

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đào Thị Phương

**ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ TẠO PHÔI TRONG ỐNG NGHIỆM VÀ
SÀNG LỌC BẤT THƯỜNG SỐ LƯỢNG NHIỄM SẮC THỂ
Ở PHÔI GIAI ĐOẠN TIỀN LÀM TỔ TỪ NOÃN TRỮ LẠNH
TẠI BỆNH VIỆN QUỐC TẾ SẢN NHI HẢI PHÒNG
GIAI ĐOẠN 05/2021 – 08/2023**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Hà Nội - 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đào Thị Phương

**ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ TẠO PHÔI TRONG ỐNG NGHIỆM VÀ
SÀNG LỌC BẤT THƯỜNG SỐ LƯỢNG NHIỄM SẮC THỂ
Ở PHÔI GIAI ĐOẠN TIỀN LÀM TỔ TỪ NOẢN TRỮ LẠNH
TẠI BỆNH VIỆN QUỐC TẾ SẢN NHI HẢI PHÒNG
GIAI ĐOẠN 05/2021 – 08/2023**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Mã số: 8 42 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Nguyễn Văn Hạnh

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Hà Nội, ngày 31 tháng 10 năm 2023

TÁC GIẢ LUẬN VĂN



ĐÀO THỊ PHƯƠNG

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình hoàn thành luận văn này, tôi đã nhận được sự giúp đỡ quý báu của các thầy cô giáo, các nhà khoa học, các đồng nghiệp cùng gia đình và bạn bè.

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Văn Hạnh đã trực tiếp hướng dẫn, chỉ dạy cho tôi về chuyên môn, đồng thời động viên, khích lệ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng đã tạo những điều kiện thuận lợi nhất để tôi thực hiện nghiên cứu này. Tôi xin cảm ơn các đồng nghiệp tại Khoa Hỗ trợ Sinh sản, Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng đã đưa ra những lời khuyên trong thời gian tôi thực hiện nghiên cứu tại Khoa và tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi để hoàn thành quá trình học tập và thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo, các thầy cô giáo, giảng viên và các cán bộ đang công tác tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã luôn giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận văn.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới các thành viên trong gia đình và bạn bè, những người đã luôn ở bên tôi, cổ vũ và động viên tôi những lúc khó khăn để có thể hoàn thành luận văn này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày 31 tháng 10 năm 2023



ĐÀO THỊ PHƯƠNG

MỤC LỤC

Danh mục các ký hiệu, các chữ cái viết tắt

Danh mục bảng

Danh mục các hình

Danh mục biểu đồ

MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	3
1.1. TỔNG QUAN VỀ THỤ TINH TRONG ỚNG NGHIỆM	3
1.1.1. Khái niệm về thụ tinh trong ống nghiệm	3
1.1.2. Đánh giá sự phát triển của phôi	3
1.2. SINH LÝ NOÃN	6
1.2.1. Sự sinh noãn.....	6
1.2.2. Đánh giá hình thái noãn	8
1.3. BẢO QUẢN LẠNH NOÃN	12
1.3.1. Định nghĩa.....	12
1.3.2. Các phương pháp trữ lạnh và rã đông noãn.....	12
1.3.3. Các nghiên cứu về tác động của quá trình trữ rã đối với noãn .	14
1.4. CÁC NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG CỦA QUÁ TRÌNH TRỮ RÃ ĐỐI VỚI KẾT QUẢ PHÔI HỌC VÀ LÂM SÀNG.....	18
1.4.1. Kết quả phôi học	18
1.4.2. Kết quả sản khoa và chu sinh	20
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	21
2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn	21
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ	21
2.1.3. Thiết kế nghiên cứu.....	21
2.1.4. Cỡ mẫu và chọn mẫu.....	22
2.2. HOÁ CHẤT VÀ THIẾT BỊ.....	23
2.2.1. Hoá chất.....	23
2.2.2. Vật tư, thiết bị.....	23
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24
2.3.1. Phương pháp trữ lạnh noãn/phôi	24
2.3.2. Phương pháp rã đông noãn/phôi	24
2.3.3. Phương pháp vi tiêm tinh và nuôi cấy phôi	24

