

# SO SÁNH HIỆU QUẢ GIỮA KỸ THUẬT MICROFLUIDIC VÀ THANG NỒNG ĐỘ TRONG CHUẨN BỊ TINH TRÙNG Ở CÁC TRƯỜNG HỢP LÀM THỤ TINH TRONG ỐNG NGHIỆM

Đỗ Thùy Hương<sup>1,2</sup>, Đỗ Thị Minh Tâm<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Hoa<sup>1,2</sup>  
Nguyễn Mạnh Hà<sup>1,2</sup>, Hồ Sỹ Hùng<sup>1</sup> và Hồ Nguyệt Minh<sup>3,✉</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

<sup>2</sup>Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Nghiên cứu thử nghiệm so sánh trên 71 mẫu tinh dịch của các cặp vợ chồng làm thụ tinh trong ống nghiệm để đánh giá chất lượng tinh trùng trước và sau xử lý bằng 2 phương pháp: microfluidic và thang nồng độ. Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có nhóm chứng để so sánh kết quả tạo phôi, tỷ lệ có thai giữa nhóm chuẩn bị tinh trùng bằng microfluidic và thang nồng độ. 92 cặp vợ chồng có chỉ định làm thụ tinh trong ống nghiệm vào nghiên cứu được phân nhóm ngẫu nhiên vào hai nhóm. Nhóm 1 là nhóm can thiệp, sử dụng kỹ thuật microfluidic để chuẩn bị tinh trùng, nhóm 2 là nhóm chứng, sử dụng kỹ thuật thang nồng độ để chuẩn bị tinh trùng. Kết quả cho thấy: (1) so với thang nồng độ, chất lượng tinh trùng thu được sau microfluidic: tương đương về các thông số: mật độ, tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới, tỷ lệ thu hồi tinh trùng và tỷ lệ thu hồi tinh trùng tiến tới. Có tỷ lệ sống tốt hơn (97,9% so với 96,2%;  $p = 0,0009$ ), tỷ lệ DFI thấp hơn (0,64 so với 2,3;  $p = 0,0028$ ). (2) So với thang nồng độ, kết quả tạo phôi và tỷ lệ có thai của nhóm chuẩn bị tinh trùng bằng microfluidic: không có sự khác biệt về tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ tạo phôi, tỷ lệ phôi tốt + khá và tỷ lệ có thai của lần chuyển phôi đầu tiên trong chu kỳ chọc trứng. Như vậy, microfluidic làm giảm tỷ lệ DFI tinh trùng tốt hơn đáng kể so với phương pháp thang nồng độ. Tuy nhiên, không có sự khác biệt về tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ tạo phôi, tỷ lệ phôi tốt cũng như tỷ lệ có thai giữa nhóm microfluidic và nhóm thang nồng độ.

**Từ khoá:** Microfluidic, thang nồng độ, chuẩn bị tinh trùng, thụ tinh trong ống nghiệm, DFI.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

DNA tinh trùng liên quan mật thiết tới khả năng thụ tinh và sự phát triển của phôi. Một số nghiên cứu cho thấy đứt gãy DNA tinh trùng có liên quan đến chất lượng phôi, và phát triển thai sau này.<sup>1-3</sup> Trong kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn việc lựa chọn tinh trùng còn mang tính chủ quan, không nhận biết và loại bỏ được tinh trùng bị đứt gãy DNA dẫn đến

nguy cơ có thể ảnh hưởng đến kết quả thụ tinh trong ống nghiệm. Hai phương pháp chuẩn bị tinh trùng đang được sử dụng phổ biến ở các trung tâm hỗ trợ sinh sản tại Việt Nam là lọc rửa đơn thuần hoặc thang nồng độ. Kỹ thuật xử lý tinh trùng truyền thống như vậy cần trải qua một số bước ly tâm tinh trùng cùng với hạt silica dạng keo để loại bỏ các tinh trùng bất thường, tinh trùng bất động cũng như các mảnh vụn tế bào có trong mẫu tinh dịch ban đầu. Tuy nhiên, các bước ly tâm trong quy trình xử lý tinh trùng đã được chứng minh là tạo ra các gốc oxy tự do và gây ra tổn thương đứt gãy DNA tinh trùng.<sup>4</sup>

Hiện nay, chọn lọc tinh trùng bằng hệ thống

Tác giả liên hệ: Hồ Nguyệt Minh

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQGHN

Email: honguyetminh421@gmail.com

Ngày nhận: 18/03/2024

Ngày được chấp nhận: 01/04/2024

vi lỏng (Microfluidic) là kỹ thuật mới, phân lập tinh trùng dựa trên dòng chảy tầng, tạo độ dốc qua các kênh, và có giới hạn về kích thước màng lọc được thiết kế trong hệ thống. Tinh dịch thô được đưa vào đầu tiếp nhận mẫu và chỉ những tinh trùng bình thường về hình thái và khả năng di động tốt mới có thể bơi đến đầu ra là nơi tinh trùng được thu thập và sử dụng. Với hệ thống vi lỏng, việc xử lý tinh trùng không cần đến hóa chất lọc và thao tác ly tâm như các phương pháp truyền thống. Sử dụng hệ thống vi lỏng được chứng minh là có hiệu quả trong việc thu tinh trùng từ các mẫu tinh dịch để thực hiện các kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm, tăng cơ hội thu nhận được tinh trùng có bộ nhiễm sắc thể bình thường từ đó tăng cơ hội có phôi chỉnh bội. Tuy nhiên, các nghiên cứu về ứng dụng hệ thống vi lỏng trong thụ tinh trong ống nghiệm vẫn còn rất ít, cỡ mẫu nghiên cứu nhỏ nên chưa đủ sức thuyết phục. Cần có thêm các bằng chứng lâm sàng về chất lượng tinh trùng, chất lượng phôi cũng như tỷ lệ có thai khi sử dụng hệ thống vi lỏng để chọn lọc tinh trùng trong thụ tinh trong ống nghiệm ở các trường hợp vô sinh. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài “*Đánh giá hiệu quả của kỹ thuật microfluidic trong chuẩn bị tinh trùng ở các trường hợp làm thụ tinh trong ống nghiệm*” với câu hỏi nghiên cứu là: (1) Chuẩn bị tinh trùng bằng microfluidic có tốt hơn so với thang nồng độ không? (2) Sử dụng tinh trùng thu được sau microfluidic có cải thiện được kết quả của thụ tinh trong ống nghiệm không?

