), 22–35. Doi: 10.1089/rej.2014.1656
34. Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CA, Trounson AO, de Kretser DM. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1985;2:119–22. Doi:10.1007/BF01131497.
35. Surgical sperm retrieval: Techniques and their indications, Rupin Shah 1, Author information Copyright and License information. Doi:10.4103/0970-1591.78439
36. Shrivastav P, Nadkarni P, Wensvoort S, Craft I. Hút tinh trùng mào tinh hoàn qua da để điều trị vô sinh do tắc nghẽn. *Hum Reprod*. 1994;9:2058–61. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138393.
37. Turek PJ, Givens CR, Schriock ED, Meng MV, Pedersen RA, Conaghan J. Trích xuất tinh trùng từ tinh hoàn và tiêm tinh trùng vào bào tương trứng dưới hướng dẫn của bản đồ chọc hút kim nhỏ trước đó ở bệnh nhân vô tinh

không do tắc nghẽn. *Fertil Steril*. 1999;71:552–7. Doi: 10.1016/s0015-0282(98)00499-3.

38. Shah RS. Recent Advances in Infertility Management. In: Goenka ML, Goenka D, editors. *Operative sperm retrieval for ART*. Guwahati: Goenka; 2001. pp. 179–83. Doi:10.4103/0970-1591.98439
39. Schlegel PN. Vô tinh không do tắc nghẽn: một phương pháp phẫu thuật mang tính cách mạng và kết quả. *Semin Reprod Med*. 2009;27:165–70. Doi: 10.1055/s-0029-1202305.
40. Nguyen, T. T., Tran, V. T., Do, N. L., Nguyen, T. T. A., Ho, S. H., & Trinh, T. S. (2024). Đánh giá hiệu quả vitrification không sử dụng CPA trên tinh trùng người ở Việt Nam. *Tạp chí y dược học quân sự*. [https://DOI : 10.56535/jmpm.v49i4.588](https://doi.org/10.56535/jmpm.v49i4.588).
41. Endo, Y., et al. (2012). Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online*, 24(3), 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.11.009>.
42. Chen, Y., et al. (2014). Small-volume vitrification for human spermatozoa in the absence of cryoprotectants using Cryotop. *Andrologia*, 47(6), 694–699. <https://doi.org/10.1111/and.12320>
43. AbdelHafez, F., Bedaiwy, M. A., El-Nashar, S. A., Sabanegh, E., & Desai, N. (2009). Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: A systematic review. *Human Reproduction Update*, 15(2), 153–164. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn052>
44. O'Connell, M., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and DNA integrity. *Human Reproduction Update*, 8(4), 315–328. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.4.315>

45. AbdelHafez, F., Bedaiwy, M. A., El-Nashar, S. A., Sabanegh, E., & Desai, N. (2009). Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: A systematic review. *Human Reproduction Update*, 15(2), 153–164
46. Endo, Y., Fujii, Y., Shintani, K., Seo, M., Motoyama, H., & Funahashi, H. (2011). Single spermatozoon freezing using Cryotop. *Journal of Mammalian Ova Research*, 28(1), 47–52. <https://doi.org/10.1274/jmor.28.47>

Hà Nội, tháng 05 năm 2026

HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

HỌC VIÊN

TS. Đinh Thị Thu Lê

Cao Xuân Ngọc