



## CẬP NHẬT KIẾN THỨC VỀ CÁC PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM ĐỘ PHÂN MẢNH DNA CỦA TINH TRÙNG TRONG CÔNG TÁC HỖ TRỢ SINH SẢN VÀ ĐIỀU TRỊ HIẾM MUỘN / VÔ SINH Ở NAM GIỚI

**ThS. Nguyễn Đức Long<sup>(2)</sup>, ThS. Nguyễn Thị Hoa<sup>(1)</sup>  
TS. Lê Văn Sơn<sup>(2)</sup>, PGS. TS. Hoàng Thị Ngọc Lan<sup>(1)</sup>  
PGS. TS. Trần Danh Cường<sup>(1)</sup>**

<sup>(1)</sup>Trung tâm Chẩn đoán trước sinh, Bệnh viện Phụ Sản Trung ương

<sup>(2)</sup>Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học

*Phân mảnh vật chất di truyền (DNA) của tinh trùng được đánh giá là một trong những nguyên nhân chủ yếu gây nên vô sinh - hiếm muộn ở nam giới. Việc nghiên cứu và đánh giá độ phân mảnh của DNA tinh trùng sẽ giúp các nhà khoa học và bác sĩ có cái nhìn rõ hơn cũng như có phương pháp chữa trị và hỗ trợ cho những trường hợp vô sinh - hiếm muộn. Có rất nhiều các phương pháp để phát hiện đánh giá mức độ phân mảnh DNA của tinh trùng. Trong bài viết này, tác giả sẽ giới thiệu, tổng kết ngắn gọn và đưa ra nhận định chủ quan về một vài phương pháp phát hiện và đánh giá mức độ phân mảnh DNA của tinh trùng.*

Vô sinh - hiếm muộn hiện nay đang là một vấn đề đau đầu mà không ít các cặp vợ chồng không chỉ ở Việt Nam mà cả thế giới phải đối mặt. Tỷ lệ vô sinh hiếm muộn của Việt Nam hiện nay đang ở con số 7,7% dân số – một con số khá cao. Yếu tố vô sinh có thể xuất phát từ người vợ mà cũng có thể xuất phát từ người chồng.

Một trong những nguyên nhân khoa học chủ yếu dẫn đến vô sinh ở nam giới đó là những tổn thương về mặt

vật chất di truyền (DNA) của tinh trùng. Hiện tại, đã có nhiều phương pháp nhằm xác định chất lượng DNA của tinh trùng. Các phương pháp đó giúp cho các bác sĩ phân tích được bệnh nhân vô sinh và người bình thường, từ đó có thể dự đoán được kết quả của các phương pháp điều trị vô sinh ở nam giới.

Trước kia, các nghiên cứu không đặc biệt chú trọng đến việc đánh giá chất lượng của tinh trùng. Các tiêu chí đánh giá chất lượng tinh trùng hoặc tinh dịch rất hạn

chế với việc đếm số lượng tinh trùng và kiểm tra tinh dịch đồ. Các phương pháp truyền thống chủ yếu đánh giá chất lượng tinh trùng dựa vào hình thái bên ngoài chứ không đánh giá được chất lượng DNA mà tinh trùng đang mang có còn tốt hay không. Đã có nghiên cứu chỉ ra các trường hợp có thông số tinh dịch đồ bình thường nhưng tổn thương DNA lại ở mức độ cao và làm giảm cơ hội có thai. Trên thực tế, tầm quan trọng của chất lượng tinh trùng cả về hình thái lẫn đặc tính sinh học là rất lớn. Tinh trùng là một công cụ vận chuyển DNA từ người nam để thụ tinh cho trứng. Việc vận chuyển được nguyên vẹn vật chất di truyền sẽ đảm bảo cho việc hình thành giao tử khỏe mạnh và đứa trẻ sinh ra sẽ không gặp những bệnh liên quan đến di truyền. Chính vì vậy, các phương pháp truyền thống không đưa ra được những dự đoán tin cậy về khả năng thụ thai của nam giới cũng như phát hiện được triệt để những nguyên nhân gây ra sự vô sinh nam.