Mục tiêu của nghiên cứu: 1) So sánh chất lượng tinh trùng được chuẩn bị bằng microfluidic và thang nồng độ ở các trường hợp làm thụ tinh trong ống nghiệm thụ tinh trong ống nghiệm. 2) So sánh kết quả tạo phôi, tỷ lệ có thai giữa nhóm chuẩn bị tinh trùng bằng microfluidic và thang nồng độ.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Đối tượng

**Nghiên cứu 1: Nghiên cứu thử nghiệm so sánh chất lượng mẫu tinh trùng chuẩn bị bằng hai phương pháp**

*Tiêu chuẩn chọn*

Mẫu tinh dịch của các cặp vợ chồng làm thụ tinh trong ống nghiệm tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, đồng ý tham gia nghiên cứu.

*Tiêu chuẩn loại trừ:* Không nhận vào nghiên cứu các trường hợp sau:

- Các trường hợp xin tinh trùng.
- Các trường hợp tinh trùng lấy bằng PESA, MESA, TESE.
- Các trường hợp mẫu tinh dịch OAT nặng không đủ điều kiện để lọc rửa bằng phương pháp thang nồng độ.

**Nghiên cứu 2: Thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên, so sánh kết quả thụ tinh trong ống nghiệm giữa 2 nhóm**

*Tiêu chuẩn chọn:* là các cặp vợ chồng có tuổi vợ trong độ tuổi từ 20 đến 40 tuổi được chỉ định làm thụ tinh trong ống nghiệm tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, đồng ý tham gia nghiên cứu.

*Tiêu chuẩn loại trừ*

- Các trường hợp không đủ tiêu chuẩn tham gia nghiên cứu 1.
- Các trường hợp cho nhận noãn.
- Người vợ có tiền lượng thấp theo tiêu chuẩn Poseidon<sup>5</sup>:
  - + AMH < 1,2 ng/ml và/hoặc AFC < 5.
  - + AMH ≥ 1,2 ng/ml và/hoặc AFC ≥ 5 nhưng BN có tiền sử thu được ≤ 9 noãn của IVF lần trước.

### 2. Phương pháp

**Thiết kế nghiên cứu**

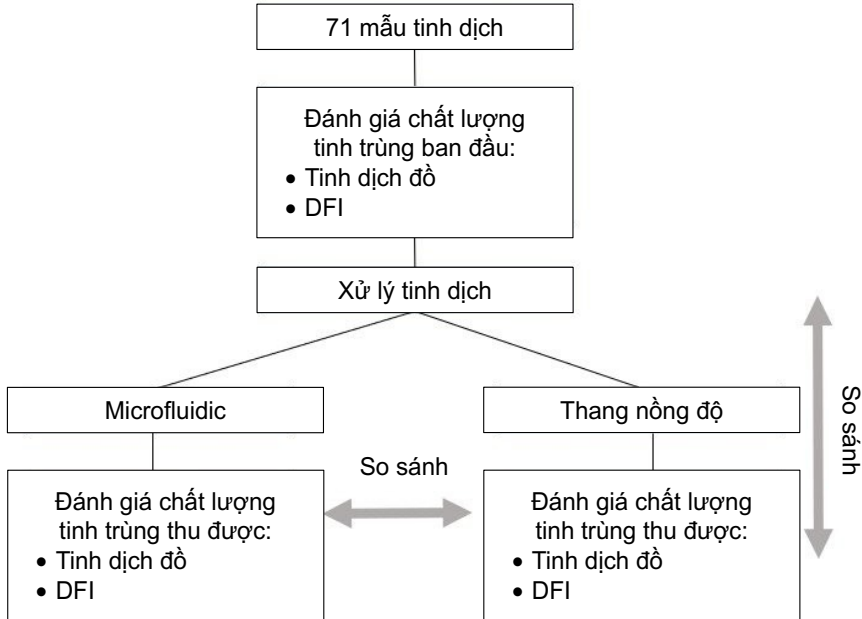
- *Nghiên cứu 1:* Nghiên cứu thử nghiệm so sánh nhằm đánh giá chất lượng tinh trùng được chuẩn bị bằng hai phương pháp microfluidic và thang nồng độ.

