

ĐÁNH GIÁ HÀM LƯỢNG ROS (REACTIVE OXYGEN SPECIES) TRONG TINH DỊCH VÀ DỊCH HUYỀN PHÙ CÓ TINH TRÙNG SAU LỌC RỬA Ở BỆNH NHÂN HIẾM MUỘN

Huỳnh Thị Hồng Vinh⁽¹⁾, Lê Hoàng Anh⁽²⁾, Hồ Mạnh Tường⁽²⁾, Phạm Văn Phúc⁽¹⁾, Phan Kim Ngọc⁽¹⁾, Nguyễn Tường Anh⁽¹⁾.

(1) Phòng thí nghiệm tế bào gốc, Đại học Tự Nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM.

(2) Trung tâm Nghiên cứu Di truyền & Sức khỏe Sinh sản (CGRH)- Khoa Y ĐHQG- TP.HCM

TÓM TẮT

Mục tiêu: Thiết lập quy trình đo hàm lượng ROS trong tinh dịch và dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa ở bệnh nhân hiếm muộn và khảo sát mối quan hệ giữa hàm lượng ROS với các thông số tinh dịch đồ là mật độ và tỷ lệ di động tinh trùng.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Đo và đánh giá hàm lượng ROS trong tinh dịch và dịch huyền phù có tinh trùng của 112 bệnh nhân điều trị hiếm muộn bằng phương pháp ICSI (tiêm tinh trùng vào bào tương noãn) tại Đơn vị Hỗ trợ sinh sản IVFAS, Bệnh viện An Sinh-TP.HCM bằng phương pháp đo huỳnh quang sử dụng đầu dò là luminol. 70 mẫu bệnh nhân có các chỉ số tinh dịch bình thường-NS (mật độ $\geq 15 \times 10^6$ tinh trùng/ml, di động $\geq 40\%$) và 52 mẫu từ bệnh nhân có chỉ số tinh dịch bất thường-AS.

Kết quả: Hàm lượng ROS của mẫu dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa cao hơn hàm lượng ROS của mẫu tinh dịch ở cả hai nhóm bệnh nhân có chỉ số tinh dịch bình thường và bất thường. Hàm lượng ROS thấp nhất ở mẫu tinh dịch của nhóm bệnh nhân có chỉ số tinh dịch bình thường [0,08 (0,023, 0,48), $P < 0,05$]. Hàm lượng ROS cao nhất ở mẫu dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa của nhóm bệnh nhân có chỉ số tinh dịch bất thường [6,69 (0,15, 24), $p < 0,05$]. Hàm lượng ROS có mối quan hệ tương quan nghịch với mật độ tinh trùng ($R = -0,123^{**}$, $P < 0,01$) và độ di động tinh trùng ($R = -0,166^{**}$, $P < 0,01$). Hàm lượng ROS mẫu dịch huyền phù có tinh

trùng sau lọc rửa có mối quan hệ tương quan thuận với hàm lượng ROS của mẫu tinh dịch ($R = 0,550^{**}$, $P < 0,01$).

Kết luận: Lần đầu tiên ở Việt nam, chúng tôi kiểm định thành công qui trình đo hàm lượng ROS ở mẫu tinh dịch. Nồng độ ROS có môi tương quan nghịch với các chỉ số cơ bản của tinh dịch đồ. Đây là một phương pháp đơn giản, rẻ tiền, dễ tiến hành, là công cụ hữu dụng để chẩn đoán và theo dõi điều trị vô sinh nam.

Từ khóa: ROS, chemiluminescence assay, neat semen, washed semen.

ABSTRACT

Objective: To establish the procedure of ROS measurement in washed and neat semen of infertile male and to study the relationship between ROS levels with semen parameters (sperm motility and concentration).

Method: Measurement and evaluation of ROS levels in semen and washed semen of 112 infertile patients treated by ICSI method (Intracytoplasmic Sperm Injection) in IVFAS, An Sinh Hospital-HCMC by luminol-dependent chemiluminescence. 70 samples of patients have normal semen parameters-NS (concentration $\geq 15 \times 10^6$ sperm/ml, motility $\geq 40\%$) while the rest have abnormal semen analysis-AS.

Result: The ROS production in neat semen was lower than washed semen in both groups NS and AS. The lower level of ROS was observed in NS group [0,08 (0,023, 0,48), $P < 0,05$], whereas

infertile men with AS group had the highest ROS level [6,69 (0,15, 24), $p < 0,05$]. A strong negative correlation between ROS levels and concentration ($R = -0,123^{**}$, $P < 0,01$), motility ($R = -0,166^{**}$, $P < 0,01$) was noticed. However, there was a strong positive correlation between log ROS in neat semen and in washed semen ($R = 0,550^{**}$, $P < 0,01$).

