LIỆU PHÁP TẾ BÀO GỐC TRONG BẢO TỒN KHẢ NĂNG SINH SẢN NAM GIỚI

CN. Nguyễn Thị Minh Phượng[1], KS. Trương Văn Hải[2], ThS. Huỳnh Trọng Kha[1]

[1]Bệnh viện đa khoa Mỹ Đức; [2]Bệnh viện Đại học Buôn Ma Thuột

ĐẶT VẤN ĐỀ

Với sự tiến bộ của khoa học kỹ thuật, tỷ lệ sống sót sau điều trị ung thư ngày càng tăng lên, theo thống kê của American Cancer Society tỷ lệ tử vong đã giảm đáng kể, khoảng 32% từ năm 1991 đến năm 2019. Tuy nhiên, việc sử dụng các phác đồ hóa trị/xạ trị có khả năng gây độc tuyến sinh dục, tế bào mầm sinh tinh hoặc tác động tiêu cực đến khả năng sản xuất tinh trùng của tinh hoàn. Do đó, dẫn đến tình trạng vô tinh (azoospermia) tạm thời trong khoảng từ 1–5 năm sau điều trị, hoặc tệ hơn là vô sinh vĩnh viễn (khoảng 24%) (Howell SJ và cs., 2005). Trữ lạnh tinh trùng được coi là phương pháp hiệu quả nhất hiện tại để bảo tồn khả năng sinh sản trước khi điều trị ung thư, nhưng đối với nhóm bệnh nhân là các bé trai trước tuổi dậy thì, phương pháp này không khả thi do quá trình sinh tinh chưa diễn ra. Ngoài ra, như đã biết sinh tinh là một quá trình phức tạp ở nam giới, khi quá trình này bất thường dẫn đến không sản xuất được tinh trùng. Ở nhóm bệnh nhân này vẫn mong muốn có con của chính họ, hướng tiếp cận sẽ như thế nào? Từ hiện thực trên, nhu cầu tìm kiếm một phương pháp mới để bảo tồn khả năng sinh sản cho những bệnh nhân kể trên là vô cùng cần thiết. Hiện tại, chiến lược sử dụng tế bào gốc trong bảo tồn khả năng sinh sản nam giới đang rất được quan tâm.

Trong vòng 25 năm qua, sau khi gặt hái được những thành công nhất định trong lĩnh vực này, nhiều trung tâm trên thế giới đã tiến hành bảo quản lạnh mô tinh hoàn của bệnh nhân trước tuổi dậy thì trước khi điều trị ung thư, với hy vọng sử dụng liệu pháp SSC (spermatogoginal stem cells: tế bào gốc sinh tinh) để phục hồi khả năng sinh sản sau khi bệnh nhân khỏi bệnh. Ngoài ra, SSC còn được chứng minh là một nguồn nguyên liệu tuyệt vời có thể sử dụng để phục hồi khả năng sinh sản nam trong tương lai, không chỉ ở nhóm bệnh nhân điều trị ung thư mà còn có tác dụng trên đối tượng bị azoospermia (vô tinh), hay không tìm thấy tinh trùng trong mẫu thủ thuật. Các hướng tiếp cận gồm: (i) Tế bào gốc sinh tinh (spermatogonial stem cells – SSC), (ii) iPSC (tế bào gốc vạn năng cảm ứng), (iii) tế bào gốc trưởng thành, SSC đang được lựa chọn sử dụng nhiều nhất (Gauthier–Fisher và cs., 2020).

TỔNG QUAN VỀ TẾ BÀO GỐC SINH TINH

Tế bào gốc sinh tinh được xếp vào loại tế bào gốc vạn năng và được định nghĩa dựa trên chức năng riêng biệt của chúng: "sản xuất các tế bào sinh tinh, hướng tới quá trình sinh tinh (biệt hóa)" và "sản xuất SSC (tự đổi mới)" (Wu và cs., 2019). Tương tự như các loại tế bào gốc khác trong cơ thể, SSC chiếm một phần rất nhỏ, khoảng 0,03% trên tổng số tế bào trong tinh hoàn (Aponte và cs., 2015).

