

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐÔNG LẠNH THỦ CÔNG TINH TRÙNG NGƯỜI TRONG CRYOTUBE, SO SÁNH VỚI ĐÔNG LẠNH BẰNG MÁY TỰ ĐỘNG

Nguyễn Hữu Duy¹, Nguyễn Thị Mai¹, Hồ Mạnh Trường², Hoàng Nghĩa Sơn³

¹Bệnh viện Vạn Hạnh, thành phố Hồ Chí Minh

²Bệnh viện An Sinh, thành phố Hồ Chí Minh

³Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm tìm ra quy trình đông lạnh thủ công tinh trùng người ổn định để có thể triển khai áp dụng rộng rãi cho các trung tâm điều trị vô sinh trong cả nước, góp phần giảm giá thành và chi phí điều trị vô sinh cho bệnh nhân. Nguồn mẫu được lấy từ các bệnh nhân đến thụ tinh dịch đồ tại IVF Vạn Hạnh, có tinh dịch đồ bình thường (nhóm I) - hoặc OAT (nhóm II) (WHO, 1999) và đông ý cho mẫu. Mỗi mẫu được chia đôi: ½ đông thủ công, ½ đông bằng máy (CryoLogic, Úc). Quy trình đông tinh thủ công này được xây dựng dựa theo biểu đồ hạ nhiệt độ của máy CryoLogic. Hiệu quả đông lạnh của hai phương pháp được đánh giá dựa trên: độ di động và tỷ lệ sống của tinh trùng trước và sau khi rã đông. Dụng cụ đông lạnh thủ công tinh trùng người được sử dụng là một hộp xốp (dài 38 cm; rộng 28,5 cm; cao 27 cm). Kết quả xác định được 15cm (từ vị trí đặt mẫu đến bề mặt nitrogen lỏng) là khoảng cách có biểu đồ hạ nhiệt gần giống nhất với chương trình của máy. Kết quả thu được về tỷ lệ di động và tỷ lệ sống ở nhóm I (50 mẫu) và nhóm II (40 mẫu) cho thấy không có sự khác biệt mang ý nghĩ thống kê giữa 2 phương pháp. Như vậy, đông lạnh tinh trùng người bằng phương pháp thủ công đo chúng tôi xây dựng có thể là một phương pháp thay thế có hiệu quả và chi phí thấp so với dùng máy.

Từ khóa: Đông lạnh, phương pháp thủ công, tinh trùng người

MỞ ĐẦU

Ngày nay, đông lạnh tinh trùng người được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực, như dùng để thành lập ngân hàng tinh trùng, trữ mẫu trước khi điều trị ung thư (Anger *et al.*, 2003; Sanger *et al.*, 1992)... Để đông lạnh tinh trùng người, hiện nay các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) trên thế giới đang áp dụng một trong hai phương pháp là đông lạnh thủ công hoặc dùng máy (WHO, 2010). Ở Việt Nam, các trung tâm TTTON nếu sử dụng phương pháp đông lạnh tinh trùng người thủ công thường cũng chỉ áp dụng theo kinh nghiệm hoặc theo các nghiên cứu của nước ngoài mà không biết được sự biến thiên nhiệt độ của quy trình đang áp dụng là như thế nào? Có phù hợp với điều kiện ở Việt Nam hay không? Bên cạnh đó, đến nay chưa có trung tâm TTTON nào ở Việt Nam báo cáo về hiệu quả của đông lạnh tinh trùng người thủ công so với dùng máy.

Do đó, quy trình đông lạnh thủ công của chúng tôi nếu thành công và chứng minh được hiệu quả, có thể triển khai áp dụng rộng rãi ở các trung tâm điều trị vô sinh tại nhiều bệnh viện trong cả nước, góp phần giảm giá thành và chi phí điều trị vô sinh cho bệnh nhân. Trên cơ sở đó, nghiên cứu này tập trung

vào 2 mục tiêu sau:

(1) Xây dựng quy trình đông lạnh thủ công tinh trùng người trong ống đông lạnh (cryotube) trên cơ sở dựa theo biểu đồ hạ nhiệt độ của máy hạ nhiệt độ tự động CryoLogic (Úc).

