

PHƯƠNG PHÁP TIÊM TINH TỬ VÀO BÀO TƯƠNG NOĂN (ROSI): HƯỚNG TIẾP CẬN MỚI TRONG ĐIỀU TRỊ VÔ SINH NAM

CN. Ngô Hoàng Tín, ThS. Nguyễn Hữu Duy

IVFMD Vạn Hạnh

GIỚI THIỆU

Sinh tinh là một chuỗi các quá trình phức tạp với mục đích tạo ra những tinh trùng trưởng thành có khả năng thụ tinh với noãn. Tinh trùng được xem là một tế bào có kích thước nhỏ nhất trong cơ thể, có tính biệt hóa cao, chứa các thông tin di truyền từ người cha, có khả năng nhận biết và thụ tinh với noãn tại một phần ba ngoài của vôi trứng. Quá trình sinh tinh diễn ra trong lòng ống sinh tinh của tinh hoàn thông qua nguyên phân để tăng số lượng và giảm phân để tạo thành các tinh tử mang bộ nhiễm sắc thể đơn bội (23 nhiễm sắc thể). Tinh tử không có khả năng di động để thụ tinh với noãn. Trong giai đoạn tiếp theo, còn được gọi là giai đoạn phát sinh tinh trùng, các tinh tử trở nên dài ra và cuối cùng phát triển đuôi để trở thành tinh trùng trưởng thành. Sau khi được tạo thành, tinh trùng sẽ di chuyển vào mào tinh, nơi diễn ra quá trình biệt hóa cuối cùng tạo thành tinh trùng hoàn chỉnh về mặt sinh học.

Trong thụ tinh trong ống nghiệm, từ khi phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (Intracytoplasmic Sperm Injection – ICSI) ra đời vào những năm 1990 đã mang lại cơ hội làm cha cho những người đàn ông bị vô sinh do yếu tố nam (Tanaka và cs, 2018). Tuy nhiên, vẫn có khoảng 1% nam giới không có tinh trùng trong tinh dịch (azoospermia) (Tanaka và cs, 2018). Trong đó, chia làm hai loại là vô tinh bế tắc (chiếm 40%) và vô tinh không bế tắc (chiếm 60%) (Tanaka và cs, 2015). Chỉ 40,5% nam giới

vô tinh không bế tắc có tinh trùng trưởng thành thu được khi thực hiện thủ thuật phẫu thuật trích tinh trùng từ tinh hoàn (Testicular Sperm Extraction – TESE). Nguyên nhân là do quá trình sinh tinh diễn ra gián đoạn hoặc hoàn toàn không có tinh trùng. Khi không có tinh trùng dù đã thực hiện kỹ thuật TESE/microTESE, bệnh nhân chỉ có thể sử dụng ngân hàng tinh trùng hoặc nhận con nuôi (Tanaka và cs, 2015). Tuy nhiên, với sự ra đời của phương pháp tiêm tinh tử vào bào tương noãn (Round Spermatid Injection – ROSI) đã giúp mang lại cơ hội có con tự thân cho các bệnh nhân vô tinh. Theo nghiên cứu của Tanaka và cộng sự (2006) có khoảng 30% bệnh nhân vô tinh không bế tắc có tinh tử trong mẫu phẫu thuật của họ. Mặc dù ý tưởng về ROSI đã có từ đầu những năm 90, nhưng phải mất một thời gian dài để phát triển và hiện tại phương pháp này vẫn được coi là thử nghiệm ở hầu hết các quốc gia. Nhìn chung, những nỗ lực ban đầu để ứng dụng ROSI gần như không thành công ở lâm sàng dẫn đến số lượng các nghiên cứu giảm dần trong một thời gian dài. Nguyên nhân có thể do những giới hạn về mặt kỹ thuật, cách nhận dạng tinh tử, các phương pháp hỗ trợ sau ROSI chưa thực sự hiệu quả (Gross và cs, 2020). Tuy nhiên, một số nghiên cứu gần đây cho thấy tinh tử có thể được sử dụng thay thế cho tinh trùng trong những trường hợp bệnh nhân không có tinh trùng sau thủ thuật (Bảng 1). Theo một báo cáo gần đây của Tanaka và cộng sự (2018), phương pháp ROSI đã giúp 90 trẻ sinh ra đời.