Có rất nhiều nguyên nhân dẫn đến tổn thương DNA tinh trùng. Trong quá trình hình thành, phát triển và thụ tinh, một số tinh trùng không thể vận chuyển nguyên vẹn vật liệu di truyền, tạo thành sự phân mảnh DNA của tinh trùng. Theo BS. Hồ Mạnh Tường (2014), sự phân mảnh DNA tinh trùng có thể xảy ra ở bất kỳ giai đoạn nào trong quá trình hình thành tinh trùng. Hiện tượng có thể xảy ra ở một hoặc cả hai chuỗi DNA tinh trùng bị tổn thương hoặc đứt gãy và vô sinh nam. Trong IVF, sự phân mảnh DNA của tinh trùng không ảnh hưởng đến sự thụ tinh IVF nhưng lại có ảnh hưởng quan trọng đến sự phát triển của phôi và blastocyst. Nghiên cứu cho thấy trong IVF, với những tổn thương DNA tinh trùng <30% thì khả năng có thai cao hơn 2 lần so với những mẫu tinh trùng có độ tổn thương DNA >30%. Tuy vậy, với ICSI thì sự phân mảnh của DNA tinh trùng không gây nên sự khác biệt có ý nghĩa. Theo nghiên cứu của Borini (2014), tỉ lệ sảy thai trong IVF tỉ lệ thuận với mức độ tổn thương DNA của tinh trùng.

Stress oxy hóa hay mất cân bằng oxy hóa (Oxidative Stress – OS) là hậu quả của sự mất cân bằng giữa sự hình thành các gốc tự do có oxy (Reactive Oxygen Species – ROS) và cơ chế kháng oxy hóa của cơ thể, gây nên tổn thương tế bào. Ví dụ về ROS có thể kể đến những hợp chất: hydroxyl radical, superoxide anion

và hydrogen peroxide. Trong điều kiện bình thường thì tỉ lệ giữa ROS và các hoạt động chống oxy hóa được duy trì ở mức cân bằng. Khi ROS tăng lên do tăng sản sinh hoặc giảm đào thải sẽ gây nên tổn thương cấu trúc DNA của tinh trùng và giảm sự di động của tinh trùng.

Cơ chế tác động của ROS lên DNA tinh trùng được giải thích như sau: các chất ROS làm tổn thương màng tinh trùng và ảnh hưởng đến độ di động và khả năng xâm nhập vào màng noãn của tinh trùng. Hơn thế nữa, ROS còn có khả năng làm biến đổi DNA của tinh trùng. Các yếu tố làm tăng ROS có thể kể đến như: nhiệt độ cao, tiếp xúc với xạ điện trường, chất diệt côn trùng, ô nhiễm môi trường. Ngoài ra, lối sống cũng ảnh hưởng rất nhiều đến sự tăng ROS: tuổi cao, uống rượu, hút thuốc lá, stress, béo phì, đói kém, nhiễm trùng, tự miễn và bệnh mạn tính.

Hiện nay, bốn phương pháp phổ biến nhất trên thế giới có thể kể đến đó là SCSA (Sperm Chromatin Structure Analysis), TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), COMET và SCD. Mỗi phương pháp đều có thể đưa ra được những kết quả định lượng tương đối về tình trạng DNA của tinh trùng, nhưng không thể cung cấp một cách chi tiết thông tin về các đoạn DNA bị tổn thương. Việc đánh giá phân mảnh DNA tinh trùng trên thực tế lâm sàng là hướng nghiên cứu quan trọng về hiếm muộn nam giới hiện nay trên thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng. Trong bài viết này, chúng tôi xin nêu ra một vài kỹ thuật đánh giá sự phân mảnh DNA của tinh trùng hiện đang phổ biến đó là SCSA, TUNEL, COMET và SCD. Mỗi kỹ thuật đem đến những hiểu biết về những khía cạnh khác nhau của hiện tượng phân mảnh DNA của tinh trùng. Ví dụ như phương pháp SCSA và SCD cho thông tin về sự phân mảnh của thể nhiễm sắc trong khi đó TUNEL và COMET cho cái nhìn cụ thể hơn về những đứt gãy, vị trí đứt gãy của DNA.