(2) Đánh giá hiệu quả của quy trình đông lạnh thủ công tinh trùng người này so với phương pháp dùng máy hạ nhiệt độ tự động CryoLogic (Úc).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu tinh trùng

Nguồn mẫu tinh trùng người được thu nhận từ các bệnh nhân trong độ tuổi từ 29 - 44, thụ tinh dịch đồ tại Khoa Hiếm muộn - Bệnh viện Vạn Hạnh sau khi đã được sự đồng ý của các bệnh nhân này. Các mẫu tinh dịch được thu nhận sau khi bệnh nhân kiêng quan hệ tình dục từ 3 - 5 ngày.

Dụng cụ - Hóa chất

Dụng cụ: (1) ống đông lạnh cryotube 1,8 ml (Nuncclon - Đan Mạch); (2) một hộp xốp (dài 38 cm;

rộng 28,5 cm; cao 27 cm). Bên trong chứa một lượng nitrogen lỏng có chiều cao 3 cm; (3) máy hạ nhiệt độ tự động CryoLogic (Úc); (4) thiết bị đo nhiệt độ Testo 175-T3 (Testo AG - Đức).

Hóa chất: môi trường đông lạnh tinh trùng Sperm Freeze (FertiPro - Bi). Môi trường Sperm Freeze có chứa hệ đệm HEPES, 15% glycerol và 0,4% albumin huyết thanh người

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên 90 mẫu tinh dịch chia làm 2 nhóm:

Nhóm I: 50 mẫu có tinh dịch đồ bình thường: mật độ tinh trùng $\geq 20.10^6/ml$, độ di động của tinh trùng A+B $\geq 50\%$, hình dạng bình thường $\geq 15\%$, tỷ lệ tinh trùng sống $\geq 70\%$ (WHO, 1999). Thông qua nhóm I này nhằm đánh giá hiệu quả của quy trình so với máy trong đông lạnh các mẫu tinh trùng bình thường dùng cho IUI, IVF hoặc ngân hàng tinh trùng.

Nhóm II: 40 mẫu có tinh dịch đồ OAT (Oligo-Astheno-Teratozoospermia - tinh trùng ít, yếu, dị dạng): mật độ tinh trùng $< 20.10^6/ml$, độ di động của tinh trùng A+B $\leq 20\%$, hình dạng bình thường $< 15\%$ (WHO, 1999). Mục đích là nhằm đánh giá hiệu quả của quy trình thủ công do chúng tôi xây dựng so

với dùng máy trong đông lạnh tinh trùng OAT phục vụ cho điều trị các bệnh nhân bị thiểu năng tinh trùng.

Mỗi mẫu trong 2 nhóm này được chia đều thành hai phần: $\frac{1}{2}$ đông lạnh bằng phương pháp thủ công và $\frac{1}{2}$ được đông lạnh bằng máy để đối chứng.

Mỗi mẫu tinh dịch sẽ được đánh giá 2 chỉ tiêu: độ di động và tỷ lệ sống của tinh trùng trước đông lạnh và sau rã đông. Độ di động của tinh trùng sẽ được xác định bằng máy bách phân bạch cầu, tỷ lệ sống của tinh trùng sẽ được đánh giá bằng phương pháp nhuộm Eosin - Nigrosin.

Để tiên lượng khả năng thu nhận tinh trùng di động sau rã đông, chúng tôi sử dụng chỉ số CSF (Cryosurvival Factor - hệ số sống sót sau rã đông). CSF sẽ giảm nhiều nếu số lượng và chất lượng tinh trùng trước đông lạnh kém.

$$CSF (\%) = \frac{\% \text{ tinh trùng di động sau rã đông}}{\% \text{ tinh trùng di động trước rã đông}} \times 100$$

Công thức tính tỷ lệ sống của tinh trùng sau khi rã đông nhuộm bằng phương pháp Eosin - Nigrosin:

$$\text{Tỷ lệ sống sau rã đông (\%)} = \frac{\% \text{ số lượng tinh trùng sống sau rã đông}}{\% \text{ số lượng tinh trùng sống trước đông lạnh}} \times 100$$

Các số liệu thu được sẽ được xử lý bằng phần mềm SPSS 17.0.