2.3.4.	Phương pháp đánh giá sự phát triển của phôi	24
2.3.5.	Phương pháp sinh thiết phôi.....	25
2.3.6.	Chuyển phôi trữ đông.....	26
2.3.7.	Phân tích số liệu nghiên cứu	26
2.4.	VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU	27
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN		28
3.1.	ĐẶC ĐIỂM CHUNG CỦA ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	28
3.2.	KHẢ NĂNG SỐNG SÓT CỦA NOÃN SAU RÃ ĐÔNG.....	30
3.3.	KẾT QUẢ PHÔI HỌC	33
3.3.1.	Đặc điểm thụ tinh	33
3.3.2.	Khả năng tạo phôi phân chia (ngày 3)	35
3.3.3.	Khả năng tạo phôi nang	37
3.3.4.	Chất lượng di truyền	38
3.4.	KẾT QUẢ LÂM SÀNG	41
3.4.1.	Phân bố phôi chuyển theo chất lượng di truyền và hình thái....	41
3.4.2.	Kết quả thai	42
3.4.3.	Ảnh hưởng của chất lượng di truyền phôi tới tỉ lệ có thai	44
3.5.	ĐÁNH GIÁ CÁC YẾU TỐ NGƯỜI MẸ TIỀN LƯỢNG PHÔI NGUYÊN BỘI.....	45
3.5.1.	Nhóm tiên lượng kém	46
3.5.2.	Nhóm tiên lượng tốt	47
3.5.3.	Tiên lượng phôi nguyên bội theo ngưỡng AMH	47
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ		50
KẾT LUẬN		50
KIẾN NGHỊ		51
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN		52
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....		53
PHỤ LỤC		i

Danh mục các ký hiệu, các chữ cái viết tắt

Viết tắt	Tiếng Việt	Tiếng Anh
AFC	Đếm số nang noãn thứ cấp	<i>Antral follicle count</i>
AMH	Hoóc môn buồng trứng	<i>Anti-Mullerian Hormone</i>
AUC	Diện tích dưới đường cong	<i>Area under curve</i>
Azoospermia	Vô tinh	
BMI	Chỉ số khối cơ thể	<i>Body mass index</i>
CG	Hạt vỏ	<i>Cortical granule</i>
COH	Kích thích buồng trứng có kiểm soát	<i>Controlled Ovarian Stimulation</i>
CPA	Chất bảo quản lạnh	<i>Cryoprotectant agent</i>
Cryptospermia	Tinh trùng được tìm thấy sau ly tâm tinh dịch	
DMSO		<i>Dimethylsulfoxide</i>
DNA		<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EG		<i>Ethylene glycol</i>
FSH	Kích noãn bào tố	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
Gran	Độ mịn bào tương chất	<i>Granularity</i>

GV	Túi mầm	<i>Germinal vesicle</i>
GVBD	Vỡ túi mầm	<i>Germinal vesicle breakdown</i>
HSA	Albumin huyết thanh người	<i>Human serum albumin</i>
ICM	Khối tế bào nội phôi	<i>Inner cell mass</i>
ICSI	Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn	<i>Intra-Cytoplasmic Sperm Injection</i>
Incls	Thể vùi	<i>Inclusions</i>
IP3		<i>Inositol-triphosphate</i>
IVF	Thụ tinh trong ống nghiệm	<i>In vitro fertilization</i>
LH	Hoóc môn hoàng thể hoá	<i>Luteinizing hormone</i>
MI	Kỳ giữa I	<i>Metaphase I</i>
MII	Kỳ giữa II	<i>Metaphase II</i>
miRNA		<i>Mitochondrial ribonucleic acid</i>
M-SER	Mạng lưới nội chất trơn của ty thể	<i>Mitochondrial-Smooth Endomedium Reticulum</i>
MV	Phức hợp ty thể-túi	<i>Mitochondrial vesicle</i>
NPB	Hạt nhân	<i>Nucleolar Precursor Body</i>
OCC	Khối phức hợp tế bào noãn	<i>Oocyte-cumulus complex</i>

PGT-A	Bất thường số lượng nhiễm sắc thể ở phôi tiền làm tổ	<i>Preimplantation genetic testing</i>
PN	Tiền nhân	<i>Pronuclei</i>
PROH		<i>Propanediol</i>
PVS	Khoanh quanh noãn	<i>Perivitelline space</i>
RNA		<i>Ribonucleic acid</i>
ROC		<i>Receiver operating characteristic</i>
SER	Lưới nội chất trơn	<i>Smooth Endomedium Reticulum</i>
Sgo2	Enzyme phân cắt	<i>Protein shugoshin 2</i>
SOAT	Tinh trùng ít, yếu, dị dạng nghiêm trọng	<i>Severe OligoAsthenoteratozoospermia</i>
TE	Lớp tế bào nào lá nuôi	<i>Trophectoderm</i>
TEM	Kính hiển vi điện tử truyền qua	<i>Transmission electron microscopy</i>
ZP	Màng trong suốt	<i>Zona pellucida</i>