Quan trọng là trẻ sinh ra bằng ROSI gần như không gặp bất kỳ vấn đề bất thường nào về thể chất, tâm thần so với trẻ sinh tự nhiên trong thời gian quan sát 2 năm (Tanaka và cs, 2018). Do đó, kỹ thuật này có thể xem như một phương pháp thay thế khả thi cho những bệnh nhân vô tinh, nhưng cần lưu ý rằng kết quả em bé sinh đạt được rất thấp.

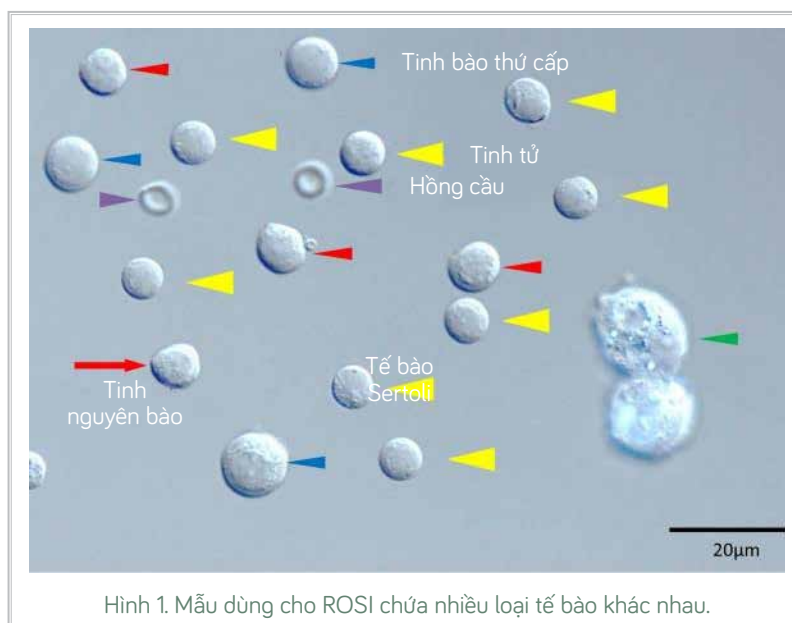
PHƯƠNG PHÁP TIÊM TINH TỬ VÀO BÀO TƯƠNG NOÃN (ROSI)

Ban đầu, bệnh nhân vô tinh được thực hiện TESE/microTESE. Khi không tìm thấy tinh trùng sau thủ thuật, tiến hành thu mẫu mô (có thể chứa tinh tử) rửa trong đệm ly giải hồng cầu. Dùng DNase để phân hủy DNA giải phóng từ nhân của các tế bào chết bị vỡ. Sau đó, huyền phù tế bào được lọc qua các mắt lưới 30 và 15 μm (NRS-030 và NRS-013; Nippon Rikagaku Kikai) để thu nhận tinh tử và tế bào tinh hoàn khác, sau đó được bảo quản lạnh để chờ sử dụng cho các chu kỳ điều trị (Tanaka và cs, 2015).

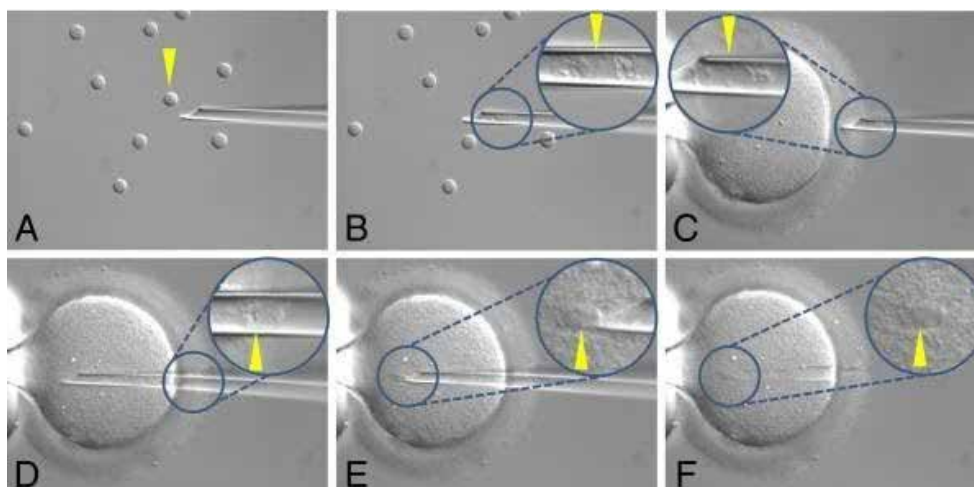
Các mẫu dùng cho ROSI chứa nhiều loại tế bào khác nhau. Xác định đúng các tế bào tinh tử là chìa khóa để ROSI thành công. Mặc dù có thể phân biệt tinh tử với các tế bào sinh tinh khác bằng phương pháp di truyền tế bào (FISH và karyotype) nhưng những phương pháp này