Conclusion: It was the first time in Viet Nam, we have succeeded in establishing the procedure of ROS measurement in semen. ROS levels have a strong negative correlation with semen parameters (sperm concentration and motility). Measurement of ROS in neat semen is an easy, simple, inexpensive, good diagnostic and prognostic value in male infertility assessment.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, vấn đề vô sinh nam đang trở thành mối quan tâm lớn của ngành y tế nói riêng và của nhân loại nói chung. Theo thống kê của Bộ Y tế năm 2011, Việt Nam có khoảng 8% dân số ở độ tuổi sinh đẻ bị hiếm muộn. Trong đó, tỉ lệ vô sinh nam giới hiện ngang bằng tỉ lệ nữ, chiếm khoảng 40% [1]

Theo báo cáo tổng quan tại hội thảo quốc tế "Stress oxy hóa và khả năng sinh sản người" tổ chức tại Việt nam năm 2012, số lượng tinh trùng của nam giới trên thế giới đã giảm còn phân nửa so với 50 năm trước; đồng thời, số liệu từ các báo cáo trong nước cũng cho thấy tỉ lệ bất thường tinh dịch đồ cao ở những cặp vợ chồng hiếm muộn [2].

Nhiều nguyên nhân dẫn đến việc vô sinh nam giới như bất thường tinh dịch, giãn tĩnh mạch tinh hoàn, tinh trùng dị dạng, di động kém, không có tinh trùng do tắc nghẽn, chấn thương, dị tật bẩm sinh,... Một nguyên nhân khác mà trên thế giới đã và đang tìm hiểu đó là sự tác động của ROS (Reactive Oxygen Species-gốc oxy hóa tự do hoạt động có nguồn gốc từ oxy).

Trong quá trình xuất tinh ở nam giới, ROS được sinh ra từ tinh trùng chưa trưởng thành và bạch cầu. Trong sinh lý bình thường, với một lượng nhỏ ROS cần thiết cho phản ứng hoạt hóa thể đỉnh và sự dung hợp của tinh trùng và trứng. Nhưng khi mất đi sự cân bằng giữa các gốc oxy hóa tự do và các chất kháng oxy hóa, gây ra hiện tượng sản xuất quá mức ROS gọi là stress oxy hóa (OS-oxymative stress), ROS thực sự gây độc cho tinh trùng dẫn tới sự peroxide chất béo, tạo sự phân mảnh ADN, giảm hoạt động, chức năng tinh trùng và dẫn tới vô sinh (Alvarez và cs, 1987, Huges và cs, 1996, Aitken và De luliis, 2010, Aitken và cs, 2010) [3, 4, 5]

Nhiều phương pháp đo hàm lượng ROS đã được giới thiệu (Sharma và Agarwal, 1996; Oschendorf, 1999) [6, 7]. Việc đo trực tiếp hàm lượng ROS rất khó thực hiện vì các gốc oxy hóa tự do không tồn tại ở trạng thái ổn định và thường sinh ra trong một thời gian ngắn. Các gốc tự do này phải được phát hiện trực tiếp bằng quang phổ cảm ứng điện từ (Electron paramagnetic resonance spectroscopy). Tuy nhiên, để phát hiện được các gốc tồn tại trong một thời gian ngắn thì thử nghiệm phải được thực hiện ở nhiệt độ rất thấp, rất khó thực hiện (Oschendorf, 1999). Một phương pháp đo gián tiếp hàm lượng ROS được sử dụng phổ biến đó là phương pháp đo huỳnh quang, sử dụng đầu dò luminol hay lucigen. Luminol đo được mức độ oxy hóa cả nội bào và ngoại bào, trong khi đó lucigen chỉ đo được ở mức độ ngoại bào (Aitken và Buckingham, 1992) [8]. Phương pháp này đo được toàn bộ hàm lượng ROS trong điều kiện sinh lý học và dễ sử dụng.

Năm 2007, Moein và cs., so sánh hàm lượng ROS ở tinh dịch của người đàn ông sinh sản bình thường và người đàn ông vô sinh. Kết quả, hàm lượng ROS ở người đàn ông sinh sản bình thường là $180,05 \times 10^4$ RLU/phút/ 20×10^6

trùng, các bệnh nhân vô sinh thì hàm lượng ROS trung bình là $1852,04 \times 10^4$ RLU/phút/ 20×10^6 tinh trùng. Như vậy, hàm lượng ROS ở bệnh nhân vô sinh gấp gần 10 lần so với người bình thường [9]. Kết quả này tương tự với tác giả Fingerova và cộng sự đã tìm ra vào năm 2009.