Danh mục bảng

Bảng 1.1. Đánh giá hình thái phôi phân chia (ngày 3) theo đồng thuận Alpha 4	
Bảng 2.1. Đánh giá hình thái và xếp loại chất lượng phôi ngày 3.....	25
Bảng 3.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu	28
Bảng 3.2. Tỷ lệ noãn sống sót sau rã đông	31
Bảng 3.3. Tỷ lệ thụ tinh.....	34
Bảng 3.4. Đặc điểm phôi phân chia (ngày 3).....	36
Bảng 3.5. Khả năng tạo phôi nang	37
Bảng 3.6. Phân bố phôi theo chất lượng di truyền và nguồn gốc noãn	39
Bảng 3.7. Phân bố phôi chuyển theo chất lượng di truyền	41
Bảng 3.8. Phân bố phôi chuyển theo chất lượng hình thái	41
Bảng 3.9. Đặc điểm thai ở 2 nhóm noãn.....	42
Bảng 3.10. Tỷ lệ có thai chuyển phôi nguyên bội	44
Bảng 3.11. Tỷ lệ có thai chuyển phôi thể khảm	45
Bảng 3.12. Tiên lượng phôi nguyên bội theo ngưỡng AMH.....	48

Danh mục các hình

Hình 1.1. Các giai đoạn phôi nang.....	5
Hình 1.2. OCC trưởng thành và chưa trưởng thành.....	8
Hình 1.3. Noãn ở các giai đoạn.....	9
Hình 1.4. Phân loại hình thái thể cực thứ nhất.....	9
Hình 1.5. Phân loại hình thái khoang quanh noãn	10
Hình 1.6. Các bất thường chất lượng bào tương chất	11
Hình 2.1. Sơ đồ lựa chọn mẫu trong nghiên cứu	23
Hình 3.1. Phân biệt hình thái noãn sống sót và noãn thoái hoá sau rã đông ..	30
Hình 3.2. Đặc điểm hình thái hợp tử thụ tinh	33
Hình 3.3. Chất lượng hình thái phôi nuôi cấy ngày 3	35
Hình 3.4. Kết quả phân tích số lượng NST bằng NGS	38

Danh mục biểu đồ

Biểu đồ 3.1. So sánh tỉ lệ sống sót sau rã đông với các nghiên cứu khác.....	32
Biểu đồ 3.2. Tỉ lệ các dạng bất thường NST theo nguồn gốc noãn	40
Biểu đồ 3.3. Kết cục lâm sàng theo nguồn gốc noãn.....	43
Biểu đồ 3.4. Đường cong ROC xác định các yếu tố tiên lượng kém cho mô hình tiên lượng phôi nguyên bội	46
Biểu đồ 3.5. Đường cong ROC xác định các yếu tố tiên lượng tốt cho mô hình tiên lượng phôi nguyên bội	47
Biểu đồ 3.6. Phân bố tỉ lệ phôi nguyên bội theo ngưỡng AMH 1,36	48

MỞ ĐẦU

Kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm tại phòng thí nghiệm bắt đầu bằng việc thu nhận giao tử đực (tinh trùng) và giao tử cái (noãn). Tùy thuộc vào mong muốn và tình trạng bệnh lý của từng đối tượng, bác sĩ và chuyên viên phôi học sẽ đưa ra các phương hướng thực hiện các kỹ thuật đối với giao tử. Noãn được thụ tinh với tinh trùng thành phôi và sau đó được chuyển vào tử cung của bệnh nhân. Trường hợp sau khi thu nhận giao tử không thực hiện thụ tinh ngay thì giao tử cần được bảo quản lạnh để bảo tồn hình thái và chức năng. Bác sĩ lâm sàng có thể lựa chọn trữ lạnh noãn như một phương án dự phòng cần thiết cho những phụ nữ có nguy cơ cao bị suy buồng trứng do quá trình điều trị ung thư [1-3], hoặc nhóm phụ nữ có nguy cơ mắc hội chứng quá kích buồng trứng. Bên cạnh đó, khả năng sinh sản giảm theo độ tuổi là yếu tố đáng cân nhắc trong việc thực hiện trữ noãn chủ động với mục đích bảo tồn khả năng sinh sản cho những phụ nữ đang trong độ tuổi sinh sản nhưng chưa sẵn sàng mang thai [4]. Trữ lạnh noãn nhiều lần (gom noãn) để đạt được số lượng noãn tối ưu cho một chu kỳ tạo phôi là lựa chọn phù hợp với nhóm bệnh nhân đáp ứng kích thích buồng trứng kém [5]. Việc tư vấn thực hiện trữ lạnh noãn nên được cá thể hóa và dựa trên nhiều yếu tố, chẳng hạn như tuổi của bệnh nhân, tình trạng dự trữ buồng trứng, mức độ khẩn cấp của điều trị và loại điều trị ung thư cũng như nguy cơ suy sinh dục [6].