- *Nghiên cứu 2:* Nghiên cứu thử nghiệm lâm

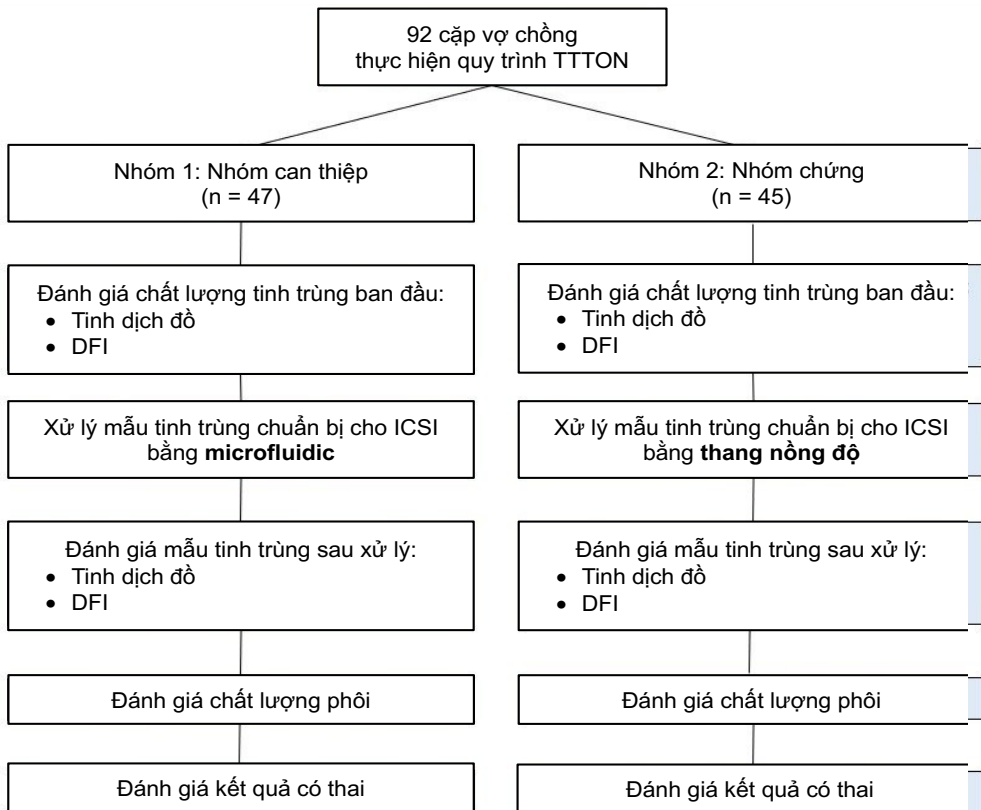
sàng ngẫu nhiên có nhóm chứng nhằm so sánh kết quả tạo phôi, tỷ lệ có thai giữa nhóm chuẩn

bị tình trạng bằng microfluidic và thang nồng độ.

**Sơ đồ nghiên cứu**



**Sơ đồ 1. Sơ đồ nghiên cứu 1: Nghiên cứu thử nghiệm so sánh**



**Sơ đồ 2. Sơ đồ nghiên cứu 2: Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có nhóm chứng**

**Quy trình nghiên cứu**

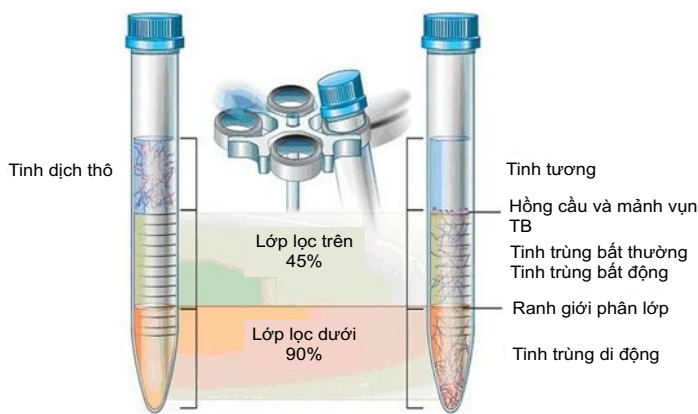
**Nghiên cứu 1: Nghiên cứu thử nghiệm so sánh**

- Mẫu tinh trùng của các cặp vợ chồng làm thụ tinh trong ống nghiệm được kiểm tra đánh giá các tiêu chí theo tiêu chuẩn WHO 2010 và đánh giá tỷ lệ phân mảnh DNA của tinh trùng.

- Sau đó, mẫu tinh dịch sẽ được lọc rửa bằng hai phương pháp là thang nồng độ và microfluidic.

+ Phương pháp thang nồng độ:

Tiến hành tạo thang nồng độ 1 ml 45%/1ml 90%. Phủ 1ml tinh dịch lên trên và quay ly tâm 1500 vòng quay/phút x 8 phút. Sau đó loại bỏ dịch nổi, để lại 0,2ml. Tiếp tục bổ sung 3ml Sperm Rinse, trộn đều và quay ly tâm 1500 vòng quay/phút x 5 phút. Loại bỏ dịch nổi, để lại 0,3 - 0,5ml môi trường chứa cận tinh trùng và trộn đều.

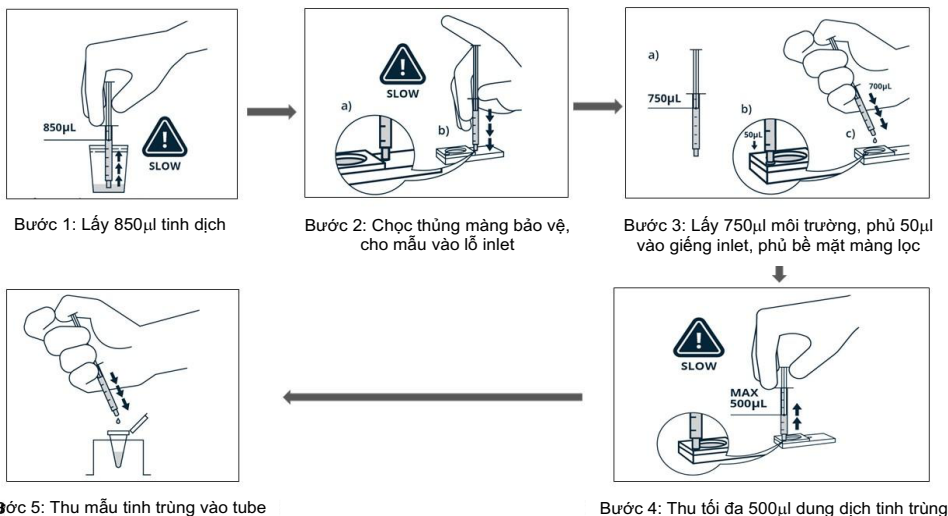


**Hình 1. Phương pháp lọc rửa thang nồng độ**

+ Phương pháp sử dụng hệ thống Microfluidic:

- Sử dụng kit lọc ZyMöt™ Multi (850µL).
- Thêm 850µL tinh dịch vào giếng inlet để bơm mẫu vào buồng lọc. Thêm 50µL dung dịch

rửa Sperm Rinse lấp đầy giếng outlet và tràn ra bề mặt của màng. Tiếp tục thêm 700µL phủ kín bề mặt của màng. Ủ thiết bị trong 30 phút. Thu lấy tối đa 500µL dung dịch tinh trùng ở giếng outlet.