- SCSA: là một kỹ thuật tiên phong trong nghiên cứu sự phân mảnh DNA của tinh trùng dựa vào cấu trúc chromatin ở bên trong tinh trùng và hiện nay được coi là phương pháp chuẩn trong nghiên cứu phân mảnh DNA tinh trùng. Nguyên lý cơ bản của kỹ thuật SCSA là nhuộm màu DNA của tinh trùng. Những tinh trùng nào có tỉ lệ phân mảnh cao sẽ cho ra màu đậm hơn

và bị phân tách khỏi các tinh trùng khác. Tỷ lệ phân mảnh của DNA tinh trùng sẽ được xác định bằng các phần mềm chuyên dụng. Phương pháp này yêu cầu hệ thống flow cytometer, tuy nhiên hiện nay, ngay cả trên thế giới cũng chỉ có một số ít phòng thí nghiệm có thể trang bị hệ thống này. Điều kiện tiến hành nghiêm ngặt và chỉ một thay đổi nhỏ bên ngoài cũng ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm. Với phương pháp này, sai lệch có thể xảy ra nếu người xét nghiệm đang gặp vấn đề về sức khỏe (sốt hoặc đang sử dụng thuốc). Các khâu chuẩn bị theo kỹ thuật SCSA cũng góp phần đáng kể trong việc làm sai lệch kết quả. Một nhược điểm của SCSA đó là cần một lượng lớn mẫu (tinh trùng) cho mỗi lần xét nghiệm mà không thể bảo quản để tiến hành xét nghiệm lần sau. Những nghiên cứu tiến hành bằng kỹ thuật SCSA đã cho thấy rằng trong IVF, những người có tỷ lệ phân mảnh DNA cao vẫn có tỷ lệ đậu thai tương đương với những người có tỷ lệ phân mảnh DNA bình thường. Tuy nhiên, SCSA không thể tiên đoán được cặp vợ chồng nào dễ hay khó đậu thai khi tiến hành IVF.

- TUNEL: là kỹ thuật đánh dấu điểm cuối của các nucleic acid và nhận biết sự chết theo chương trình của tế bào. Quá trình đánh giá sự phân mảnh DNA của tinh trùng được tiến hành bằng kính hiển vi huỳnh quang hoặc bằng phương pháp đo lường và đếm tế bào. Được trình bày lần đầu tiên vào năm 1992, phương pháp TUNEL trở thành một trong những phương pháp phát hiện sự phân mảnh DNA và sau này được áp dụng vào việc xác định tổn thương DNA của tinh trùng. Ban đầu, độ chính xác của kỹ thuật này chưa cao, nhưng qua thời gian, kỹ thuật này đã dần được cải thiện. TUNEL là một kỹ thuật không quá phức tạp nhưng tốn khá nhiều thời gian và tính ổn định của phương pháp không cao. Ưu điểm kỹ thuật này là một xét nghiệm không yêu cầu lượng mẫu lớn.
- COMET: là một kỹ thuật khá nhạy trong việc phát hiện các tổn thương DNA ở mức độ tế bào. Được phát triển bởi Östling và Johansson từ năm 1984 và sau đó, được cải tiến bởi Singh và các đồng sự vào năm 1988, kỹ thuật này ngày càng được sử dụng rộng rãi như là một kỹ thuật chuẩn cho việc đánh giá các thương tổn DNA, quản lý sinh học (biomonitoring) và