Tại Việt Nam, một số nghiên cứu về noãn trữ lạnh đã được thực hiện. Lê Thanh Huyền và cộng sự (2018) đánh giá biến đổi hình thái noãn và khả năng phát triển của noãn trữ lạnh bằng phương pháp thủy tinh hoá cho kết quả tỉ lệ noãn sống sau rã đông 89,09%, tỉ lệ thụ tinh 71,28%, tỉ lệ phôi tốt ngày 3 là 38,71%, tỉ lệ có thai lâm sàng 29,41%, tỉ lệ làm tổ 12,94% [7]. Một nghiên cứu khác của Lê Thuỳ Hồng Khả và cộng sự (2020) báo cáo kết quả đông lạnh noãn ở bệnh nhân điều trị thụ tinh trong ống nghiệm với tỉ lệ noãn sống sau rã đông đạt $95,59 \pm 13,60\%$, tỉ lệ thụ tinh $78,96 \pm 24,88\%$; tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ làm tổ lần lượt là 30,8% và 21,61% [8].

Trên thế giới đã có nhiều bằng chứng khoa học đã chứng minh trữ lạnh noãn là một kỹ thuật an toàn và hiệu quả [9-11]. Tuy nhiên, hầu hết các báo cáo đều nghiên cứu trên nhóm noãn trữ có nguồn gốc từ noãn hiến. Việc so sánh kết quả phôi học, lâm sàng và kết quả di truyền giữa nhóm noãn trữ lạnh và nhóm noãn tươi tự thân trong cùng một điều kiện tại cùng một thời điểm thụ

tính có thể củng cố vai trò và hiệu quả của trữ lạnh noãn. Trên cơ sở đó, chúng tôi thực hiện đề tài:

“Đánh giá kết quả tạo phôi trong ống nghiệm và sàng lọc bất thường số lượng nhiễm sắc thể ở phôi giai đoạn tiền làm tổ từ noãn trữ lạnh tại Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng giai đoạn 05/2021 – 08/2023” với mục tiêu:

1. So sánh kết quả tạo phôi trong ống nghiệm (kết cục phôi học và lâm sàng) và kết quả sàng lọc bất thường số lượng nhiễm sắc thể ở phôi tiền làm tổ (PGT-A) của noãn trữ rã so với noãn tươi.
2. Đánh giá một số yếu tố người mẹ tiền lượng phôi nguyên bội ở các bệnh nhân thực hiện tích lũy noãn bằng phương pháp thụ tinh hoá.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TỔNG QUAN VỀ THỤ TINH TRONG ống NGHIỆM