**Sơ đồ 3. Thao tác chuẩn bị tinh trùng với chip microfluidic**

• Tinh trùng thu được sau lọc của hai phương pháp sẽ được đánh giá lại các tiêu chí theo tiêu chuẩn WHO 2020 và đánh giá tỷ lệ phân mảnh DNA của tinh trùng

• Cuối cùng so sánh sự khác biệt về chất lượng tinh trùng thu được từ 2 phương pháp chọn lọc tinh trùng.

- Đánh giá tỷ lệ đứt gãy DNA tinh trùng:

Bộ sinh phẩm PhacoSperm® DNA Fragmentation Kit được sử dụng trong kĩ thuật

đánh giá tỷ lệ phân mảnh DNA. Kỹ thuật này dựa trên nguyên tắc phát màu khác nhau của thuốc nhuộm huỳnh quang Acridine orange khi bám lên mạch đôi DNA (dsDNA) hay mạch đơn DNA (ssDNA). Các tín hiệu huỳnh quang được phân tích bằng hệ thống đếm tế bào dòng chảy flow cytometry DxFlex. Mức độ phân mảnh DNA tinh trùng được đánh giá thông qua chỉ số DFI (tỷ lệ đứt gãy DNA của tinh trùng).

$$DFI = \frac{\text{Tín hiệu huỳnh quang màu đỏ}}{\text{Tổng tín hiệu huỳnh quang (đỏ+xanh lá)}} (\%)$$

### **Nghiên cứu 2: Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có nhóm chứng**

- Phân nhóm nghiên cứu theo cách chọn mẫu ngẫu nhiên: các bệnh nhân nhận vào nghiên cứu được phân nhóm ngẫu nhiên vào hai nhóm bằng kỹ thuật bốc thăm.

+ Nhóm 1 (nhóm can thiệp): sử dụng kỹ thuật microfluidic để chuẩn bị tinh trùng

+ Nhóm 2 (nhóm chứng): sử dụng kỹ thuật thang nồng độ để chuẩn bị tinh trùng.

- Tất cả bệnh nhân của hai nhóm được điều trị TTTON theo các quy trình điều trị của bệnh viện:

+ Kích thích buồng trứng bằng phác đồ antagonist và chọc hút noãn 34 - 36h sau khi tiêm hCG.

+ Xử lý tinh trùng bằng phương pháp microfluidic cho nhóm 1 và phương pháp thang nồng độ cho nhóm 2.

+ Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI), theo dõi noãn sau ICSI và phôi: Đánh giá chất lượng phôi ngày 2, ngày 3 và ngày 5 theo đồng thuận Istanbul 2011. Đông phôi bằng kỹ thuật thủy tinh hóa.

+ Bệnh nhân được chuyển phôi ngày 3 hoặc ngày 4 hoặc ngày 5.

+ Đánh giá kết quả chuyển phôi: Xác định là có thai khi xét nghiệm nồng độ beta hCG huyết thanh sau chuyển phôi  $\geq 25$  mIU/ml (10

ngày sau chuyển phôi ngày 5 hoặc 12 ngày sau chuyển phôi ngày 3).

### **Biến số và chỉ số nghiên cứu**

- Tuổi người vợ, chồng: tính bằng năm.

- BMI: tính bằng cân nặng (kg)/chiều cao<sup>2</sup> (m).

- Thời gian vô sinh: tính bằng năm.

- Loại vô sinh: được phân thành các nhóm: nguyên phát; thứ phát.

- Mật độ tinh trùng trong mẫu tinh dịch trước lọc và sau lọc.

- Khả năng di động của tinh trùng trong mẫu tinh dịch trước lọc và sau lọc.

- Hình thái tinh trùng trong mẫu tinh dịch trước lọc và sau lọc.

- Tỷ lệ đứt gãy ADN của tinh trùng trong mẫu tinh dịch trước lọc và sau lọc.

- Tỷ lệ thu hồi tinh trùng di động tiến tới sau lọc bằng thang nồng độ và sau lọc bằng microfluidic.

- Tổng số noãn thu được.

- Số noãn trưởng thành, tỷ lệ noãn trưởng thành.

- Tỷ lệ thụ tinh.

- Tỷ lệ tạo phôi.

- Tỷ lệ phôi tốt + khá.

- Tỷ lệ có thai.

### **Xử lý số liệu**

Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần

mềm SPSS 22.0. Dùng test Khi bình phương so sánh 2 tỷ lệ và Fisher exact test khi giá trị kỳ vọng dưới 5. Tương quan Pearson để xác định mối tương quan tuyến tính với  $r > 0$  là tương quan thuận,  $r < 0$  là tương quan nghịch.

### 3. Đạo đức nghiên cứu

Thông tin bệnh nhân được mã hoá, giữ bí mật và chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu. Nghiên cứu chỉ được tiến hành khi có sự đồng ý của bệnh nhân. Nghiên cứu thuộc loại thử

nghiệm so sánh và được sự cho phép của lãnh đạo Trung tâm Hỗ trợ sinh sản và Công nghệ mô ghép, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội và đã được chấp thuận bởi Hội đồng đạo đức Trường đại học Y Hà Nội (IBR-VN01.001/ IRB00003121/ FWA 00004148).