SSC tồn tại ở màng đáy của các ống sinh tinh, được bao bọc bởi các tế bào Sertoli, tế bào Leydig

và các tế bào soma khác tạo thành tổ hợp được gọi là hốc SSC (niche SSC) (Gauthier-Fisher và cs., 2020). Đây là nơi có thể tiếp nhận, điều chỉnh các tín hiệu do các tế bào này tạo ra hoặc nội tiết (FSH, LH), cung cấp dinh dưỡng, cũng như tín hiệu phục vụ cho các đặc tính riêng biệt của SSC. Sự suy giảm điều hòa ở bất kỳ loại tế bào nào trong số này và các chức năng liên quan của chúng có thể ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp đến quá trình sinh tinh và chức năng tuyến sinh dục. Các yếu tố như glial–derived neurotrophic factor (GDNF), bone morphogenic proteins (BMP4, BMP6), yếu tố ức chế bạch cầu (LIF), yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF2, FGF5), yếu tố có nguồn gốc từ mô đệm (SDF1) và nhân tố kích thích cụm 1 (CSF–1) được sản xuất từ chính các tế bào tại hốc SSC và có liên quan tới sự tự đổi mới và biệt hóa của SSC, vì vậy được bổ sung vào môi trường nuôi cấy phục vụ cho việc biệt hóa của SSC trong điều kiện in vitro (Gauthier–Fisher và cs., 2020).

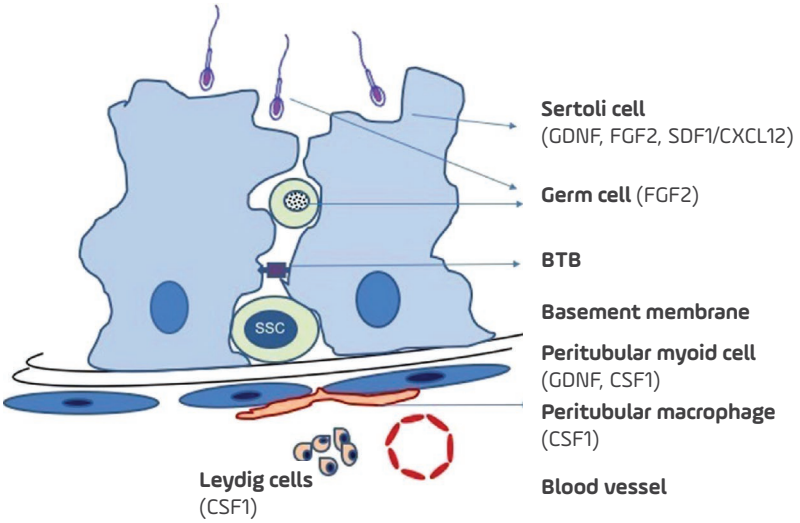
LIỆU PHÁP TẾ BÀO GỐC SINH TINH TRONG BẢO TỒN KHẢ NĂNG SINH SẢN NAM

Năm 1994, Brinsten và cộng sự thành công cấy ghép SSC vào tinh hoàn chuột vô sinh. Sự kiện này đã mở ra một hướng đi đầy tiềm năng cho công cuộc bảo tồn khả năng sinh sản ở nam giới. Đồng thời, cùng sự cải thiện của quy trình đông lạnh và tiến bộ lâm sàng góp phần thúc đẩy kỹ thuật này ngày càng phát triển. Có ba phương thức tiếp cận đối với SSC để bảo tồn khả năng sinh sản: (i) ghép mô tinh hoàn, (ii) ghép tế bào gốc sinh tinh (iii) biệt hóa tinh trùng trong ống nghiệm. Để có được nguồn nguyên liệu cho cả 3 phương pháp này, mô tinh hoàn được phân lập bằng kỹ thuật TESE, tùy vào từng trung tâm và tình trạng bệnh nhân để có thể quyết định cắt 1 phần, 1 bên hay cả 2 bên.