1.1.1. Khái niệm về thụ tinh trong ống nghiệm

Thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) bắt đầu với kích thích buồng trứng để thu được nhiều noãn trong cùng một chu kỳ giúp tăng xác suất thành công và tăng hiệu quả điều trị so với việc chỉ có 1-2 noãn rụng trong chu kỳ tự nhiên. Noãn được thụ tinh với tinh trùng để tạo phôi và được nuôi cấy theo dõi trong các tủ nuôi cấy chuyên biệt mô phỏng các điều kiện trong tử cung của người mẹ trong thời gian từ 3-6 ngày. Phôi có chất lượng hình thái tốt sẽ được cân nhắc để chuyển vào tử cung của người mẹ. Việc lựa chọn số lượng phôi chuyển còn tùy thuộc vào chất lượng phôi, tuổi phôi và điều kiện tiếp nhận của niêm mạc tử cung. Các phôi hữu dụng còn dư chưa sử dụng đến sẽ được trữ lạnh để dùng cho các lần chuyển phôi sau mà không cần thực hiện thêm chu kỳ kích thích buồng trứng nào. Sau khi cấy vào tử cung, phôi có thể làm tổ trong niêm mạc tử cung và dần phát triển thành thai nhi. Khoảng 10-12 ngày sau cấy phôi, bệnh nhân có thể thử thai que thử thai hoặc xét nghiệm máu để biết kết quả. Sau khi phôi được xác nhận đã làm tổ, việc theo dõi thai kì và sản khoa của thai từ IVF hoàn toàn giống như một thai bình thường. Một điểm lưu ý rằng, tỉ lệ đa thai (từ hai thai trở lên) thường cao hơn đối với những trường hợp thực hiện IVF so với thai tự nhiên. Mọi nỗ lực để giảm tỉ lệ đa thai và các biến chứng thai kỳ liên quan như đái tháo đường, tăng huyết áp thai kỳ, tiền sản giật có thể đạt được nhờ giảm số lượng phôi chuyển, tăng cường cải thiện hiệu quả nuôi cấy để phôi đạt chất lượng tốt.

1.1.2. Đánh giá sự phát triển của phôi

❖ *Giai đoạn hợp tử (tiền nhân)*

Noãn thụ tinh thường có hình cầu, với 2 thể cực và 2 tiền nhân (pronuclei - PN) có màng bao riêng biệt, kích thước bằng nhau, nằm sát nhau ở vùng trung tâm của noãn. PN có chứa các hạt nhân NPB (Nucleolar Precursor Body) với số lượng và kích thước tương đương nhau, sắp xếp thẳng hàng tại vùng giao nhau của màng 2 tiền nhân. Những đặc điểm như số PN khác 2; PN cách xa nhau, quá khác biệt nhau về kích thước hoặc có NPB quá nhỏ đều được xem là những đặc điểm bất thường của PN.

❖ *Phôi phân chia*

➤ *Hình thái và số lượng phôi bào*

Phôi bào phân chia theo quy luật lũy thừa của 2, nên số lượng phôi bào thường là chẵn. Số lượng phôi bào có thể là số lẻ 3, 5, 7 khi quan sát ở giai đoạn phân chia hay khi xuất hiện sự phân chia không đồng bộ. Thông thường, phôi gồm các phôi bào có kích thước gần như bằng nhau sắp xếp cạnh nhau tạo thành hình tròn. Nhiều hệ thống điểm đánh giá phôi đã được phát triển, trong đó hệ thống đánh giá phôi theo đồng thuận của hiệp hội Alpha được dùng phổ biến nhất ở Việt Nam và châu Âu [12] (Xem Bảng 1.1)

➤ *Mảnh vỡ bào tương*

Mảnh vỡ bào tương là một khối bào tương có màng bao, nằm ngoài tế bào, có kích thước $<45\mu\text{m}$ đối với phôi ngày 2 và $<40\mu\text{m}$ đối với phôi ngày 3. Các mức độ của mảnh vỡ bào tương bao gồm: nhẹ ($<10\%$), vừa phải ($10 - 25\%$) và nặng ($>25\%$). Giá trị % được tính dựa trên thể tích của phôi bào, ví dụ ở phôi 4 tế bào, 25% mảnh vỡ bào tương sẽ tương đương với thể tích 1 phôi bào.