## III. KẾT QUẢ

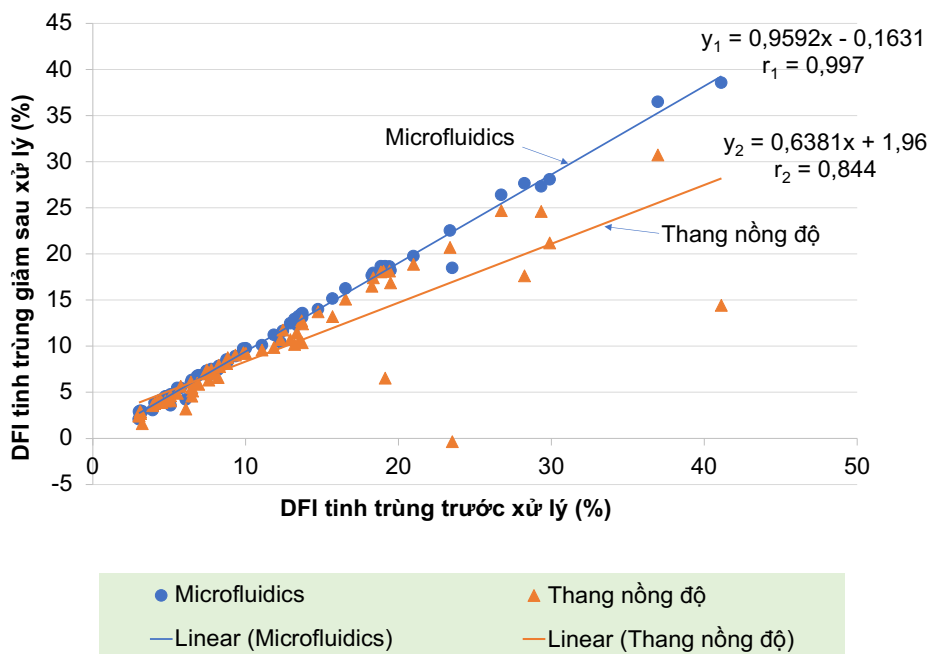
### 1. Đặc điểm mẫu tinh dịch trước và sau xử lý bằng hai phương pháp

**Bảng 1. Đặc điểm mẫu tinh dịch trước và sau xử lý bằng hai phương pháp (n = 71)**

Chỉ số	Trước xử lý (1)	Thang nồng độ (2)	Microfluidic (3)	p
Thể tích (ml)	3,6 ± 1,0	-	-	-
Mật độ (x10 <sup>6</sup> /mL)	84,4 ± 50,1	30,6 ± 26,4	30,9 ± 25,6	p <sub>1-2</sub> , p <sub>1-3</sub> < 0,0001; p <sub>2-3</sub> = 0,945
Tỷ lệ sống (%)	82,4 ± 9,1	96,2 ± 3,7	97,9 ± 2,0	p <sub>1-2</sub> , p <sub>1-3</sub> < 0,0001; p <sub>2-3</sub> = 0,0009
Di động tiến tới (%)	45,0 ± 19,3	87,9 ± 7,1	86,3 ± 8,9	p <sub>1-2</sub> , p <sub>1-3</sub> < 0,0001; p <sub>2-3</sub> = 0,238
Hình thái bình thường (%)	3,2 ± 1,4	7,4 ± 3,2	7,4 ± 3,5	p <sub>1-2</sub> , p <sub>1-3</sub> < 0,0001; p <sub>2-3</sub> ≈ 1
Tỷ lệ phân mảnh DNA (%)	11,76 ± 8,35	2,30 ± 4,53	0,64 ± 0,73	p <sub>1-2</sub> , p <sub>1-3</sub> < 0,0001; p <sub>2-3</sub> = 0,0028
Tỷ lệ thu hồi tinh trùng(%)	-	19,1 ± 14,0	22,3 ± 15,4	p <sub>2-3</sub> = 0,197
Tỷ lệ thu hồi tinh trùng di động(%)	-	42,2 ± 46,4	47,5 ± 46,6	p <sub>2-3</sub> = 0,498

Tinh trùng thu được sau chuẩn bị bằng hai phương pháp thang nồng độ và microfluidic đều có sự cải thiện rõ rệt so với mẫu trước xử lý cả về mật độ, tỷ lệ sống, tỷ lệ di động tiến tới, hình thái bình thường và phân mảnh DNA, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,0001$ ). So sánh chất lượng mẫu sau xử lý giữa hai phương pháp nhận thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa về mật độ, tỷ lệ di động tiến tới, hình

thái bình thường và tỷ lệ thu hồi tinh trùng. Tuy nhiên, có sự khác biệt về tỷ lệ sống và đặc biệt là tỷ lệ phân mảnh DNA tinh trùng giữa mẫu thu được từ hai phương pháp. Cụ thể, tỷ lệ sống của mẫu tinh trùng xử lý bằng microfluidic cao hơn (97,9 ± 2,0 so với 96,2 ± 3,7, với  $p = 0,0009$ ) và DFI trung bình thấp hơn đáng kể so với mẫu xử lý bằng phương pháp thang nồng độ (0,64 ± 0,73 so với 2,30 ± 4,53, với  $p = 0,0028$ ).



**Biểu đồ 1. Mối tương quan DFI tinh trùng trước-sau xử lý bằng hai phương pháp**

Phân tích cụ thể về hiệu quả cải thiện tỷ lệ phân mảnh DNA tinh trùng, nhận thấy dù ở khoảng giá trị DFI nào, hai phương pháp này đều làm giảm DFI có ý nghĩa so với mẫu trước

xử lý. Tuy nhiên, mức độ giảm DFI có sự khác biệt, cụ thể khi DFI mẫu đầu vào càng cao, DFI sau xử lý bằng microfluidic càng thấp hơn đáng kể so với phương pháp thang nồng độ.

**2. Đặc điểm chung của hai nhóm nghiên cứu**

**Bảng 2. Đặc điểm chung của hai nhóm nghiên cứu**

Đặc điểm	Nhóm can thiệp (n = 47)	Nhóm chứng (n = 45)	p
Tuổi vợ	29,72 ± 3,33	32,07 ± 4,04	0,003
Tuổi chồng	32,34 ± 3,21	35,60 ± 4,29	< 0,0001
BMI vợ	22,02 ± 2,99	22,14 ± 2,73	0,841
BMI chồng	23,75 ± 3,46	23,06 ± 2,31	0,261
Thời gian vô sinh	3,38 ± 2,57	2,86 ± 2,48	0,319
Loại vô sinh	Nguyên phát	14 (31,1%)	0,123
	Thứ phát	25 (53,2%)	
Có tiền sử thất bại IVF	10 (21,3%)	4 (8,9%)	0,098