Tất cả các nghiên cứu trên chỉ dừng lại đo hàm lượng ở mẫu tinh dịch. Helena Fingerova và cs., 2009 và Venkatesh và cs., 2010 đã đo hàm lượng ROS ở mẫu tinh dịch và dịch huyền phù có tinh trùng qua lọc rửa. Kết quả, hàm lượng ROS ở mẫu tinh dịch thấp hơn so với mẫu dịch huyền phù có tinh trùng đã lọc rửa, hàm lượng ROS thấp nhất ở các mẫu có mật độ tinh trùng bình thường và hàm lượng ROS cao nhất ở các mẫu tinh trùng bất thường và có sự hiện diện của bạch cầu [10, 11]

Ở Việt Nam cho đến nay vẫn chưa có một nghiên cứu nào về đo hàm lượng ROS và xây dựng quy trình đo ROS trong tinh dịch. Vì vậy, đề tài thực hiện nhằm xây dựng quy trình đo hàm lượng ROS trong tinh dịch và dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa ở bệnh nhân hiếm muộn và khảo sát mối tương quan giữa hàm lượng ROS với chỉ số tinh dịch đồ.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đây là một nghiên cứu xây dựng qui trình và so sánh. Sau khi xây dựng thành công qui trình đo ROS, chúng tôi tiến hành định lượng ROS trong tinh dịch và huyền phù tinh trùng sau lọc rửa ở các mẫu tinh trùng có tinh dịch đồ bình thường và bất thường.

Mẫu có các chỉ số tinh dịch bình thường – NS: mật độ $\geq 15 \times 10^6$ tinh trùng/ml, di động $\geq 40\%$) và mẫu từ bệnh nhân có chỉ số tinh dịch bất thường – AS: dưới các chỉ số của nhóm bình thường. Mẫu được thu nhận từ các trường hợp thực hiện hỗ trợ sinh sản từ tháng 01/2012 đến tháng 12/2012.

Các mẫu phải thỏa tiêu chuẩn nhận như trên và không có các tiêu chuẩn loại trừ (tinh dịch có độ nhớt cao, tổng tinh trùng trong mẫu $< 2 \times 10^6$ tinh trùng/ml, hàm lượng bạch cầu $< 10^6$ /ml, mẫu tinh trùng trữ, mẫu tinh trùng thu nhận từ phẫu thuật).

CÁC KỸ THUẬT SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

Thu nhận mẫu

Tinh dịch được thu nhận bởi quá trình thủ dâm (thời gian kiêng giao hợp là từ 2-7 ngày), hóa lỏng (37°C , thời gian 15-60 phút) [12].

Phương pháp chuẩn bị tinh trùng bằng phương pháp thang nồng độ không liên tục

Đặt môi trường thang nồng độ vào ống ly tâm: 1ml môi trường lọc (sil select) 45% ở trên và 1ml môi trường lọc (sil select) 90% ở dưới. Đặt 1ml tinh dịch lên lớp môi trường lọc và ly tâm 1500 vòng trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi, chuyển cặn lắng vào 2 ml môi trường rửa (Ferticult Flushing) và ly tâm 1500 vòng/5 phút. Rửa lần 2 như trên. Hút bỏ dịch nổi, cặn thu được cuối cùng sẽ được dùng để đánh giá mật độ, độ di động và được tiến hành đo ROS.

Đo hàm lượng ROS trong tinh dịch bằng phương pháp đo huỳnh quang[13]

Mẫu được đánh dấu bằng cách cho 200 μl tinh dịch đã hóa lỏng, 5 μl luminol (5-amino-2,3, dihydro-1,4-phthalazinedione) đã được pha ở nồng độ 5mM trong dimethyl sulfoxide (DMSO). 5 μl luminol 5mM trong DMSO được đánh dấu là mẫu đối chứng âm. 12,5 μl H_2O_2 với 5 μl luminol được đánh dấu là mẫu đối chứng dương. Tất cả các mẫu được đo lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình. Hàm lượng ROS được đo bằng phương pháp phát quang hóa học sử dụng đầu dò luminol (Máy Beckman Coulter DTX880) trong vòng 15 phút. Giá trị được biểu diễn ở dạng 10^4 RLU/phút/ 20×10^6 tinh trùng.