Liệu pháp ghép mô tinh hoàn

Với mục đích bảo quản và tái cấy ghép mô tinh hoàn của nam giới trước tuổi dậy thì bị ung thư, phục hồi quá trình sinh tinh và duy trì nội tiết tố, nhằm bảo tồn khả năng sinh sản. Lợi ích lớn nhất của việc đông lạnh mô tinh hoàn chính là mô tinh hoàn sau rã có thể sử dụng mô tinh hoàn với đầy đủ các tế bào xung quanh, hoặc có thể phân lập nguồn SSC đồng nhất (Arregui và cs., 2015).

Khi thực hiện liệu pháp này, bệnh nhân có thể lựa chọn: ghép trực tiếp tại tinh hoàn người bệnh hoặc ghép đồng loài/dị loài dưới da lưng của người nhận tương thích hay chuột suy giảm miễn dịch. Đối với ghép trực tiếp tại tinh hoàn, bệnh nhân có thể tận dụng được các hormone và tín hiệu trục hạ đồi, tuyến yên, tinh hoàn như



Hình 1. Hốc SSC. (Kadam và cs., 2016)

sinh lý bình thường. Tuy nhiên, hoại tử và đào thải của mảnh ghép làm mất hiệu quả và có thể làm tổn thương các vùng lân cận dẫn đến những hệ lụy xấu hơn. Trên mô hình động vật, người ta nhận thấy mô tinh hoàn chưa trưởng thành của nhiều loài như: chuột, lợn, dê, chó, mèo, ngựa, khỉ… được ghép dưới da lưng của chuột suy giảm miễn dịch có thể sản xuất tinh trùng có khả năng thụ tinh và tạo ra thế hệ con khỏe mạnh. Tính đến thời điểm hiện tại, có khoảng 23 loài động vật đã được ghi nhận thành công trong việc bảo tồn khả năng sinh sản thông qua ghép mô tinh hoàn.

Năm 2019, Fayomi và cộng sự tiến hành thu nhận mô tinh hoàn của 5 con khỉ Rhesus mới sinh, đông lạnh những mảnh mô có kích thước từ 9 – 20 mm^3 trong khoảng bảy tháng. Sau đó, những mảnh mô tươi từ tinh hoàn còn lại cũng được thu nhận. Nhóm nghiên cứu tiến hành ghép đối xứng mô tinh hoàn đông lạnh và tươi tự thân vào vùng lưng, tinh hoàn, có bổ sung thêm matrigel (thúc đẩy phục hồi thành mạch). Sau 12 tháng, mức độ testosterone tăng, mức FSH nằm trong giới hạn bình thường, cho thấy có sự phục hồi về chức năng của trục hạ đồi – tuyến yên – tinh hoàn. Ngoài ra, các mảnh ghép này cũng có sự phục hồi về chức năng và có khả năng sinh tinh trùng. Những tinh trùng này được thu nhận, ICSI với noãn trưởng thành, tạo ra thế hệ con khỏe mạnh (Fayomi và cs., 2019).

Hình 2. Chú khỉ Grady được sinh ra từ phương pháp ghép mô tinh hoàn ngày 16.04.2016.
(Fayomi và cs., 2019)

Tương tự, Honaramooz và cộng sự (2020) tiến hành ghép các mảnh mô tinh hoàn từ chuột, lợn, dê vào dưới da của chuột trưởng thành. Kết quả, các mảnh mô có thể tồn tại đến tuần 18 sau khi ghép, duy trì nội tiết và hình thành tinh trùng chức năng, có khả năng thụ tinh với noãn trưởng thành thông qua ICSI. Dựa trên các nghiên cứu trên mô hình động vật, hoàn toàn có thể kỳ vọng về việc ghép mô tinh hoàn chưa trưởng thành từ một người sống sót sau ung thư vào thời điểm trước dậy thì vào vật chủ động vật để sản xuất tinh trùng nhằm bảo tồn khả năng sinh sản (Hình 2).