kiểm định độc tố gen (genotoxicity testing). Nguyên lý của COMET là các tế bào được giữ trong agarose có độ nóng chảy thấp được ly giải ở môi trường trung tính hoặc kiềm (pH >13) với sự có mặt của muối và detergent trước khi được nhuộm và mang đi điện di. DNA trên gel sau khi điện di được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang. Kỹ thuật này được gọi là "COMET" là bởi nó liên quan đến hình thái DNA trên gel sau khi điện di giống như hình một ngôi sao chổi (COMET). Mật độ và độ dài của đuôi "sao chổi" trên gel thể hiện sự đứt gãy của DNA. Việc phân tích tổn thương DNA có thể được tiến hành sâu hơn bằng kỹ thuật nhuộm DNA và tính toán sự phát huỳnh quang dựa vào các phần mềm hiển thị. Nhược điểm của kỹ thuật này là rất tốn thời gian, thiết bị và phần mềm phân tích phức tạp. Tại Việt Nam, nhóm nghiên cứu của BS. Hồ Mạnh Tường và cộng sự đã xây dựng thành công qui trình đánh giá sự phân mảnh DNA bằng kỹ thuật Alkaline COMET lần đầu tiên vào năm 2013. Kết quả của nghiên cứu cho thấy kỹ thuật Alkaline COMET có thể được chọn như một công cụ nhằm đánh giá sự phân mảnh DNA trong điều kiện Việt Nam.

- SCD (Sperm Chromatin Dispersion): kỹ thuật này nhằm đánh giá độ phân tán của chất nhuộm sắc của tinh trùng (SCD). Cùng với kỹ thuật TUNEL, kỹ thuật SCD được coi là một phương pháp hiệu quả để nhận biết tổn thương DNA. Bằng cách sử dụng kính hiển vi trường sáng (bright-field microscopy) để quan sát và phân tích kết quả, kỹ thuật SCD được coi là nhạy và hiệu quả hơn nhiều so với kỹ thuật SCSA hay kỹ thuật TUNEL. Tương tự như TUNEL, đơn vị chính của phương pháp này là hệ số phân mảnh DNA (DNA Fragmentation Index – DFI). Những đặc điểm nổi trội của SCD so với các kỹ thuật khác đó là: với phương pháp SCD, lượng tinh trùng cần thiết cho mỗi lần xét nghiệm không nhiều, yêu cầu về thiết bị phân tích cơ bản (ống nghiệm và kính hiển vi thường hoặc kính hiển vi huỳnh quang). SCD có qui trình đơn giản và linh hoạt hơn các kỹ thuật khác do mẫu không nhất thiết phải tươi mà có thể đông lạnh. Hơn thế nữa, thời gian thực hiện tương đối nhanh do quá trình quan sát và đánh giá được thực hiện dưới kính hiển vi, có khả năng phân tích tự động. SCD có thể phân biệt các loại tổn thương

DNA khác nhau, đặc biệt là mức độ “xương cấp” của vật liệu di truyền trong tinh trùng – điều mà các kỹ thuật khác không nhận ra được. Bên cạnh đó, kết quả của phân tích bằng kỹ thuật SCD có thể được kiểm tra lại. Phương pháp SCD được Fernández và cộng sự cho là sự thay thế phù hợp nhất cho kỹ thuật SCSA cũng như các kỹ thuật khác bởi chi phí đầu tư hợp lý, tính đơn giản và sự chính xác.

Từ năm 2012 đến nay, các nhóm nghiên cứu tại Việt Nam đã có những nghiên cứu nhằm xây dựng thành công các qui trình định lượng ROS tinh dịch và trong huyền phù tinh trùng; đánh giá độ phân mảnh DNA tinh trùng bằng các phương pháp Alkaline COMET, CMA3, SCSA và SCD... Trong một nghiên cứu khác của BS. Tường cùng cộng sự, 2 qui trình khác nhau cũng đã xây dựng thành công để đánh giá độ phân mảnh của DNA của tinh trùng là CMA3 và SCD. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể xây dựng thành công các qui trình chẩn đoán chất lượng tinh trùng ở mức độ DNA với mức độ ổn định và tin cậy cao trong điều kiện Việt Nam.