Trong thời gian từ tháng 2/2023 đến tháng 12/2023, tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản và Công

nghệ mô ghép Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, có 92 cặp vợ chồng đáp ứng đủ tiêu chuẩn vào

ngiên cứu, được phân ngẫu nhiên thành 2 nhóm: nhóm can thiệp ( $n = 47$ ) và nhóm chứng ( $n = 45$ ). Thời gian vô sinh trung bình của đối tượng nghiên cứu là  $3,38 \pm 2,57$  (năm) với nhóm can thiệp và  $2,86 \pm 2,48$  (năm) với nhóm chứng. Vô sinh thứ phát chiếm tỷ lệ cao hơn trong cả hai nhóm (53,2% và 68,9%). Trong đó, có khoảng 21,3% cặp vợ chồng trong nhóm can thiệp và 8,9% trong nhóm chứng từng có tiền sử thất bại IVF. Nhìn chung, không có sự

khác biệt có ý nghĩa giữa 2 nhóm nghiên cứu về các đặc điểm BMI, thời gian vô sinh, loại vô sinh, tiền sử thất bại IVF. Tuy nhiên, độ tuổi trung bình của các cặp vợ chồng trong nhóm chứng cao hơn nhóm can thiệp ( $32,07 \pm 4,04$  so với  $29,72 \pm 3,33$ ,  $p = 0,003$  và  $35,60 \pm 4,29$  so với  $32,34 \pm 3,21$ ,  $p < 0,0001$ ).

### 3. Đặc điểm mẫu tinh dịch của hai nhóm nghiên cứu

**Bảng 3. Đặc điểm mẫu tinh dịch của hai nhóm nghiên cứu**

Chỉ số	Nhóm can thiệp ( $n = 47$ )		Nhóm chứng ( $n = 45$ )		p
	Trước xử lý (1)	Sau xử lý (2)	Trước xử lý (3)	Sau xử lý (4)	
Thể tích ban đầu(ml)	$3,1 \pm 1,1$	-	$3,4 \pm 1,1$	-	$p_{1-3} = 0,327$
Mật độ ( $\times 10^6$ /mL)	$74,6 \pm 43,5$	$29,6 \pm 31,7$	$104,9 \pm 56,3$	$34,9 \pm 26,4$	$p_{1-2}, p_{3-4} < 0,0001$ $p_{1-3} = 0,005$ , $p_{2-4} = 0,387$
Tỷ lệ sống (%)	$81,5 \pm 8,8$	$97,5 \pm 2,3$	$82,9 \pm 9,6$	$96,4 \pm 4,0$	$p_{1-2}, p_{3-4} < 0,0001$ $p_{1-3} = 0,468$ ; $p_{2-4} = 0,108$
Di động tiến tới (%)	$38,4 \pm 17,2$	$89,3 \pm 5,4$	$48,5 \pm 19,8$	$84,1 \pm 10,4$	$p_{1-2}, p_{3-4} < 0,0001$ $p_{1-3} = 0,011$ ; $p_{2-4} = 0,0032$
Hình thái bình thường (%)	$3,1 \pm 1,4$	$8,3 \pm 3,6$	$3,3 \pm 1,3$	$7,2 \pm 3,0$	$p_{1-2} < 0,0001$ ; $p_{3-4} < 0,0001$ $p_{1-3} = 0,480$ ; $p_{2-4} = 0,116$
Tỷ lệ phân mảnh DNA (%)	$12,13 \pm 8,29$	$0,44 \pm 0,36$	$11,53 \pm 8,3$	$2,55 \pm 5,20$	$p_{1-2}, p_{3-4} < 0,0001$ $p_{1-3} = 0,730$ ; $p_{2-4} = 0,0067$
Tỷ lệ thu hồi tinh trùng (%)	-	$23,9 \pm 21,2$	-	$17,6 \pm 10,4$	$p_{2-4} = 0,076$
Tỷ lệ thu hồi tinh trùng di động (%)	-	$57,9 \pm 59,0$	-	$35,1 \pm 25,0$	$p_{2-4} = 0,019$



Đặc điểm mẫu tinh dịch trước xử lý của hai nhóm nghiên cứu tương đồng về thể tích, tỷ lệ sống, hình thái và tỷ lệ phân mảnh DNA tinh trùng, tuy nhiên, mật độ và tỷ lệ di động tiến tới đầu vào của nhóm chứng cao hơn so với nhóm can thiệp ( $104,9 \pm 56,3$  so với  $74,6 \pm 43,5$  ( $\times 10^6$  /mL),  $p = 0,05$ ) và ( $48,5 \pm 19,8$  so với  $38,4 \pm 17,2$  (%),  $p = 0,011$ ). Về kết quả mẫu tinh trùng sau xử lý, không có sự khác biệt có ý nghĩa về mật độ, tỷ lệ sống, hình thái bình thường và tỷ lệ thu hồi tinh trùng giữa hai nhóm nghiên cứu.

Tuy nhiên, tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới và tỷ lệ thu hồi tinh trùng di động của nhóm can thiệp cao hơn nhóm chứng ( $89,3 \pm 5,4$  so với  $84,1 \pm 10,4$  (%) với  $p = 0,0032$ ) và ( $57,9 \pm 59,0$  so với  $35,1 \pm 25,0$  (%),  $p = 0,019$ ). Đặc biệt, tỷ lệ phân mảnh DNA sau xử lý của nhóm can thiệp thấp hơn rõ rệt so với nhóm chứng ( $0,44 \pm 0,36$  so với  $2,55 \pm 5,20$  (%)) với  $p = 0,0067$ , sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê.