mang tính xâm lấn nên không thể sử dụng trong lâm sàng. Tinh tử được xác định dưới kính hiển vi thông qua kích thước và hình thái của chúng. Tinh tử là tế bào sinh tinh nhỏ nhất, đường kính 6 – 8 μm , nhỏ hơn một chút so với hồng cầu, nhỏ hơn nhiều so với tinh nguyên bào (10 – 12 μm) và nhỏ hơn một chút so với hầu hết các tinh bào thứ cấp (8 – 10 μm) (Hình 1). Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy có 2 – 3 hạch nhân trong nhân của các tinh nguyên bào và tinh bào thứ cấp, nhưng không có trong tinh tử. Đồng thời, một đặc điểm quan trọng khác của tinh tử được quan sát thấy là tế bào chất của nó có thể dễ dàng tách ra khỏi nhân nếu được hút qua lại trong kim ICSI, không giống như tế bào sinh tinh. Các tế bào bạch cầu, có kích thước xấp xỉ tinh tử, nhưng có một màng sinh chất "cứng", không thể bị phá vỡ ngay cả khi hút mạnh. Tế bào đáp ứng các tiêu chí trên được xem là tinh tử với độ chính xác gần như 100% khi kiểm tra bằng karyotype và FISH. Nhân tinh tử bị phân mảnh khi hút vào kim ICSI, được coi là đã chết và không được sử dụng cho ROSI (Tanaka và cs, 2015).

Sau khi chọn được tinh tử, tiến hành hút qua lại trong kim ICSI để làm vỡ màng sinh chất. Nhân cùng với một lượng nhỏ tế bào chất, sau đó được tiêm vào noãn (Hình 2).



Hình 1. Mẫu dùng cho ROSI chứa nhiều loại tế bào khác nhau.



Hình 2. Quy trình ROSI.

(A) Tinh tử trước khi thực hiện ROSI; (B) Hút tinh tử vào kim ICSI;
(C - F) Tinh tử trước, trong và sau khi thực hiện ROSI; đầu mũi tên chỉ nhân tinh tử (Tanaka và cs, 2015).

Bảng 1. Kết quả một số nghiên cứu lâm sàng thực hiện ROSI (Hanson và cs, 2021).

Tác giả, năm	Tỷ lệ thụ tinh (%)	Tỷ lệ thai lâm sàng (%)	Tỷ lệ trẻ sinh sống (%)	Số noãn ROSI	Số noãn thụ tinh	Số phôi chuyển
Tesarik và cs, 1996	35,9	16,7	16,7	39	14	12
Vanderzwalmen và cs, 1997	21,9	14,3	14,3	260	57	7
Antinori và cs, 1997	55,6	3,6	—	135	75	56
Antinori và cs, 1997	46,7	16,7	—	15	7	6
Yamanaka và cs, 1997	69,4	0,0	0,0	49	34	24
Kahraman và cs, 1998	25,6	3,1	0,0	199	51	32
Barak và cs, 1998	62,2	4,3	4,3	37	23	23
Bernabeu và cs, 1998	44,9	0,0	0,0	69	31	31
Ghazzawi và cs, 1999	22,0	0,0	0,0	574	126	40
Al-Hasani và cs, 1999	18,4	0,0	0,0	49	9	9
Gianaroli và cs, 1999	40,0	50,0	50,0	5	2	2
Balaban và cs, 2000	56,2	—	—	356	200	—
Tesarik và cs, 2000	53,8	—	—	26	14	—
Levrان và cs, 2000	45,5	0,0	0,0	178	81	48
Vicdan và cs, 2001	28,3	0,0	0,0	69	17	5
Urman và cs, 2002	40,5	0,0	0,0	1.021	414	16
Sousa và cs, 2002	15,9	0,0	0,0	126	20	9
Khalili và cs, 2002	21,4	0,0	0,0	42	9	6
Sousa và cs, 2002	34,6	—	—	26	9	—
Ulug và cs, 2003	41,7	0,0	0,0	36	15	10
Tanaka và cs, 2015	59,5	14,4	5,8	734	437	208
Tanaka và cs, 2018	56,8	3,6	2,2	14.324	8.132	3.882