Gần đây, Trung tâm Chuẩn đoán trước sinh thuộc Bệnh viện Phụ Sản Trung ương và Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen thuộc Viện Công nghệ sinh học đã kết hợp triển khai áp dụng phương pháp SCD vào thường qui trên 30 bệnh nhân, sử dụng bộ kit Halosperm®. Halosperm® là một bộ kit mới được phát triển với sự hợp tác của Giáo sư ngành Di truyền học phân tử J. Gosálvez, Đại học Autónoma de Madrid và hai nhà Vật lý học J. L. Fernández và V. Goyanes, thuộc Khoa Di truyền của Bệnh viện Đại học Juan Canalejo ở A Coruña. Thêm nữa, sự tiện lợi của bộ kit còn thể hiện ở yêu cầu đầu vào: có thể là mẫu tươi hoặc đông lạnh. Bộ kit được nhận xét là phù hợp với điều kiện của Việt Nam. Qui trình thực hiện bao gồm biến tính và ly giải mẫu trong điều kiện kiểm soát và trong môi trường thích hợp. Dựa vào một đặc điểm đặc trưng của tinh trùng đó là chất nhiễm sắc chromatin trong các tinh trùng khỏe sẽ sản xuất ra các protein xung quang đầu tinh trùng, các protein này có thể được quan sát bằng phương pháp nhuộm huỳnh quang hoặc dưới kính hiển vi trường sáng dưới dạng một quầng phân tán ở đầu tinh trùng. Quầng phân tán này sẽ không rõ rệt hoặc rất khó quan sát

được ở các tinh trùng có sự tổn thương hoặc phân mảnh DNA.

Các phương pháp đánh giá độ phân mảnh DNA tinh trùng giúp cho bác sĩ có được cái nhìn toàn diện về chất lượng tinh trùng dựa trên các đặc điểm sinh học, di truyền nên có độ tin cậy và độ chính xác cao hơn. Từ đó, việc xác định nguyên nhân vô sinh ở các cặp vợ chồng hiếm muộn sẽ dễ dàng hơn. Nếu được triển khai sớm tại Việt Nam, các phương pháp này sẽ không chỉ góp phần nâng cao mức độ thành công của các phương pháp hỗ trợ điều trị vô sinh nam cũng như các biện pháp hỗ trợ sinh sản như bơm tinh trùng vào buồng tử cung (IUI), các ca thụ tinh trong ống nghiệm (IVF), mà còn giúp hạn chế vấn đề thai lưu và sẩy thai liên tiếp. Chúng ta hy vọng rằng trong tương lai, nhờ áp dụng những phương pháp này, trẻ sinh ra sẽ giảm nguy cơ mắc các bệnh di truyền hơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Borini A et al. (2006). Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod*; 21(11):2876-2881.
2. Evenson DP WR (2005). Comparison of the Halosperm test kit with the sperm chromatin structure assay (SCSA) infertility test in relation to patient diagnosis and prognosis. *Fertil Steril*; 84:6-849.
3. Evenson DP, Larson KL and Jost LK (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*; 23(1):25-43.
4. Fernández JL ML, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*; 59-66.
5. Phùng Ngọc Thùy Linh, NTTA, Nguyễn Hồng Bảo, Nguyễn Việt Quốc, Hồ Mạnh Tường, Hồ Huỳnh Thùy Dương (2014). Xây dựng qui trình kỹ thuật cho các xét nghiệm đánh giá DNA phân mảnh ở tinh trùng người. Hội nghị Kỹ thuật Hỗ trợ sinh sản lần III: Tiếp cận kiến thức và công nghệ mới trong hỗ trợ sinh sản.
6. Ribas-Maynou J G PA, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, Navarro J, Benet J (2013). Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral COMET assay. *Andrology*; 715-722.
7. Tâm MCM (2014). Nghiên cứu về sự phân mảnh DNA ở tinh trùng: tối ưu hóa qui trình alkaline COMET trong điều kiện tại Việt Nam. Hội nghị Kỹ thuật Hỗ trợ sinh sản lần III: Tiếp cận kiến thức và công nghệ mới trong hỗ trợ sinh sản.
8. Tường HM (2014). Định lượng ROS trong tinh dịch và phân mảnh DNA tinh trùng trong chuẩn đoán và điều trị hiếm muộn nam. Hội nghị Sản Phụ khoa Việt-Pháp. Hà Nội.