#### 4. Kết quả của chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm

**Bảng 4: Kết quả của chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm**

Chỉ số	Nhóm can thiệp (n = 47)	Nhóm chứng (n = 45)	p
Tổng số noãn thu được	$19,2 \pm 8,9$	$15,3 \pm 6,8$	0,020
Số noãn M2	$13,3 \pm 7,2$	$10,4 \pm 5,0$	0,030
Tỷ lệ noãn trưởng thành (%)	$69,2 \pm 20,6$	$67,9 \pm 16,6$	0,741
Tỷ lệ thụ tinh (%)	$92,6 \pm 10,2$	$94,0 \pm 9,8$	0,495
Tỷ lệ tạo phôi	$98,5 \pm 3,4$	$98,6 \pm 4,0$	0,903
Tỷ lệ phôi tốt + khá	$68,9 \pm 25,0$	$75,1 \pm 23,0$	0,220
Số phôi chuyển (	$1,84 \pm 0,48$	$1,50 \pm 0,56$	0,004
Tỷ lệ có thai	32 (72,7%)	31 (81,6%)	0,343

So sánh về kết quả tạo phôi, nhận thấy, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ noãn trưởng thành (MII), tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ tạo phôi và tỷ lệ tạo phôi tốt + khá giữa hai nhóm nghiên cứu. Trong đó, tỷ lệ thụ tinh trung bình tương đối cao ở cả hai nhóm:  $92,6 \pm 10,2\%$  với nhóm can thiệp và  $94,0 \pm 9,8\%$  với nhóm chứng. Tỷ lệ tạo phôi của hai nhóm lần lượt là  $98,5 \pm 3,4$  và  $98,6 \pm 4,0$ , trong đó, tỷ lệ phôi tốt và khá đều chiếm phần lớn tổng số phôi ( $68,9 \pm 25,0\%$  và  $75,1 \pm 23,0\%$ ). Đánh giá kết quả chuyển phôi lần thứ nhất, số phôi chuyển của hai nhóm khá tương đồng nhau, trung bình là  $1,84 \pm 0,48$  phôi với nhóm can thiệp và  $1,50 \pm 0,56$  phôi với nhóm chứng. Tỷ lệ có thai tương

đối cao và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm nghiên cứu (72,7% và 81,6% với  $p = 0,343$ ).

#### IV. BÀN LUẬN

Khả năng thu hồi tinh trùng là một thông số quan trọng đánh giá hiệu quả của quá trình lọc rửa. Tuy nhiên, kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm thường không yêu cầu cao về số lượng tinh trùng. Mặt khác, chúng ta quan tâm nhiều hơn đến các yếu tố về chất lượng tinh trùng như: tỷ lệ sống, khả năng di động, hình thái và tỷ lệ đứt gãy DNA. Đây là những yếu tố liên quan mật thiết đến khả năng hoạt hoá noãn của tinh trùng, kết quả thụ tinh, tạo phôi, chất lượng

phôi và tỷ lệ có thai. Trong nghiên cứu của chúng tôi, lọc rửa bằng hệ thống microfluidic cho kết quả không khác biệt về tỷ lệ hình thái bình thường và tỷ lệ di động tiến tới so với lọc rửa bằng phương pháp thang nồng độ. Tuy nhiên, mẫu tinh dịch được xử lý bằng hệ thống microfluidic có tỷ lệ sống cao hơn so với phương pháp thang nồng độ ( $97,9 \pm 2,0$  so với  $96,2 \pm 3,7$ ), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Đặc biệt, chúng tôi ghi nhận tỷ lệ đứt gãy DNA tinh trùng chọn lọc bằng hệ thống microfluidic thấp hơn đáng kể so với phương pháp lọc rửa bằng thang nồng độ ( $0,64 \pm 0,73$  so với  $2,30 \pm 4,53$ ;  $p = 0,0028$ ). Nghiên cứu của D.P.Makwana và cộng sự (2021), M.Bastuba và cộng sự (2020) cũng cho kết quả tương tự khi so sánh DFI của tinh trùng chọn lọc bằng hai phương pháp này.<sup>6,7</sup> Và đặc biệt, nghiên cứu của chúng tôi nhận thấy rằng, so với thang nồng độ kỹ thuật microfluidic giúp giảm đứt gãy tinh trùng rõ rệt ở những mẫu tinh dịch có chỉ số DFI cao. Cụ thể khi DFI mẫu đầu vào càng cao, DFI sau xử lý bằng microfluidic càng thấp hơn đáng kể so với phương pháp thang nồng độ.

Điều này có thể giải thích do sự khác biệt về nguyên lý của hai phương pháp. Phương pháp thang nồng độ chọn lọc tinh trùng dựa trên tỷ trọng: những tinh trùng trưởng thành, di động tốt có tỷ trọng cao hơn do sự cô đặc DNA sẽ được tách khỏi lớp lọc và lắng xuống đáy ống nghiệm dưới tác động của lực ly tâm. Nhược điểm chính của phương pháp này là sử dụng môi trường thang nồng độ gây độc với tinh trùng, có thể sinh nội độc tố nếu không được loại bỏ sạch và sử dụng lực ly tâm tốc độ cao có thể gây tổn thương màng tinh trùng, tăng nồng độ ROS và phân mảnh DNA. Trong khi đó, hệ thống microfluidic phân tách tinh trùng dựa vào khả năng di động: những tinh trùng di động nhanh có thể bơi qua các dòng phân lớp, do đó thu được quần thể tinh trùng có khả năng

di động tốt hơn và tỷ lệ sống cao hơn. Đặc biệt, tinh trùng không chịu ảnh hưởng của lực ly tâm, được xử lý trong môi trường rửa (Sperm rinse) là môi trường không độc với tinh trùng, nên tỷ lệ đứt gãy DNA rất thấp ( $0,67 \pm 0,53$ ) và thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với phương pháp lọc rửa thang nồng độ.