Bảng 2. So sánh hiệu quả giữa phương pháp ROSI và ICSI.

	Tỷ lệ thụ tinh (%)	Tỷ lệ thai lâm sàng (%)	Tỷ lệ sinh sống (%)
ROSI (Hanson và cs, 2021)	38,7	3,7	4,3
ROSI (Tanaka và cs, 2018)	56,8	3,6	2,2
ICSI (Gardner và cs, 2018)	75,1	45,7	36,6

Mặc dù noãn sau ROSI có thể tự hoạt hóa, nhưng tỷ lệ thấp và không đồng nhất. Do đó, cần hỗ trợ hoạt hóa noãn nhằm tạo ra dao động Ca^{2+} nội bào lặp đi lặp lại (dao động Ca^{2+} là yếu tố quan trọng trong quá trình hoạt hóa noãn và thụ tinh). Nghiên cứu của Tanaka và cộng sự (2015) cho thấy noãn được hoạt hóa bằng điện trước ROSI khoảng 10 phút giúp phôi phát triển thành phôi phân chia với tỷ lệ cao hơn so với những noãn không được hoạt hóa (55% so với 32%). Dù vậy, tỷ lệ thụ tinh sau ROSI vẫn tương đối thấp (56,8%) (Tanaka và cs, 2018).

HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ

Nghiên cứu phân tích tổng hợp của Hanson và cộng sự năm 2021 trên 22 nghiên cứu với 1.099 cặp vợ chồng và 4218 ca chuyển phôi (bảng 1) cho thấy: đến thời điểm hiện tại tỷ lệ thụ tinh sau ROSI là 38,7% (KTC 95%, 31,5 – 46,3), trong khi đó, tỷ lệ thai là 3,7% (KTC 95%, 3,2 – 4,4). Tỷ lệ sinh sống thấp với chỉ 4,3% trường hợp chuyển phôi (KTC 95%, 2,3 – 7,7). Tỷ lệ thai của mỗi cặp vợ chồng là 13,4% (KTC 95%, 6,8 – 19,1) và tỷ lệ trẻ sinh ra ở mỗi cặp vợ chồng là 8,1% (KTC 95%, 6,1 – 14,4). Từ đó cho thấy, ROSI vẫn giúp có thai lâm sàng và sinh sống, nhưng tỷ lệ thành công thấp hơn nhiều so với tỷ lệ đạt được khi ICSI với tình trùng trưởng thành (Bảng 2). Đồng thời, phần lớn các nghiên cứu báo cáo tỷ lệ có thai là 0% (10/22 nghiên cứu báo cáo tỷ lệ có thai là 0%, 3/22 nghiên cứu không có số liệu thai) và tỷ lệ sinh sống là 0% (11/22 nghiên cứu báo cáo tỷ lệ trẻ sinh sống là

0%, 5/22 nghiên cứu không có số liệu trẻ sinh sống) (Bảng 1). Trong đó, nghiên cứu lớn nhất là của Tanaka và cộng sự (2018) với 138 ca mang thai sau 3.882 ca chuyển phôi (tỷ lệ có thai là 3,6%) và sự ra đời của 90 em bé khỏe mạnh (tỷ lệ trẻ sinh sống là 2,2%).