Chuẩn bị tinh trùng trước đông lạnh

Môi trường Sperm Freeze (FertiPro - Bi) được sử dụng để đông lạnh tinh trùng trong các thí nghiệm của chúng tôi. Trước khi sử dụng, môi trường Sperm Freeze (được bảo quản lạnh ở $4^{\circ}C$) sẽ được để ở nhiệt độ phòng khoảng 10 phút. Pha tinh dịch và môi trường Sperm Freeze theo tỷ lệ 1:1. Sau đó, hỗn hợp tinh dịch - Sperm Freeze sẽ được chia đều vào 2 cryotube, đậy chặt nắp và giữ ổn định ở nhiệt độ phòng trong khoảng 10 phút trước khi đem đi đông lạnh. Trên mỗi cryotube đều được ghi lại các thông tin về tên bệnh nhân, năm sinh và ngày đông lạnh tinh trùng.

Đông lạnh bằng máy hạ nhiệt độ tự động CryoLogic

Theo quy trình đã chỉ định sẵn: cho nitrogen lỏng vào bình chứa nitrogen lỏng của máy. Tiếp theo, gắn chặt cryotube vào giá giữ mẫu của máy và đặt vào trong buồng làm lạnh của máy sau khi máy đã được điều chỉnh về $20^{\circ}C$. Sau đó, cho máy chạy chương trình đông lạnh tinh trùng của hãng Cryologic. Khi máy chạy đến nhiệt độ $-50^{\circ}C$ (mất khoảng 15 phút) sẽ phát ra âm thanh báo hiệu, lúc này cryotube sẽ được lấy ra khỏi buồng làm lạnh của máy, cho vào nitrogen lỏng và bảo quản trong thùng chứa nitrogen lỏng.

Chương trình hạ nhiệt của máy: bắt đầu ở $20^{\circ}C$, giảm $6^{\circ}C/phút$ đến $-20^{\circ}C$ và giữ ở nhiệt độ này trong 2 phút; sau đó giảm $5^{\circ}C/phút$ đến $-30^{\circ}C$; giảm

4°C/phút đến -50°C. Sau đó, cho mẫu vào nitrogen lỏng để bảo quản.

Thiết lập quy trình đông lạnh thủ công tinh trùng người trong cryotube

Quy trình đông lạnh này được thiết lập dựa theo biểu đồ hạ nhiệt và thời gian hoàn thành quá trình đông lạnh của máy hạ nhiệt độ Cryologic (Úc). Để xác định được biểu đồ hạ nhiệt này trong hơi nitrogen lỏng, chúng tôi sử dụng thiết bị đo nhiệt độ Testo 175-T3 (Testo AG - Đức), và dùng thiết bị này lần lượt đo nhiệt độ hơi nitrogen lỏng trong cryotube ở các khoảng cách 5; 10; 15 và 20 cm so với bề mặt nitrogen lỏng trong thời gian 15 phút với mực nitrogen lỏng cố định trong hộp xốp là 3 cm. Mỗi khoảng cách sẽ được đo nhiệt độ 3 lần và lấy kết quả trung bình cộng. Nhiệt độ bên trong cryotube được xác định thông qua một đầu dò nhiệt độ gắn với máy Testo 175-T3, cứ 1 phút thông báo nhiệt độ một lần cho đến khi nhiệt độ ổn định (15 phút). Từ đó chúng tôi sẽ xác định khoảng cách nào từ mẫu đông lạnh đến