Đo hàm lượng ROS trong dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa bằng phương pháp đo huỳnh quang[13]

Mẫu được đánh dấu bằng cách cho 200 μl

dịch huyền phù có tinh trùng vào 5 μ l luminol (5-amino-2,3, dihydro-1,4-phthalazinedione) đã được pha ở nồng độ 5mM trong dimethyl sulfoxide (DMSO). 5 μ l luminol 5mM trong DMSO vào 200 μ l PBS được đánh dấu là mẫu đối chứng âm. 12,5 μ l H₂O₂ với 5 μ l luminol được đánh dấu là mẫu đối chứng dương. Tất cả các mẫu được đo lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình. Hàm lượng ROS được đo bằng phương pháp phát quang hóa học sử dụng đầu dò luminol (Máy Beckman Coulter DTX880) trong vòng 15 phút. Giá trị được biểu diễn ở dạng 10⁴ RLU/phút/20x10⁶ tinh trùng.

Phân tích và diễn giải số liệu

Số liệu được thu thập và quản lý bằng phần mềm SPSS version 20 (IBM SPSS Statistics). Sử dụng test Compare means – One – way ANOVA để so sánh các số liệu giữa các nhóm nghiên cứu. Giá trị p < 0,05 được xem là có ý nghĩa thống kê.

CÁC YẾU TỐ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM

Hàm lượng ROS trong tinh dịch và huyền phù tinh trùng sau lọc rửa.

Chúng tôi so sánh hàm lượng ROS giữa nhóm NS và AS. Đồng thời so sánh hàm lượng ROS trước và sau lọc rửa tinh trùng.

III. KẾT QUẢ

Từ tháng 01/2012 đến tháng 12/2012, 112 mẫu tinh trùng được lấy từ bệnh nhân điều trị hỗ trợ sinh sản IVFAS, Bệnh viện An Sinh. Trong đó 70 mẫu bệnh nhân có các chỉ số tinh dịch bình thường –NS (mật độ $\geq 15 \times 10^6$ tinh trùng/ml, di động $\geq 40\%$) và 52 mẫu từ bệnh nhân có chỉ số tinh dịch bất thường –AS (không thuộc các tiêu chuẩn của nhóm bình thường).

NHÓM	MẬT ĐỘ TINH TRÙNG TRUNG BÌNH (X10 ⁶ /ML)	DI ĐỘNG TRUNG BÌNH (%)
Nhóm NS (70)	53,43 (15-140)	52,94 (40-72)
Nhóm AS (52)	15,46 (2-40)	32,54 (3-57)

Bảng 1: So sánh các thông số tinh dịch ở mẫu thí nghiệm

Thí nghiệm tiến hành lấy được 122 mẫu tinh trùng từ bệnh nhân điều trị vô sinh, trong đó 70 mẫu bệnh nhân nhóm NS và 52 mẫu từ bệnh nhân AS.

NHÓM	NROS (10 ⁴ RLU/ MIN/20.10 ⁶ TINH TRÙNG)	WROS (10 ⁴ RLU/ MIN/20.10 ⁶ TINH TRÙNG)
Nhóm NS	0,08 (0,023-0,48)	0,68 (0,036-5,44)
Nhóm AS	0,43 (0,034-4)	6,69 (0,15-24)

Bảng 2: So sánh hàm lượng ROS ở mẫu tinh dịch và dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa

(NROS: hàm lượng ROS ở mẫu tinh dịch, WROS: hàm lượng ROS dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa, P<0,05, có ý nghĩa thống kê).

Hàm lượng ROS ở mẫu tinh dịch

Hàm lượng ROS nhóm AS [0,43 (0,034; 4) x10⁴ RLU/phút/20x10⁶ tinh trùng] cao hơn hàm lượng ROS nhóm NS [0,08 (0,023; 0,48)x10⁴ RLU/phút/20x10⁶ tinh trùng]. Ở nhóm NS thì hàm lượng ROS nằm trong khoảng từ [(0,023;0,48) x10⁴ RLU/phút/20x10⁶ tinh trùng]. Nhóm AS thì hàm lượng ROS nằm trong khoảng [(0,034; 4) x10⁴ RLU/phút/20x10⁶ tinh trùng]. Giá trị trung bình của hàm lượng ROS ở nhóm AS cao gấp 5 lần so với giá trị trung bình của hàm lượng ROS ở nhóm NS.

Hàm lượng ROS ở dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa

Hàm lượng ROS ở dịch huyền phù sau khi lọc rửa được đo sau khi loại bỏ tinh tương bằng quá trình ly tâm và được rửa sạch với môi trường cấy. Hàm lượng ROS ở dịch huyền phù có tinh trùng sau khi lọc rửa thì cao hơn so với hàm lượng ROS ở mẫu tinh dịch.