Những phát hiện này chỉ ra rằng mặc dù ROSI đã dẫn đến một số ca sinh sống, nhưng nó không mang tính đại diện cho hầu hết các trung tâm. Tuy nhiên, kỹ thuật này vẫn là một phương pháp thay thế khả thi cho những bệnh nhân vô tinh không bế tắc.

TÍNH AN TOÀN CỦA PHƯƠNG PHÁP

Theo báo cáo của Tanaka và cộng sự năm 2018, 3 trong số 90 trẻ ROSI có dị tật bẩm sinh: sốt môi và thoát tràng rún được sửa lại thành công mà không có biến chứng. Sự khác biệt về tỷ lệ trẻ dị tật bẩm sinh ở trẻ sinh ra từ ROSI so với trẻ sinh tự nhiên vẫn chưa rõ ràng do số liệu nghiên cứu chưa đầy đủ. Sự tăng trọng lượng cơ thể của trẻ ROSI giống như trẻ được thụ thai tự nhiên ngoại trừ việc bé trai ROSI ở độ tuổi 1,5 tuổi nhẹ cân hơn đáng kể, nhưng bắt kịp khi lên 2 tuổi. Hơn nữa, sự phát triển nhận thức của nhóm ROSI tương tự như nhóm tự nhiên ngoại trừ phản ứng của em bé đối với lời chào của cha mẹ (81,3 so với 94,5%; lời chào của cha mẹ ví dụ như: xin chào hoặc tạm biệt) ở độ tuổi từ 12 đến 18 tháng (Tanaka và cs, 2018).

Trên thực tế nghiên cứu Tanaka và cộng sự là một nghiên cứu duy nhất cho thấy có trẻ sinh sống từ ROSI trong những năm gần đây. Do đó, sự an toàn của ROSI tới thời điểm hiện tại vẫn còn là vấn đề chưa có lời giải.

HẠN CHẾ VÀ HƯỚNG PHÁT TRIỂN TRONG TƯƠNG LAI CỦA PHƯƠNG PHÁP ROSI

Sau những thử nghiệm ban đầu trên mô hình động vật, các nghiên cứu ban đầu về ROSI ở người cho kết quả khác nhau và không đồng nhất trên quy mô lớn ở nhiều trung tâm khác

nhau (nhiều nghiên cứu báo cáo không có thai lâm sàng, bảng 1). Khó khăn chính mà các trung tâm gặp phải là nhận biết tinh tử dưới kính hiển vi. Việc xác định chủ yếu thông qua hình thái làm cho tinh tử không dễ dàng nhận biết và phân biệt với các tế bào sinh tinh chưa trưởng thành, tế bào lympho, phân biệt các tinh tử còn sống và tinh tử thoái hóa.

Một nguyên nhân khác khiến nhiều nghiên cứu về ROSI không có hiệu quả có thể là do quá trình hoạt hóa noãn không thành công do đó dẫn đến quá trình hình thành phôi thất bại. Ngay cả khi áp dụng các biện pháp hỗ trợ hoạt hóa noãn, tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ phôi được cải thiện nhưng tỷ lệ trẻ sinh sống gần như không có sự khác biệt.

Hiện tại, có những lo ngại về các bất thường thượng di truyền (epigenetics) liên quan đến các mô hình methyl hóa không thích hợp do tinh trùng chưa trưởng thành. Ngoài ra, việc sử dụng tinh trùng chưa trưởng thành trong các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản có thể làm tăng nguy cơ rối loạn di truyền ảnh hưởng xấu đến khả năng phát triển của phôi (Rajender và cs, 2011). Sự thay đổi vùng in dấu di truyền có thể dẫn đến hội chứng Angelman (một rối loạn di truyền liên quan đến bất thường trong cấu trúc của nhiễm sắc thể số 15, chủ yếu ảnh hưởng đến hệ thần kinh, gây ra khuyết tật về sự phát triển và trí tuệ) và hội chứng Beckwith-Wiedemann (rối loạn điều hòa tăng trưởng dẫn đến tăng trưởng cơ thể quá mức). Bên cạnh đó, Kishigami và cộng sự (2006) tìm thấy các mô hình methyl hóa khác biệt giữa tinh tử và tinh trùng. Sự khác biệt này có thể ảnh hưởng đến kết quả lập trình lại bộ gen sau ICSI (Gross và cs, 2020). Đồng thời, tinh tử là một tế bào mang bộ nhiễm sắc thể đơn bội, với thành phần protein chủ yếu là histone, ngược lại với tinh trùng, trong đó chủ yếu là các protamine. Nhiều nghiên cứu cho rằng tỷ lệ thụ tinh thấp hơn ở ROSI là do sự khác biệt như vậy trong cấu trúc nhiễm sắc thể gây ảnh hưởng đến việc lập trình lại hệ gen của người cha (Gross và cs, 2020).