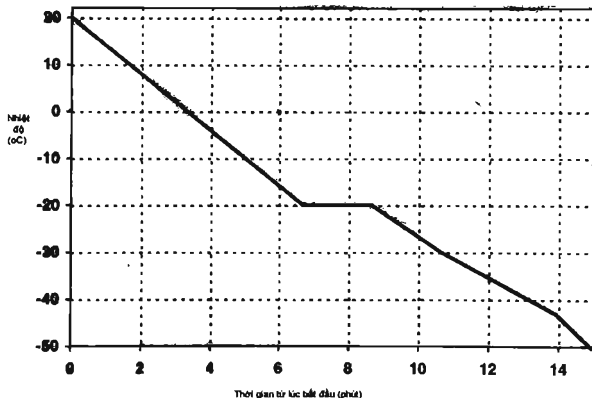
bề mặt nitrogen lỏng phù hợp nhất với thời gian và biểu đồ nhiệt của chương trình máy.

Điều kiện tiến hành thí nghiệm: (1) Mực nitrogen lỏng trong hộp xốp là 3 cm; (2) Không để ánh nắng hoặc ánh sáng chiếu trực tiếp vào hộp xốp đông lạnh mẫu; (3) Nhiệt độ phòng ở 28°C.

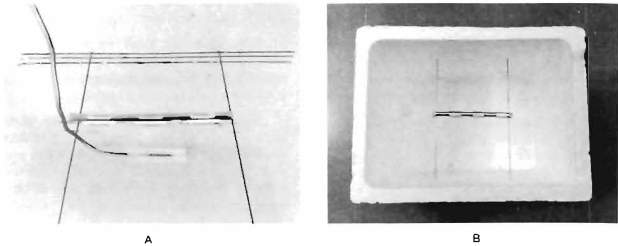
Khi đã xác định được khoảng cách thích hợp, cryotube chứa mẫu tinh trùng đông lạnh sẽ được gắn vào một thanh nhôm đặt ở vị trí thích hợp trong 15 phút. Sau 15 phút, mẫu sẽ được nhúng trực tiếp vào nitrogen lỏng trong hộp xốp và đem đi cất trong thùng nitrogen lỏng để bảo quản mẫu.

Rã đông mẫu

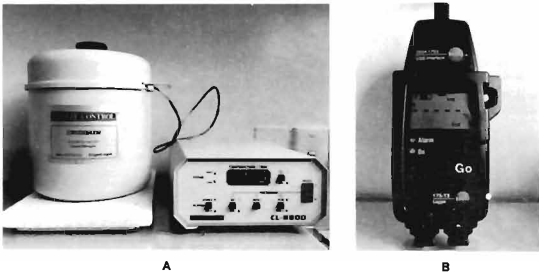
Các mẫu trữ sau khi được lấy ra sẽ được để ở nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian 15 - 20 phút cho rã đông. Sau khi mẫu đã rã đông hoàn toàn, chúng tôi sẽ tiến hành đánh giá 2 chỉ tiêu là độ di động và tỷ lệ sống sau rã đông và so sánh với 2 chỉ tiêu này trước khi đông lạnh, từ đó rút ra các kết luận cụ thể.



Hình 1. Biểu đồ hạ nhiệt độ trong đông lạnh tinh dịch của máy CryoLogic.



Hình 2 A Nhiệt độ bên trong cryotube được xác định thông qua đầu dò nhiệt độ; B Hộp xốp đông lạnh mẫu.



Hình 3. A. Máy hạ nhiệt độ tự động CryoLogic (Úc) B Máy đo nhiệt độ Testo 175-T3.

KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

Kết quả xác định khoảng cách

Thông qua các kết quả nhiệt độ thu được bằng thiết bị Testo 175-T3, chúng tôi có được kết quả trung bình nhiệt độ biến thiên ở các khoảng cách như đã nêu theo bảng sau:

Qua bảng 1 ta thấy: các khoảng cách 5 cm, 10 cm và 20 cm đều có biểu đồ hạ nhiệt rất khác so với của máy, cũng như là nhiệt độ cuối ở phút 15 hoặc là rất thấp ($-135,9^{\circ}\text{C}$ ở 5 cm; $-80,7^{\circ}\text{C}$ ở 10 cm) hoặc rất cao ($-26,1^{\circ}\text{C}$ ở 20 cm) so với máy (-50°C). Ngược lại, ở khoảng cách 15 cm, nhiệt độ ban đầu ($22^{\circ}\text{C} \pm 1,61$) và nhiệt độ cuối ở phút 15 ($50^{\circ}\text{C} \pm$

$0,3$) khá giống máy. Mặt khác, tốc độ hạ nhiệt ở khoảng cách 15 cm so với bề mặt nitrogen lỏng khá ổn định và không dao động quá lớn so với các khoảng cách còn lại, giảm khoảng $10^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ từ lúc bắt đầu đến -39°C , giảm khoảng $2^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến $-46,2^{\circ}\text{C}$ và giảm khoảng $1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến -50°C .

Như vậy, khoảng cách thích hợp từ vị trí đặt mẫu đông lạnh đến bề mặt nitrogen lỏng gần giống nhất với thời gian và biểu đồ hạ nhiệt của máy là 15 cm.

Đánh giá hiệu quả của quy trình

Kết quả đông lạnh tinh trùng nhóm I

Từ 5/2009 - 11/2009, chúng tôi thu được 50 mẫu

tính dịch thỏa các điều kiện nhận mẫu (Bảng 2).

Qua bảng 2 ta thấy các kết quả thu được về mật độ, độ di động, tỷ lệ sống và hình dạng bình thường của tinh trùng đều phù hợp với tiêu chuẩn chọn mẫu đã được đặt ra trong phần "Phương pháp nghiên cứu" đối với nhóm I.

Chỉ số CSF giúp tiên lượng khả năng thu nhận tinh trùng di động sau rã đông. Theo bảng 3, ta thấy chỉ số CSF trung bình của quy trình đông lạnh tinh trùng thủ công và dùng máy lần lượt là

42,23 ± 11,24 và 42,04 ± 12,25. Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,812$). Như vậy, khả năng phục hồi độ di động của tinh trùng sau rã đông ở hai phương pháp là tương đương nhau. Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Verheyen và đồng tác giả (1993) khi cho rằng đối với các mẫu tinh dịch chất lượng tốt thì hiệu quả đông lạnh của phương pháp thủ công và dùng máy là tương đương nhau trong việc phục hồi độ di động của tinh trùng sau trữ lạnh (Verheyen *et al.*, 1993).

Bảng 1. Sự thay đổi nhiệt độ trong 15 phút ở các khoảng cách so với máy.

Thời gian (phút)	5 cm	10 cm	15 cm	20 cm	Máy
0	24,5 ± 1,01	22,1 ± 1,87	22 ± 1,61	25,3 ± 1,15	20
1	-8,47 ± 1,19	6,9 ± 3,43	11,7 ± 0,91	20,9 ± 0,45	14
2	-49,1 ± 5,45	-12,6 ± 5,2	-4,2 ± 1,59	15,3 ± 1,38	8
3	-67,2 ± 18,52	-27,2 ± 14,1	-17,7 ± 2,05	6,4 ± 1,28	2
4	-95,7 ± 13,59	-39,1 ± 15,6	-27,5 ± 2,07	-2,2 ± 0,36	-4
5	-108,3 ± 13,54	-48,8 ± 15,4	-34,4 ± 1,82	-5,6 ± 0,38	-10
6	-118,3 ± 11,86	-54,8 ± 14,75	-39,0 ± 1,66	-10,8 ± 1,21	-16
7	-127,2 ± 8,35	-60,6 ± 13,44	-42,2 ± 1,65	-15,3 ± 2,04	-20
8	-130,7 ± 7,88	-64,3 ± 12,41	-44,4 ± 1,62	-18,7 ± 1,79	-20
9	-133,6 ± 5,92	-67,5 ± 11,2	-46,2 ± 1	-21,3 ± 1,02	-23
10	-134,7 ± 5,3	-70,2 ± 9,83	-47,4 ± 0,95	-23,5 ± 0,95	-28
11	-135,5 ± 4,56	-72,6 ± 8,77	-48,1 ± 0,89	-24,3 ± 1,13	-32
12	-135,7 ± 4,22	-75,1 ± 6,32	-48,8 ± 0,72	-25,3 ± 1,25	-36
13	-135,8 ± 4,01	-77,8 ± 4,33	-49,4 ± 0,55	-25,9 ± 1,04	-39
14	-135,8 ± 3,7	-80,4 ± 2,02	-49,9 ± 0,58	-26,3 ± 0,75	-43
15	-135,9 ± 3,7	-80,7 ± 1,84	-50,0 ± 0,3	-26,1 ± 1,1	-50

Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD)

Bảng 2. Đặc điểm mẫu trước đông lạnh.

Mật độ	81,5 10 ⁶ ± 22,29
Độ di động (A+B) (%)	63,46 ± 5,08
Tỷ lệ sống (%)	77,06 ± 2,49
Hình dạng bình thường (%)	18,38 ± 3,67

Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD)

Bảng 3. Độ di động, tỷ lệ sống trung bình và chỉ số CSF của tinh trùng sau rã đông ở 2 phương pháp đông lạnh (n = 50).

	Trước đông lạnh	Sau rã đông	
		Dùng máy	Thủ công
Độ di động (A+B) (%)	63,46 ± 5,08	26,72 ± 8,22	26,86 ± 7,78
Tỷ lệ sống (%)	77,06 ± 2,49	44,36 ± 1,04 ^(a)	43,80 ± 1,11 ^(a)
Chỉ số CSF trung bình (%)		42,04 ± 12,25 ^(b)	42,23 ± 11,24 ^(b)

(a) p=0,548; (b) p=0,812; Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD).

Theo bảng 3, tỷ lệ sống sau rã đông của quy trình đông thủ công (43,80% ± 1,11) và dùng máy (44,6% ± 1,04) không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê (p = 0,548). Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới (Anger *et al.*, 2003; Ziegler, Chapitis, 1998) cho rằng, với các phác đồ đông lạnh tinh trùng được đơn giản hóa tối đa, tỷ lệ sống của tinh trùng sau rã đông cũng không khác biệt. Nguyên nhân là do tinh trùng người có thể tích nước nội bào ít, không có các bào quan quan trọng như những loại tế bào khác nên ít bị ảnh hưởng bởi quá trình đông lạnh, cũng như là DNA của tinh trùng được sắp xếp và bảo vệ đặc biệt nên ít bị tổn thương (Morris *et al.*, 1999; Morris, 2006; WHO, 2010).

Kết quả đông lạnh tinh trùng nhóm II

Từ 5/2009 - 11/2009, chúng tôi thu được 40 mẫu tinh dịch thỏa các điều kiện nhận mẫu (Bảng 4).

Bảng 4. Đặc điểm mẫu trước đông lạnh.

Mật độ	14,23.10 ⁶ ± 3,77
Độ di động (A+B) (%)	18,58 ± 4,48
Tỷ lệ sống (%)	53 ± 10,96
Hình dạng bình thường (%)	4,15 ± 1,79

Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD).

Qua bảng 4 ta thấy các kết quả thu được về mật độ, độ di động, tỷ lệ sống và hình dạng bình thường của tinh trùng đều phù hợp với tiêu chuẩn chọn mẫu đã được đặt ra trong phần "Phương pháp nghiên cứu" đối với nhóm II.