Hàm lượng ROS ở dịch huyền phù có tinh trùng sau khi lọc rửa nhóm AS [6,69 (0,15; 24)x10⁴ RLU/phút/20x10⁶ tinh trùng] cao hơn hàm lượng ROS nhóm NS [0,68 (0,036; 5,44)x10⁴ RLU/phút/20x10⁶ tinh trùng]. Ở nhóm NS thì hàm lượng ROS nằm trong khoảng từ

[(0,036; 5,44)×10⁴ RLU/phút/20×10⁶ tinh trùng]. Nhóm AS thì hàm lượng ROS nằm trong khoảng [(0,15;24)×10⁴ RLU/phút/20×10⁶ tinh trùng]. Giá trị trung bình của hàm lượng ROS ở nhóm AS cao gấp 10 lần so với giá trị trung bình của hàm lượng ROS ở nhóm NS.

So sánh hàm lượng ROS ở mẫu tinh dịch và dịch huyền phù có tinh trùng sau khi lọc rửa

Hàm lượng ROS của mẫu dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa cao hơn hàm lượng ROS của mẫu tinh dịch ở cả hai nhóm bệnh nhân có chỉ số tinh dịch bình thường và bất thường. Hàm lượng ROS thấp nhất ở mẫu tinh dịch của nhóm bệnh nhân có chỉ số tinh dịch bình thường [0,08 (0,023; 0,48) ×10⁴ RLU/phút/20×10⁶ tinh trùng], P<0,05]. Hàm lượng ROS cao nhất ở mẫu dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa của nhóm bệnh nhân có chỉ số tinh dịch bất thường [6,69 (0,15; 24) ×10⁴RLU/phút/20×10⁶ tinh trùng], p<0,05)].

MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA HÀM LƯỢNG ROS VỚI ĐỘ DI ĐỘNG VÀ MẬT ĐỘ TINH TRÙNG

	MẬT ĐỘ	DI ĐỘNG	NROS	WROS
MẬT ĐỘ	-	0,254**	-0,123**	-0,201**
DI ĐỘNG	0,254**	-	-0,166**	-0,306**
NROS	-0,123**	-0,166**	-	0,550*
WROS	-0,201**	-0,306**	0,550*	-

Bảng 3: Chỉ số tương quan và ý nghĩa thống kê ROS với độ di động và mật độ tinh trùng

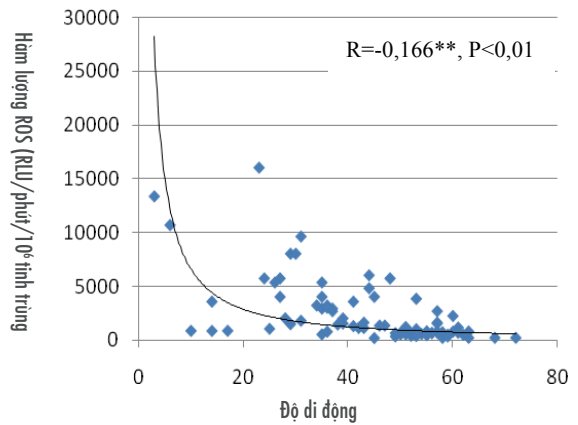
(NROS: hàm lượng ROS ở mẫu tinh dịch. WROS: hàm lượng ROS dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa. *P<0,05, **P<0,01 có ý nghĩa thống kê theo test tương quan SPSS).

Hàm lượng ROS có mối quan hệ tương quan nghịch với độ di động tinh trùng (R=-0,166**, P<0,01).

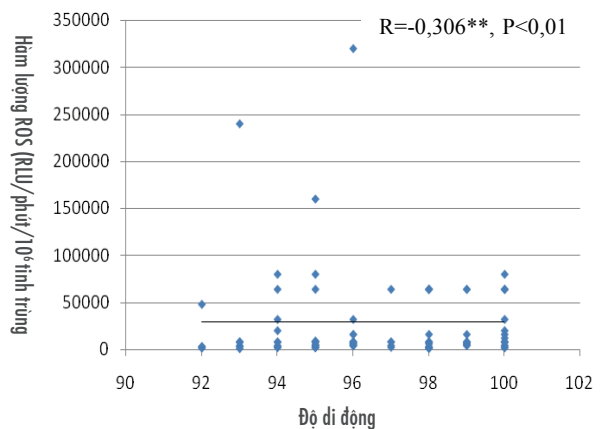
Hàm lượng ROS có mối quan hệ tương quan nghịch với mật độ tinh trùng (R=-0,123**, P<0,01).