Từ kết quả xử lý tinh trùng như trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên, so sánh kết quả thụ tinh trong ống nghiệm giữa nhóm can thiệp sử dụng mẫu tinh trùng xử lý bằng hệ thống microfluidic và nhóm chứng sử dụng mẫu tinh trùng xử lý bằng phương pháp thang nồng độ. Về kết quả tạo phôi, không có sự khác biệt về tỷ lệ noãn trưởng thành (MII), tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ tạo phôi và tỷ lệ tạo phôi tốt + khá giữa hai nhóm nghiên cứu. Kết quả chuyển phôi đầu tiên của chu kỳ chọc trứng thu được tỷ lệ có thai tương đối cao lần lượt là 72,7% với nhóm can thiệp và 81,6% với nhóm chứng. Tuy nhiên, kết quả này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p = 0,343$ ). Như vậy, nhìn chung, không có sự khác biệt về kết quả thụ tinh trong ống nghiệm giữa hai nhóm nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi tương tự với kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác.<sup>8,9</sup> Xue L.T và cộng sự báo cáo không tìm thấy mối liên quan giữa phân mảnh DNA tinh trùng với tỉ lệ phôi phân chia giai đoạn ngày 2 ngày 3, tỉ lệ hình thành phôi chất lượng tốt. Chen và cộng sự nhận thấy phân mảnh DNA tinh trùng không ảnh hưởng đáng kể đến tỉ lệ thụ tinh, thai lâm sàng, sảy thai hoặc thai tiến triển, phân mảnh DNA tinh trùng không làm tăng nguy cơ thai chết lưu hoặc tử vong sơ sinh.

Giải thích cho kết quả này có thể là do trong kỹ thuật IVF/ICSI, chất lượng tinh trùng phụ thuộc rất lớn vào bước lựa chọn tinh trùng để tiêm vào bào tương noãn. Việc lựa chọn này phụ thuộc đánh giá chủ quan của người tiến

hành ICSI, dựa trên khả năng di động và hình thái của tinh trùng. Do đó, kể cả mẫu sau xử lý có tỷ lệ đứt gãy DNA cao hay thấp, khả năng chọn được một vài tinh trùng toàn vẹn DNA để ICSI có thể vẫn tương đương nhau. Ngoài ra, bản thân noãn có khả năng sửa chữa những sai sót về vật liệu di truyền ngay sau khi hai tiền nhân kết hợp nhau tạo thành hợp tử, do đó, đứt gãy DNA tinh trùng vẫn có cơ hội được sửa chữa sau quá trình thụ tinh, không gây ảnh hưởng đến kết quả tạo phôi và từ đó không gây ảnh hưởng có ý nghĩa đến kết quả của chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm.

## V. KẾT LUẬN

So với thang nồng độ, chất lượng tinh trùng thu được sau xử lý bằng phương pháp microfluidic có sự cải thiện về tỷ lệ sống (97,9% so với 97,9%;  $p = 0,0009$ ), tỷ lệ DFI thấp hơn (0,64 so với 2,3;  $p = 0,0028$ ). So với thang nồng độ, không có sự khác biệt về tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ tạo phôi, tỷ lệ phôi tốt + khá và tỷ lệ có thai của lần chuyển phôi đầu tiên trong chu kỳ chọc trứng ở nhóm chuẩn bị tinh trùng bằng microfluidic.

## Lời cảm ơn

[Đỗ Thùy Hương] được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số [VINIF.2023.TS.043].

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sedó CA, Bilinski M, Lorenzi D, et al. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects. *JBRA Assist Reprod.* 2017;21(4):343-350. doi:10.5935/1518-0557.20170061
2. Avendaño C, Franchi A, Duran H, et al. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril.* 2010;94(2):549-557. doi:10.1016/j.

fertnstert.2009.02.050

3. Zheng WW, Song G, Wang QL, et al. Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following in vitro fertilization. *Asian J Androl.* 2018;20(1):75-79. doi:10.4103/aja.aja\_19\_17

4. Waseem Asghar, Vanessa Velasco, James L Kingsley, et al. Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species. *Adv Healthc Mater.* 2014;3(10):1671-9. doi: 10.1002/adhm.201400058

5. Poseidon Group (Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number), Alviggi C, Andersen CY, et al. A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept. *Fertil Steril.* 2016;105(6):1452-1453. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.02.005

6. Makwana DP, Makwana S, Sen T. P-069 microfluidic sperm sorting vs density gradient to yield sperm with reduced DFI for patients undergoing IVF-ICSI. *Hum Reprod.* 2021;36(Supplement\_1):deab130.068. doi: 10.1093/humrep/deab130.068

7. Bastuba M, Cohen M, Bastuba A, et al. Microfluidicspermseparationdevice dramatically lowers DFI. *Fertil Steril.* 2020;113(4):e44. doi:10.1016/j.fertnstert.2020.02.096

8. Chen L, Fang J, Jiang W, et al. Effects of the sperm DNA fragmentation index on the clinical and neonatal outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles. *J Ovarian Res.* 2020;13(1):52. doi:10.1186/s13048-020-00658-z

9. Lin-Tao Xue, Rui-Xue Wang. Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcomes for Chinese couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *J Int Med Res.* 2016;44(6):1283-1291. doi:10.1177/0300060516664240.

## Summary

### COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS BETWEEN MICROFLUIDICS AND DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION TECHNIQUES IN SPERM PREPARATION FOR IVF

We conducted a comparative experimental study on 71 semen samples of couples undergoing IVF to evaluate sperm quality using 2 methods: microfluidic and density gradient centrifugation. This was a randomized controlled clinical trial study to compare embryogenesis results, and pregnancy rate between microfluidic and density gradient centrifugation techniques groups. 92 couples scheduled for IVF in the study were randomly assigned to two groups. In group 1 (intervention group), sperm was prepared by using microfluidic technique, and in group 2 (control group), sperm was prepared by using a density gradient technique. The results showed that, sperm quality obtained by both techniques is equivalent in concentration, progressive motile, recovery, and progressive sperm recovery rate. However, there was a higher vitality (97.9% vs 97.9%;  $p = 0.0009$ ) and a lower DFI rate (0.64 vs 2.3;  $p = 0.0028$ ) in sperm prepared by the microfluidic technique. (Based on the aforementioned result, microfluidic reduced sperm DFI is significantly better than the density gradient centrifugation method. However, there was no difference in fertilization, embryogenesis, good embryo as well as pregnancy rate between 2 groups.

**Keywords:** Microfluidic, density gradient centrifugation, sperm preparation, in vitro fertilization, DFI.