Theo bảng 5, ta thấy chỉ số CSF trung bình của quy trình đông lạnh tinh trùng thủ công và dùng máy lần lượt là 27,53 ± 17,59 và 27,57 ± 15,91. Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (p = 0,98). Như vậy, khả năng phục hồi độ di động của tinh trùng OAT sau rã đông ở hai phương pháp là tương đương

nau. Kết quả này khá phù hợp với nghiên cứu của Counsel và đồng tác giả (2004) khi nghiên cứu thấy rằng đối với các mẫu chất lượng tinh trùng kém, CSF nằm trong khoảng 29 - 48% [8]. Tuy không phải là yếu tố quyết định hoàn toàn đến khả năng thụ tinh, nhưng độ di động thường được xem là bằng số quan trọng trong việc đánh giá sự thành công hay thất bại của một quy trình đông lạnh - rã đông (Verheyen *et al.*, 1993). Trong nghiên cứu của chúng tôi, độ di động của tinh trùng OAT sau rã đông là tương đương nhau ở cả 2 phương pháp dùng máy và thủ công để chứng minh ngay cả trong trường hợp tinh trùng OAT - một đối tượng rất dễ bị tổn thương do đông lạnh - rã đông, việc sử dụng phương pháp đông lạnh thủ công theo phác đồ của chúng tôi vẫn phát huy hiệu quả tương tự so với đông lạnh bằng máy. Mặc dù CSF của tinh trùng OAT sau rã đông thấp, nhưng với sự ra đời của kĩ thuật ICSI, để thụ tinh thành công với trứng, người ta chỉ cần một lượng nhỏ tinh trùng di động (Trounson, Gardner, 2000; Gardner *et al.*, 2009; Palermo *et al.*, 1992). Vì vậy, việc đông lạnh tinh trùng OAT dùng trong điều trị sử dụng phương pháp thủ công của chúng tôi là khả quan.

Theo bảng 5, tỷ lệ sống sau rã đông của quy trình đông thủ công (28,08% ± 13,29) và dùng máy (28,28% ± 13,13) không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê (p = 0,933). Tỷ lệ tinh trùng sống sau rã đông trong thí nghiệm của chúng tôi giảm khoảng 50% so với trước đông lạnh ở cả hai phương pháp. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu khác trên thế giới về tỷ lệ tinh trùng sống sau rã đông (Trounson, Gardner, 2000; Gardner *et al.*, 2009).

Ngoài hiệu quả đông lạnh tương đương nhau giữa hai phương pháp như đã trình bày ở trên, quy trình đông lạnh thủ công của chúng tôi cũng có thời gian đông lạnh tương đương chương trình đông lạnh của máy (xấp xỉ 15 phút) và tốn một lượng nitrogen nhiều hơn không đáng kể so với máy (1,7 l nitrogen lỏng so với 1,0 l nitrogen lỏng của máy). Chi phí để mua máy hạ nhiệt độ theo chương trình (CryoLogic -

Úc) khoảng hơn 8.000 đô la Mỹ, trong khi chi phí để mua hộp xốp dùng trong quy trình đông lạnh thủ công của chúng tôi chỉ khoảng 40.000 đồng. Qua đó,

có thể thấy quy trình đông lạnh thủ công này giúp tiết kiệm chi phí hơn so với dùng máy mà hiệu quả và thời gian đông lạnh là tương đương nhau.

Bảng 5. Độ di động, tỷ lệ sống trung bình và chỉ số CSF của tinh trùng sau rã đông ở 2 phương pháp đông lạnh (n = 40).

	Trước đông lạnh		Sau rã đông	
			Dùng máy	Thủ công
Độ di động (A+B) (%)	18,58 ± 4,48		5,22 ± 3,4	5,13 ± 3,41
Tỷ lệ sống (%)	53 ± 10,96		28,18 ± 13,13 ^(c)	28,08 ± 13,29 ^(c)
Chỉ số CSF trung bình (%)			27,57 ± 15,91 ^(d)	27,53 ± 17,59 ^(d)

^(c) p=0,933; ^(d) p=0,98

KẾT LUẬN

Như vậy, thông qua các kết quả thu được về độ di động và tỷ lệ sống của tinh trùng sau khi đông lạnh - rã đông ở các mẫu bình thường (nhóm I) cũng như các mẫu OAT (nhóm II), có thể kết luận quy trình đông lạnh thủ công tinh trùng người trong cryotube do chúng tôi xây dựng có thể là một thay thế hiệu quả với chi phí thấp hơn so với dùng máy trong đông lạnh tinh trùng người. Chất lượng tinh trùng (độ di động, tỷ lệ sống cũng như chỉ số CSF) được bảo quản theo hai phương pháp là tương đương nhau.