Bảng 1.1. Đánh giá hình thái phôi phân chia (ngày 3) theo đồng thuận Alpha

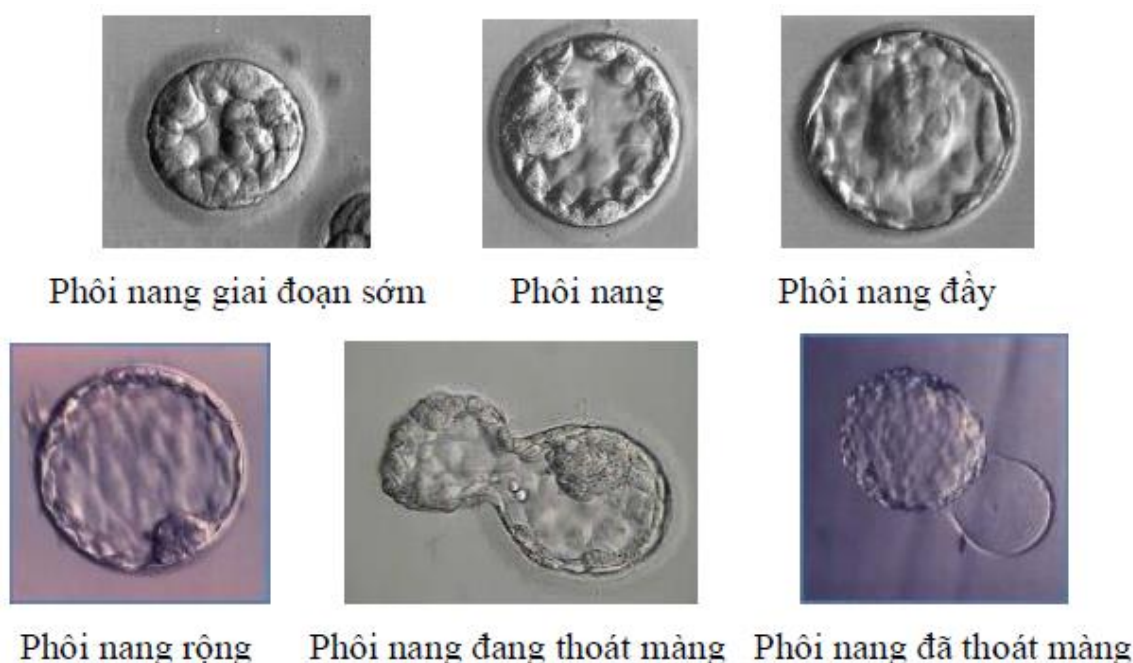
Thang điểm	Đánh giá	Mô tả
1	Tốt	$<10\%$ mảnh vụn tế bào Kích thước phôi bào phù hợp giai đoạn phát triển Không có phôi bào đa nhân
2	Trung bình	$10-25\%$ mảnh vụn tế bào Phần lớn phôi bào có kích thước phù hợp với giai đoạn phát triển Không có phôi bào đa nhân
3	Xấu	$>25\%$ mảnh vụn tế bào Kích thước phôi bào không phù hợp giai đoạn phát triển Có phôi bào đa nhân

❖ *Phôi nang*

Hình thái phôi nang được đánh giá dựa trên 3 tiêu chuẩn là độ nở rộng của khoang phôi, khối tế bào nội phôi (ICM – Inner cell mass) và lớp tế bào lá nuôi (TE – Trophectoderm).

➤ *Độ nở rộng khoang phôi*

Hiện tượng tích lũy dịch giữa các tế bào xảy ra vào giai đoạn ngày 4 và ngày 5 trong quá trình nuôi cấy phôi. Sự tăng lên của dịch trong khoang phôi nang và số lượng tế bào làm tăng kích thước của phôi, làm mỏng màng ZP. Cuối cùng, màng ZP vỡ giải phóng khối tế bào gọi là sự thoát màng. Quá trình hình thành khoang phôi nang là nhờ sự hoạt động của kênh xuyên màng Na/K-ATPase. Các kênh này bơm Na^+ và K^+ vào khoang phôi nang làm tăng áp suất thẩm thấu, kết quả là nước thẩm thấu vào khoang phôi nang, từ đó làm gia tăng áp lực nước và làm tăng dần kích thước của khoang trong suốt giai đoạn phôi nang. Độ nở rộng khoang phôi được chia thành 6 giai đoạn [13] (Hình 1.1).



Hình 1.1. Các giai đoạn phôi nang

➤ *Hình thái ICM*

Khi phôi nang đạt được nở rộng độ 3 hoặc cao hơn thì có thể dễ dàng quan sát 2 quần thể tế bào mới hình thành. Phần tế bào ở bên ngoài phôi giúp định hình cấu trúc phôi nang được gọi là lớp tế bào lá nuôi phôi TE, phần tế bào còn lại nằm bên trong khoang phôi nang thường tạo thành một cụm tế bào được gọi là khối tế bào ICM sẽ phát triển thành phôi thai. Hình thái ICM được phân thành 3 loại [12]. Loại A chứa nhiều tế bào và tế bào được nén chặt với nhau, loại B có số lượng tế bào ít hơn và tế bào có liên kết lỏng lẻo, loại C có rất ít tế bào và chúng liên kết với nhau một cách lỏng lẻo. Sự thay đổi về số

lượng các tế bào liên kết với nhau trong khối ICM ảnh hưởng đến hình dạng của ICM.