Ở người, kể từ chương trình bảo tồn khả năng sinh sản thử nghiệm đầu tiên cho các bé trai (trước) dậy thì vào năm 2002, nhiều trung tâm trên thế giới đã bắt đầu thu thập và đông lạnh mô tinh hoàn chưa trưởng thành từ các bé trai có nguy cơ mất SSC. Một khảo sát đa trung tâm được thực hiện vào năm 2019 cho thấy mô tinh hoàn của hơn 1.000 bé trai trước dậy thì bị ung thư đã được đông lạnh, tăng gấp 4 lần so với cuộc khảo sát đầu tiên vào năm 2012. Kết quả này nhấn mạnh những nỗ lực ngày càng tăng trong nhận thức bảo tồn khả năng sinh sản trước điều trị ung thư và khả năng chấp nhận của các chương trình bảo quản lạnh mô tinh hoàn chưa trưởng thành.

Liệu pháp ghép tế bào gốc sinh tinh

Đây được đánh giá là phương pháp tiềm năng để hồi phục khả năng sinh sản tự nhiên ở nam giới, dựa trên cơ chế "homing" của SSC. Các SSC được tiêm vào tinh hoàn sẽ di chuyển về màng đáy ống sinh tinh, đến các hốc SSC và bắt đầu quy trình tự đổi mới cũng như biệt hóa tạo tinh trùng chức năng và các tế bào khác.

Quy trình phân lập SSC bao gồm hai giai đoạn, đầu tiên là xử lý mô sinh thiết tinh hoàn bằng các enzyme cắt (collagenase I hoặc IV, trypsin, hyaluronidase và DNAse I), SSC được chọn lọc thông qua các kháng thể đặc hiệu được sử dụng để tách SSC (chọn lọc dương tính) và loại trừ các tế bào khác (chọn lọc âm tính) thông

qua một trong hai phương pháp: phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang thông qua dòng chảy tế bào (FACS) và phân loại tế bào kích hoạt từ tính (MACS). Sau đó, SSC được nuôi cấy tăng sinh (chủ yếu bao gồm các chất dinh dưỡng, huyết thanh và các yếu tố tăng trưởng như LIF, FGF2 và EGF, và chất nền ngoại bào) giúp làm giàu số lượng SSC, đồng thời thu nhận được quần thể đồng nhất (Ibtisham và Honaramooz, 2020). Khi tăng sinh đến số lượng nhất định, nguồn SSC sẽ được tiêm vào tinh hoàn của bệnh nhân. Vị trí tiêm SSC được xác định thông qua siêu âm tĩnh điện, bao gồm: ống sinh tinh, lưới tinh hoàn và ống xuất.

Việc ứng dụng tiêm SSC trên người vẫn còn hạn chế, tuy nhiên các kết quả đáng mong đợi trên động vật đã được báo cáo. Brook và cộng sự (2001) đã thực hiện tiêm SSC vào lưới tinh hoàn, các đánh giá đại thể của các ống sinh tinh cho thấy khả năng lấp đầy SSC đạt khoảng 55%. Tiếp nối thành công này, năm 2013, Fase và cộng sự cũng thực hiện tiêm SSC kết hợp siêu âm tĩnh điện, thông qua kỹ thuật xạ hình (Single–photon–emission–computerized tomography – SPECT), các đánh giá mô học đã một lần nữa khẳng định hiệu quả của phương pháp này. Kết quả tương tự cũng được nhóm nghiên cứu này báo cáo vào năm 2017.

Về mặt lâm sàng, ngoài vị trí tiêm, thể tích và nồng độ tiêm SSC cũng cần được lưu ý. Việc tìm ra một giá trị thích hợp có thể quyết định sự thành công của phương pháp điều trị. Nồng độ hoặc thể tích lớn có thể dẫn đến sự tắc nghẽn cản trở quá trình di chuyển vào ống sinh tinh, trong một số trường hợp còn dẫn tới tình trạng giảm lưu lượng máu lưu thông gây thiếu máu cục bộ (Gul và cs., 2020). Nhiên cứu của Faes và cộng sự cho thấy thể tích 1400 μl và mật độ 10 triệu tế bào/ml nên được lựa chọn để tiêm SSCs để đem lại hiệu quả tối ưu nhất (Faes và cs., 2013).