Hàm lượng ROS mẫu dịch huyền phù có tinh

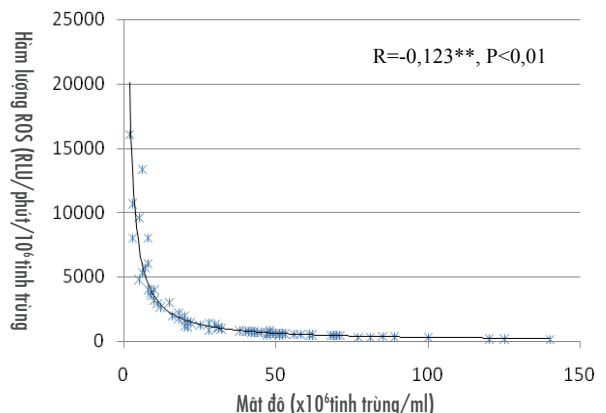
trùng sau lọc rửa có mối quan hệ tương quan thuận với hàm lượng ROS của mẫu tinh dịch (R=0,550*, P<0,05).



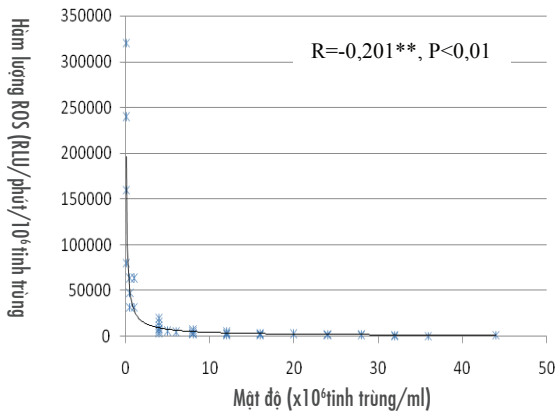
Hình 1: Mối tương quan giữa hàm lượng ROS và độ di động tinh trùng trong tinh dịch



Hình 2: Mối tương quan giữa hàm lượng ROS và độ di động tinh trùng trong dịch huyền phù có tinh trùng sau



Hình 3: Mối tương quan giữa hàm lượng ROS và mật độ tinh trùng trong tinh dịch



Hình 4: Mối tương quan giữa hàm lượng ROS và mật độ tinh trùng trong dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa

IV. BÀN LUẬN

Vào những năm đầu của thế kỉ 19 đã có một số bài báo đầu tiên nói về vai trò của ROS trong vấn đề vô sinh nam [14, 15, 16]. Tầm quan trọng của ROS trong tinh dịch đã được nhấn mạnh trong tiêu chuẩn WHO (1999) và một số phương pháp đo hàm lượng ROS trong tinh dịch cũng đã được đưa ra [17, 18]. Tuy nhiên, những phương pháp đáng tin cậy và có thể được áp dụng trong việc đo hàm lượng ROS trong phòng thí nghiệm vẫn còn thiếu. Một số phương pháp gián tiếp được xem là một công cụ hữu dụng trong việc chuẩn đoán vô sinh nam giới đó là việc sử dụng các chất kháng oxy hóa.

Việc đo được hàm lượng ROS trong tinh dịch chỉ thực hiện được khi trong tinh dịch có sự mất cân bằng giữa việc tạo ra các gốc oxy hóa tự do và các chất kháng oxy hóa. Đo trực tiếp các gốc oxy hóa thì rất không thể thực hiện. Phương pháp gián tiếp được sử dụng đó là sử dụng phản ứng phát sáng với chất trung gian là luminol hoặc lycigenin. Luminol được ưa dùng hơn lycigen vì luminol có thể đo được ROS nội bào và ngoại bào bao gồm các gốc H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , ROO^{\bullet} .

Theo S.Venkatesh và cs., đo hàm lượng ROS ở mẫu tinh dịch phản ánh được trạng thái oxy hóa ban đầu của tinh dịch. Việc đo hàm lượng

ROS trong dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa thì tốn nhiều thời gian bởi vì liên quan đến nhiều bước trong quá trình lọc rửa như quá trình loại bỏ tinh tương và ly tâm. Quá trình lọc rửa loại bỏ đi cả các chất chống lại sự oxy hóa trong tinh tương và quá trình ly tâm cũng làm tăng thêm quá trình sản sinh ROS. Vì vậy, việc loại bỏ tinh dịch trong quá trình chuẩn bị tinh trùng có thể làm cho tế bào này dễ bị nhạy cảm với các tác động gây oxy hóa. Hàm lượng ROS cao dẫn tới việc thất bại trong quá trình thụ thai bởi vì ROS làm giảm tính di động tinh trùng, thay đổi tính thấm của màng và độ lỏng tinh dịch, ảnh hưởng tới sự dung nạp của tinh trùng và trứng.