Hiện tại, phương pháp ROSI có tỷ lệ thành công thấp, điều này làm hạn chế khả năng áp dụng của nó vào lâm sàng bất chấp những kết quả khả quan được công bố trong các nghiên cứu gần đây. Những cải tiến trong việc xác định các tinh tử vẫn còn đang trong quá trình nghiên cứu và hoàn thiện. Do đó, việc áp dụng ROSI như một quy trình thường quy vẫn còn là một đoạn đường dài, đòi hỏi sự chung tay và nỗ lực rất nhiều từ các nhà nghiên cứu.

Trong tương lai, để ROSI được sử dụng phổ biến trên lâm sàng, cần có nhiều nghiên cứu sâu hơn để tối ưu hóa kỹ thuật, cải thiện tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ phôi sau ROSI và cải thiện kết quả thai lâm sàng. Áp dụng thêm các biện pháp can thiệp như xét nghiệm di truyền tiền làm tổ (PGT) và sử dụng các chu kỳ đông lạnh để đạt được sự đồng bộ của phôi và tử cung nhằm tạo điều kiện tốt nhất cho phôi làm tổ và phát triển (Hanson và cs, 2021).

KẾT LUẬN

Bất chấp những hạn chế, kỹ thuật ROSI là một phương thức điều trị tiềm năng cho nam giới vô tinh không bế tắc, mang lại cơ hội có con về mặt di truyền cho các cặp vợ chồng không có tinh trùng. Ở giai đoạn đầu, sự phát triển về thể chất và nhận thức trong hai năm đầu đời của trẻ sinh ra sau ROSI và trẻ được thụ thai tự nhiên không cho thấy sự khác biệt đáng kể. Bước đầu cho thấy tính an toàn của phương pháp này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hanson BM, Kohn TP, Pastuszak AW, Scott RT Jr, Cheng PJ, Hotaling JM. Round spermatid injection into human oocytes: a systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl*. 2021 Feb 9. doi: 10.4103/aja.aja_85_20. Epub ahead of print. PMID: 33565426
2. Gross, K. X., Hanson, B. M., & Hotaling, J. M. (2020). Round Spermatid Injection. *Urologic Clinics of North America*, 47(2), 175–183. doi:10.1016/j.juc.2019.12.004.
3. Tanaka, A; Suzuki, K; Nagayoshi, M; Tanaka, I; Takemoto, Y; Watanabe, S; Takeda, S; Irahara, M; Kuji, N; Yamagata, Z; Yanagimachi, R (2018). Ninety babies born after round spermatid injection into oocytes: survey of their development from fertilization to 2 years of age. *Fertility and Sterility*, 110(3), 443–451. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.04.033.
4. Gardner, DK, Weissman, A, Howles, C.M., & Shoham, Z. (Eds.). (2018). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Volume 1: Laboratory Perspectives* (5th ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351228237>
5. Tanaka, A, Nagayoshi, M., Takemoto, Y., Tanaka, I., Kusunoki, H., Watanabe, S., Kuroda, K., Takeda, S., Ito, M., & Yanagimachi, R. (2015). Fourteen babies born after round spermatid injection into human oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(47), 14629–14634. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517466112>
6. Rajender S, Avery K, Agarwal A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutat Res*. 2011 May-Jun;727(3):62-71. doi: 10.1016/j.mrrev.2011.04.002. Epub 2011 Apr 16. PMID: 21540125.
7. Tanaka A, Tanaka I, Nagayoshi M, Awata S, Himeno N, et al. In vitro culture of the immature spermatogenic cells. *Fertil Steril* 2006; 86: Suppl S518–9.