Lời cảm ơn: Xin chân thành cảm ơn Khoa Hiếm muộn, Bệnh viện Vạn Hạnh đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho chúng tôi trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Trounson AO, Gardner DK (2000) *Handbook of In Vitro Fertilization*. Second Edition, CRC Press.

Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M (2003) Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J Urol* 170: 1079-1084.

Gardner DK, Ariel Weissman, Colin M Howles, Zeev Shoham (2009) *Textbook of Assisted Reproductive Technologies, Volume 1: Laboratory Procedures, Third Edition*. Informa healthcare.

Mortimer D (1994) *Practical Laboratory Andrology*.

Oxford University Press: 301-323.

Morris GJ, Acton E, Avery S (1999) A novel approach to sperm cryopreservation. *Hum Reprod* 14(4): 1013-1021.

Morris GJ (2006) Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Hum Reprod* 21(8): 2075-2083.

Verheyen G, Pletincx I, Van Steirteghem A (1993) Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. *Hum Reprod* 8(10): 1678-1684.

Counsel M, Bellinge R, Burton P (2004) Vitality of oligozoospermic semen samples is improved by both swim-up and density gradient centrifugation before cryopreservation. *J Assist Reprod Genet* 21(5): 137-142.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa onto an oocyte. *Lancet* 340: 17-18.

Sanger WG, Olson JH, Sherman JK, (1992) Semen cryobanking for men with cancer-criteria change. *Fertil Steril* 58: 1024-1027.

WHO (1999) *Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 3rd ed.* New York: Cambridge University Press.

WHO (2010) *Laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth edition*. New York: Cambridge University Press.

Zieqler WF, Chapitis J (1998) Human motile sperm recovery after cryopreservation: freezing in nitrogen vapor vs the direct plunge technique. *Prim Care Update Ob Gyns* 5(4): 170.

DEVELOPMENT OF A MANUAL CRYOPRESERVATION OF HUMAN SPERM IN COMPARISON WITH PROGRAMMABLE FREEZERNguyễn Hữu Duy¹, Nguyễn Thị Mai¹, Hồ Mạnh Tường², Hoàng Nghĩa Sơn^{3,*}¹*IVF Van Hanh, Ho Chi Minh City*²*IVF An Sinh, Ho Chi Minh City*³*Institute of Tropical Biology, Institute of Science and Technology of Vietnam***SUMMARY**

Human sperm cryopreservation is applied in many fields such as sperm banks, samples storage before cancer treatment, radiator therapy *etc.* Sperm freezing can be done manually or by programmable freezers. The latter has been used in most of IVF centers in Vietnam. So far, there is no published data on the manual method made in Vietnam, as well as the effectiveness of manual sperm freezing in Vietnam. This is the first study in Vietnam to compare the effectiveness of manual method (our own protocol) and programmable machine in sperm freezing. A comparison on mobility and vitality of human spermatozoa after thawing has been made between manual freezing (using our own protocol) and programmable freezer (CryoLogic, Australia). Our own manual method is created based on the decline of CryoLogic's temperature chart. We use a spongy box (length 38 cm; width 28.5 cm; height 27 cm) to freeze the samples. We measured four positions calculated from the surface of liquid nitrogen in spongy box: 5 cm; 10 cm; 15 cm; 20 cm. In the spongy box, the destination of 15 cm - calculated from the position samples were laid to the surface of liquid nitrogen - has the most temperature chart approximate to CryoLogic's. At the position of 15 cm, our data showed that manual freezing (using our own protocol) is as effective as programmable machine in recovering the motility and vitality of human sperm. This method could be an effective replacement for programmable freezers, and can be used routinely in any IVF centers to save cost as well as the facilities.

Keywords: cryopreservation, human sperm, manual method

* Author for correspondence: Tel: 84-8-38978791; E-mail: hoangnghiason@itb.ac.vn