Trong bài nghiên cứu này, ở nhóm AS, mật độ tinh trùng thấp và độ di động của tinh trùng trong tinh dịch yếu hơn so với nhóm NS. Kết quả hàm lượng ROS nhóm AS $[0,43(0,034; 4) \times 10^4$ RLU/phút/ 20×10^6 tinh trùng] cao hơn hàm lượng ROS nhóm NS $[0,08(0,023; 0,48) \times 10^4$ RLU/phút/ 20×10^6 tinh trùng]. Năm 2007, Moein và cs., (2007) so sánh hàm lượng ROS ở tinh dịch của người đàn ông sinh sản bình thường và người đàn ông vô sinh. Kết quả, hàm lượng ROS ở người đàn ông sinh sản bình thường là $180,05 \times 10^4$ RLU/phút/ 20×10^6 tinh trùng, các bệnh nhân vô sinh thì hàm lượng ROS trung bình là $1852,04 \times 10^4$ RLU/phút/ 20×10^6 tinh trùng. Như vậy, hàm lượng ROS ở bệnh nhân vô sinh cao gấp gần 10 lần so với người bình thường. Kết quả này tương tự với tác giả Fingerova và cs., đã tìm ra vào năm 2009. Điều này có thể giải thích do tinh trùng nhóm AS bị oxy hóa nhiều hơn nhóm NS. Tinh trùng rất dễ bị oxy hóa vì bản thân tinh trùng chứa đựng khả năng tạo ra ROS, màng tinh trùng chứa các chất béo không bão hòa với nồng độ cao, tinh trùng không có khả năng sửa chữa màng tế bào và lượng enzyme giúp giữ tế bào rất hạn chế.

Hàm lượng ROS của mẫu dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa cao hơn hàm lượng ROS của mẫu tinh dịch ở cả hai nhóm bệnh nhân

có chỉ số tinh dịch bình thường và bất thường. Allamameni và cs., 2005 đánh giá tinh dịch từ 34 mẫu tinh dịch của những người tự nguyện và 44 mẫu bệnh nhân bất thường ở các thông số tinh dịch đồ. Hàm lượng ROS ở trong tinh dịch của người tự nguyện thấp hơn 5 lần so với hàm lượng ROS trong dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa. Hàm lượng ROS trong tinh dịch của mẫu bệnh nhân bất thường chỉ số tinh dịch đồ thì cao hơn mẫu của những người tự nguyện [19]. Một nghiên cứu khác của Athayde và cs., 2007 đã nghiên cứu trên 114 mẫu ở người đàn ông bình thường ở Brazil tình nguyện phẫu thuật vô sinh bằng phẫu thuật cắt ống dẫn tinh và 47 đàn ông cận hữu sinh". Ở mẫu không có bạch cầu, hàm lượng ROS ở mẫu đàn ông bình thường thì ở mức $0,55 \times 10^4$ RLU/phút/ 20×10^6 tinh trùng, thấp hơn 20 lần so với hàm lượng ROS ở mẫu dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa [20]. Một nghiên cứu mới nhất của nhóm này đã đưa ra vùng giá trị của hàm lượng ROS trong tinh dịch của 78 người đàn ông phẫu thuật cắt ống dẫn tinh ở độ tuổi dưới 40 là $0,29 (0,18; 0,58) \times 10^4$ RLU/phút/ 20×10^6 tinh trùng.

Bảng 3 biểu diễn hàm lượng ROS có mối quan hệ tương quan nghịch với mật độ tinh trùng ($R = -0,123^{**}$, $P < 0,01$) và độ di động tinh trùng ($R = -0,166^{**}$, $P < 0,01$). Độ di động của tinh trùng càng cao thì hàm lượng ROS càng thấp và ngược lại. Sự gia tăng ROS được cho là có liên quan đến giảm khả năng di động của tinh trùng (Agarwal và cs., 1994; Armstrong và cs., 1999, Bumber và cs., 2001) [21, 22, 23]

Hiện nay trên thế giới chưa có một chuẩn nào để xác định hàm lượng ROS nằm ở giá trị nào là dương tính hay âm tính. Nhưng qua các nghiên cứu trên thì ta thấy hàm lượng ROS được tìm thấy có giá trị tương đương nhau cho dù mẫu được lấy từ các dân tộc khác nhau và được đo bằng máy luminometer khác nhau.

Đo hàm lượng ROS bằng phương pháp đo huỳnh quang sử dụng đầu dò luminol trong

tinh dịch đánh giá chính xác hàm lượng ROS hơn trong dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa. Đo hàm lượng ROS trong dịch huyền phù có tinh trùng sau lọc rửa chỉ thực hiện khi muốn đánh giá hàm lượng ROS với kết quả thụ tinh ống nghiệm.