Biệt hóa tinh trùng trong ống nghiệm

Cùng với kỹ thuật ghép mô tinh hoàn hoặc SSC, người ta kỳ vọng rằng có thể tạo ra tinh trùng trong ống nghiệm với vật liệu ban đầu là SSC đã được phân lập, định danh hoặc mảnh mô tinh hoàn cùng với điều kiện nuôi cấy cảm ứng thích hợp. Phương pháp này được cho là an toàn hơn, giảm lo ngại về thay đổi di truyền biểu sinh, không xâm lấn, không phải ghép dị loài và sót lại tế bào ung thư trong mẫu ở các bệnh nhân ung thư.

Năm 2011, Sato và cộng sự đã báo cáo cảm ứng biệt hóa thành công tinh trùng chuột từ mảnh mô tinh hoàn trong môi trường nuôi cấy có bổ sung 10% huyết thanh bò. Mô tinh hoàn được nuôi cấy duy trì trong 2 tháng, có khả năng sản xuất tinh trùng chức năng bình thường. Sau khi thụ tinh tạo thế hệ con bình thường, có khả năng sinh sản (Sato và cs., 2011). Năm 2016, Komeya đã tiến hành nuôi cấy lâu dài đến khoảng 6 tháng các mô tinh hoàn chuột sơ sinh trong hệ thống microfluidic, kết quả cho thấy những giao tử đơn bội dạng tròn hoặc tinh trùng đầy đủ có thể được cảm ứng biệt hóa tạo thành. Một số nghiên cứu đã báo cáo về các trường hợp sử dụng những giao tử này thông qua ROSI (Round spermatid injection – tiêm tinh tử tròn) hoặc ICSI với noãn trưởng thành, đều có khả năng thụ tinh, phát triển phôi và sản sinh thế hệ con cái khỏe mạnh. Hơn nữa, những mảnh mô tinh hoàn nuôi cấy có thể sản xuất testosterone khoảng 2,4 ~ 24,0 (μg /ngày/g tinh hoàn), tương đương với tinh hoàn bình thường. Giá trị này có thể tăng lên gấp 3,8 lần khi bổ sung LH vào môi trường nuôi (Komeya và cs., 2016).

SSC hoặc mô tinh hoàn có thể được nuôi cấy trong các hệ thống 3 chiều trong môi trường và tác nhân biệt hóa thích hợp. Từ nguồn SSC của khỉ Rheus, Huleihel và cộng sự (2015) đã tiến hành nuôi cấy trên hệ thống nuôi cấy ba chiều. Kết quả, trong điều kiện bổ sung FSH, testosterone và huyết thanh, có thể làm giàu SSC và cảm ứng biệt hóa thành tinh trùng chức năng (Huleihel và cs., 2015). Trên mô hình động vật, đã có nhiều báo cáo cảm ứng biệt hóa thành công tinh trùng trong ống nghiệm, tuy nhiên

cũng có những nghiên cứu chỉ có sự duy trì cấu trúc tinh hoàn, tăng sinh SSC và tăng sinh nội tiết nhưng không sinh tinh. Do đó, cần phải xây dựng hệ thống nuôi cấy thích hợp, với điều kiện tăng sinh và cảm ứng thích hợp để có thể tiêu chuẩn hóa quá trình nuôi cấy. Mặt khác, cần có những đánh giá cụ thể về những biến đổi thượng di truyền khi nuôi cấy và cảm ứng trong điều kiện nhân tạo (Portela và cs., 2019).

NHÌN NHẬN

Hiện tại, vai trò của liệu pháp sử dụng tế bào gốc sinh tinh trong bảo tồn khả năng sinh sản nam đã được chứng minh trên mô hình động vật. Tuy nhiên, chưa có những thành công nhất định đối với con người. Để đạt được hiệu quả, chúng ta phải đối mặt với những thách thức về mặt lâm sàng cũng như nghiên cứu ứng dụng (Goossens và cs., 2020).

Thách thức lâm sàng

– Tối ưu hóa các tiêu chí nhận và loại trừ bệnh nhân, tư vấn cho bệnh nhân về tầm quan trọng của bảo tồn khả năng sinh sản trước khi điều trị ung thư.

– Phát triển các quy trình để kiểm tra bệnh tật còn sót lại tối thiểu của mô tinh hoàn.