➤ *Đánh giá TE*

Tương tự như khối ICM, lớp tế bào TE có thể được phân biệt rõ ràng khi phôi đã nở rộng (độ 3 hoặc cao hơn). Vai trò của các tế bào TE chưa rõ ràng trong giai đoạn đầu phát triển của phôi nang nhưng trong giai đoạn hình thành khoang phôi nang TE đóng vai trò tạo ra chất lỏng chứa đầy khoang phôi nang. Mặt khác, vai trò TE thể hiện rõ ở giai đoạn làm tổ của phôi giúp phôi bám dính và ăn sâu vào lớp nội mạc tử cung. Ở giai đoạn sau của phôi thai, các tế bào TE phát triển thành màng ối và nhau thai. Tế bào TE cũng được phân thành 3 loại: Loại A chứa nhiều tế bào gắn kết với nhau hình thành biểu mô, loại B chứa số lượng tế bào ít hơn tạo thành lớp biểu mô mỏng, loại C, số lượng các tế bào rất ít, các tế bào có kích thước lớn và liên kết lỏng lẻo.

1.2. SINH LÝ NOÃN

1.2.1. Sự sinh noãn

Quá trình sinh noãn được bắt đầu từ giai đoạn bào thai và kết thúc khi phụ nữ bước vào thời kỳ mãn kinh. Sự sinh noãn phát triển qua 4 giai đoạn: (1) tế bào mầm sinh dục nguyên thủy hình thành và di chuyển tới cơ quan sinh dục; (2) gia tăng số lượng tế bào mầm sinh dục bằng cơ chế nguyên phân; (3) giảm phân để giảm vật chất di truyền; (4) trưởng thành noãn về cấu trúc chức năng.

❖ *Tế bào mầm sinh dục nguyên thủy hình thành và di chuyển tới cơ quan sinh dục*

Các tế bào mầm sinh dục đầu tiên có bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội, được gọi là các tế bào mầm sinh dục nguyên thủy. Những tế bào này xuất hiện đầu tiên ở thành túi noãn hoàng vào khoảng cuối tuần thứ 3 sau khi thụ tinh. Vào khoảng tuần thứ 5, đôi tuyến sinh dục bắt đầu xuất hiện ở trung thận, hình thành nên gờ sinh dục và là nơi duy nhất các tế bào mầm sinh dục nguyên thủy có thể sống sót. Từ tuần thứ 4 đến tuần thứ 6, tế bào mầm sinh dục nguyên thủy bắt đầu di chuyển của từ thành túi noãn hoàng đến gờ sinh dục. Cuối tuần thứ 6, quá trình nguyên phân đã làm tăng số lượng tế bào mầm sinh dục nguyên thủy từ vài trăm tế bào lên đến khoảng 10.000 tế bào.

❖ *Gia tăng số lượng tế bào mầm sinh dục bằng cơ chế nguyên phân*

Các tế bào mầm sinh dục nguyên thủy được tiếp tục nguyên phân trong giai đoạn từ tuần thứ 6 đến tuần 16 - 20. Tại cơ quan sinh dục, các tế bào mầm nguyên thủy đang nguyên phân được gọi là nguyên bào noãn. Nguyên bào noãn chứa bộ nhiễm sắc thể $2n$ với 23 cặp nhiễm sắc thể gồm 46 nhiễm sắc thể. Nhờ vào cơ chế nguyên phân, các nguyên bào noãn tăng dần về số lượng, đạt khoảng 600.000 tế bào vào tuần thứ 8 và 7 triệu tế bào vào tuần thứ 20 [14].