Phương pháp xác định hàm lượng ROS trong tinh dịch thì nhanh, đơn giản và có thể được sử dụng để đo hàm lượng ROS trong mẫu có ít tinh trùng.

V. KẾT LUẬN

Lần đầu tiên ở Việt nam, chúng tôi xây dựng thành công qui trình đo hàm lượng ROS ở mẫu tinh dịch. Nồng độ ROS có mối tương quan nghịch với các chỉ số của tinh dịch đồ (độ di động và mật độ tinh trùng). Đây là một phương pháp đơn giản, rẻ tiền, dễ tiến hành, là công cụ hữu dụng để chẩn đoán và theo dõi điều trị vô sinh nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. http://suckhoe68.com/suc-khoe-doi-song_1/suc-khoe-nam-gioi/tu-van-nam-khoa-vo-sinh-nam-ki-1.html
2. Hồ Mạnh Tường. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam về sự liên quan giữa gốc tự do và chất lượng tinh trùng ở bệnh nhân vô sinh nam. Hội nghị Oxidative stress và tác động trên khả năng sinh sản người, TP HCM, 12/2012.
3. Ashok Agarwal Ph.D, Rakesh K. Sharma, Ph.D và cs., Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. American Society for Reproductive Medicine, 2006, Vol 86, No.4.
4. Eve de Lamirande, Hong Jiang, Armand Zini. Reactive oxygen species and Sperm physiology. Journals of Reproduction and Fertility. 1997;2,48-54.
5. M Maneesh, H Jayalekshmi (2006). Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. Indian Journal of Clinical Biochemistry; 21(2): 80–89.

- 6.** Ochsendorf, F.R. (1999). Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum. Reprod.* 5, 399-420.
- 7.** Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48:835-850.
- 8.** Aitken RJ, Bucking D, West KM. Reactive oxygen species and human spermatozoa; Analysis of the cellular mechanisms involved in luminol-and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cell phys.* 1992; 151:466-477.
- 9.** Moein MR, Dehghani VO, Tabibnejad N, Vahidi S (2007). Reactive Oxygen Species (ROS) level in seminal plasma of infertile men and healthy donors. *Iranian journal of Reproductive Medicine*; 5(2): 51–55.
- 10.** Fingerova H, Ivana Oborna, Jiri Novotny, Magda Svobodavo, Jana Breziovova, Lenka Radova (2009). The measurement of reactive oxygen species in human neat semen and in suspended spermatozoa: a comparison. *Biology and Endocrinology*; 7: 118.
- 11.** Venkatesh S, Shamsi MB, S. Dudeja, Kumar R, Dada R (2011). Reactive oxygen species measurement in neat and washed semen: comparative analysis and its significance in male infertility assessment, *Arch Gynecol Obstet.*
- 12.** World Health Organization (2010). *Laboratory Manual for examination and processing of human semen.* Fifth edition.
- 13.** Cocuzza M, Athayde KS, Agarwal A, Sharma RK, Pagani R, Lucon AM, Srougi M, Hallak J. Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men. *Urology* 2008, 71:491-494.
- 14.** Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989, 41:183-197.
- 15.** Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa, physiology and pathology. *Int j Androl* 1997, 20:61-69.
- 16.** Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996, 48:835-197.
- 17.** Kobayashi H, Gil-Guzman E, Mahran AM, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. *J Androl* 2001, 22:568-574.
- 18.** Ochsendorf FR, Thiele J, Fuchs J, Schuttat H, Freisleben HJ, Buslau M, Milbradt R. Chemiluminescence in semen of infertile men. *Andrologia* 1994, 26:289-293.
- 19.** Allamaneni SS, Agarwal A, Nallella KP, Sharma RK, Thomas AJ, Jr, Sikka SC. Characterization of oxidative stress status by evaluation of reactive oxygen species levels in whole semen and isolated spermatozoa. *Fertil Steril.* 2005;83:800–803. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.05.106
- 20.** Athayde KS, Cocuzza M, Agarwal A, Krajcir N, Lucon AM, Srougi M, Hallak J. Development of normal reference values for seminal Reactive Oxygen Species and their correlation with leukocytes and semen parameters in a fertile population. *J Androl.* 2007;28:613–620. doi:10.2164/jandrol.106.001966
- 21.** Agarwal, A., Ikemoto, I. and Loughlin, K.R (1994). Effect of sperm washing on reactive oxygen species level in semen. *Arch. Androl.* 33, 157-162.
- 22.** Armstrong, J.S., Rajsekeran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W.J and Sikka, S.C (1999). Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 869-880.
- 23.** Bumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J Androl.* 2001;57:895-902.