– Xây dựng quy trình theo dõi bệnh nhân sau sinh thiết tinh hoàn.

Thách thức trong nghiên cứu

– Cần phải tiêu chuẩn hóa các quy trình để thu nhận mô tinh hoàn, phân loại tế bào để phân lập tế bào gốc sinh tinh (SSC) và/hoặc loại trừ tế bào ung thư.

– Tối ưu hóa quy trình đông lạnh, rã đông mô tinh hoàn, SSC và quy trình xử lý mẫu trước và sau khi rã đông nhằm đảm bảo chất lượng mẫu.

– Tối ưu hóa liều, thể tích truyền SSC.

– Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy, biệt hóa tinh trùng người trong ống nghiệm thông qua các hệ thống nuôi cấy cải tiến.

– Đánh giá tính ổn định di truyền và biểu sinh, tính an toàn của các SSC của người được bảo quản lạnh, nuôi cấy, cấy ghép và tinh trùng được nuôi cấy trong ống nghiệm.

– Đánh giá khả năng thụ tinh của tinh trùng thu được sau khi phục hồi khả năng sinh sản.

Nhìn chung, trong bối cảnh tỷ lệ bệnh nhân vô sinh không do tắc ngày càng tăng, đặc biệt là những bệnh nhân sống sót sau điều trị ung thư, xu hướng trữ mô tinh hoàn nhằm bảo tồn khả năng sinh sản đã và đang được mở rộng ở nhiều trung tâm trên thế giới. Trong tương lai, tối ưu hóa quy trình phân lập, đông lạnh, nuôi cấy, thực hành lâm sàng cũng như sự phát triển của hệ thống nuôi cấy 3D, in dấu sinh học sẽ góp phần vào thành công của phương pháp đầy tiềm năng này. Chúng ta hoàn toàn có thể mong đợi vào khả năng có con tự thân của những bệnh nhân vô tinh không do tắc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. Gauthier-Fisher, A. Kauffman, and C. L. Librach, "Potential use of stem cells for fertility preservation," Andrology, vol. 8, no. 4, pp. 862–878, Jul. 2020, doi: 10.1111/andr.12713.
2. P. M. Aponte, "Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine," World J Stem Cells, vol. 7, no. 4, pp. 669–680, May 2015, doi: 10.4252/wjsc.v7.i4.669.
3. A. P. Fayomi et al., "Autologous Grafting of Cryopreserved Prepubertal Rhesus Testis Produces Sperm and Offspring," Science, vol. 363, no. 6433, pp. 1314–1319, Mar. 2019, doi: 10.1126/science.aav2914.
4. M. Gul et al., "Review of injection techniques for spermatogonial stem cell transplantation," Human Reproduction Update, vol. 26, no. 3, pp. 368–391, Apr. 2020, doi: 10.1093/humupd/dmaa003.
5. K. Faes, H. Tournaye, L. Goethals, T. Lahoutte, A. Hoorens, and E. Goossens, "Testicular cell transplantation into the human testes," Fertility and Sterility, vol. 100, no. 4, pp. 981–988.e4, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.06.016.
6. T. Sato et al., "In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes," Nature, vol. 471, no. 7339, pp. 504–507, Mar. 2011, doi: 10.1038/nature09850.
7. M. Huleihel, S. Nourashrafeddin, and T. M. Plant, "Application of three-dimensional culture systems to study mammalian spermatogenesis, with an emphasis on the rhesus monkey (Macaca mulatta)," Asian J Androl, vol. 17, no. 6, pp. 972–980, 2015, doi: 10.4103/1008-682X.154994.
8. J. M. D. Portela et al., "Assessment of fresh and cryopreserved testicular tissues from (pre)pubertal boys during organ culture as a strategy for in vitro spermatogenesis," Hum Reprod, vol. 34, no. 12, pp. 2443–2455, Dec. 2019, doi: 10.1093/humrep/dez180.
9. E. Goossens et al., "Fertility preservation in boys: recent developments and new insights †," Hum Reprod Open, vol. 2020, no. 3, p. hoaa016, Jun. 2020, doi: 10.1093/hropen/hoaa016.