❖ *Sự trưởng thành của nhân*

Sự phát triển của trứng đòi hỏi một loạt các sự kiện của nhân và tế bào chất diễn ra cùng với các giai đoạn giảm phân để có thể thụ tinh, sao chép DNA và hình thành hợp tử lưỡng bội. Quá trình giảm phân được tái diễn dựa trên báo hiệu bằng sự phá vỡ túi mầm (Germinal vesicle breakdown - GVBD). Sau đó, tế bào trứng tiến triển thông qua kỳ giữa I, trong đó các nhiễm sắc thể tương đồng được ghép đôi sắp xếp ở giữa mặt phẳng xích đạo phân bào. Sau đó, các nhiễm sắc thể kép tách ra, một nửa vật liệu di truyền được đẩy vào thể cực thứ nhất, dẫn đến sự hình thành tế bào trứng trưởng thành, có bộ nhiễm sắc thể đơn bội (n kép). Hình thái của thoi phân bào bình thường trong tế bào trứng metaphase II (MII) được đánh giá bằng kính hiển vi ánh sáng phân cực. Khi sự hình thành thoi phân bào diễn ra bình thường thì có nhiều khả năng dẫn đến phôi nguyên bội. Một phân tích tổng hợp của 10 nghiên cứu đã xác định rằng khi thoi phân bào được hình thành và có chức năng bình thường thì tỉ lệ thụ tinh ($P < 0,0001$), tỉ lệ phôi phân chia ($P < 0,0001$) và tỉ lệ phôi phân chia có hình thái tốt ($P = 0,003$) cao hơn đáng kể. Ở người, quá trình lắp ráp trục chính thường diễn ra ~10 giờ sau GVBD và cần khoảng 14 đến 20 giờ giữa GVBD và quá trình giải phóng thể cực. Tổng thời gian trưởng thành của nhân bao gồm cả thời gian GVBD được ước tính là khoảng 20 đến 22 giờ. Tế bào trứng sau đó sẽ bị giữ lại ở kỳ giữa II cho đến khi thụ tinh.

❖ *Sự trưởng thành của tế bào chất*

Sự trưởng thành của tế bào chất chuẩn bị cho sự trưởng thành của nhân với các hình thái nhiễm sắc chất cụ thể cho thấy khả năng tế bào trứng tiếp tục quá trình phân bào. Sự trưởng thành của nhân chủ yếu bao gồm sự phân chia nhiễm sắc thể, trong khi sự trưởng thành của tế bào chất liên quan đến sự phân phối lại cơ quan, những thay đổi về động lực học của bộ khung xương tế bào, bộ máy Golgi, hoạt động giải phóng canxi, dự trữ mRNA, protein và các yếu tố phiên mã.

Những thay đổi về bộ khung tế bào trong các vi ống, sợi Actin và chất nhiễm sắc tạo ra sự bất đối xứng của tế bào và cho phép nhô ra khỏi cơ thể cực với sự mất tế bào chất ở mức tối thiểu.

❖ ***Duy trì sự nghỉ của quá trình giảm phân***

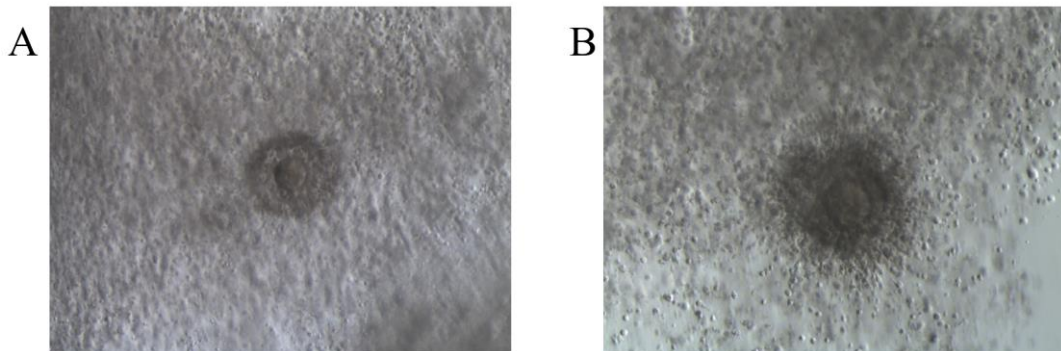
Tế bào trứng của con người bị bắt giữ ở kỳ đầu giảm phân I cho đến khi LH tăng vọt giữa chu kỳ báo hiệu một loạt thay đổi nội bào, bao gồm những thay đổi về nồng độ cAMP/cGMP của tế bào hạt và tế bào hạt dẫn đến trong việc nối lại quá trình giảm phân và phát triển tế bào trứng ở kỳ giữa II.

1.2.2. Đánh giá hình thái noãn

Sau khi thu nhận, noãn thường ở nhiều trạng thái chất lượng, giai đoạn trưởng thành và khả năng sống khác nhau.

1.2.2.1. Đánh giá phức hợp tế bào noãn (OCC)

Phức hợp noãn – tế bào hạt (OCC) thường được thu nhận vào thời điểm 36 giờ sau khi tiêm trưởng thành noãn và kích thích rụng noãn. Khối OCC được đánh giá sự trưởng thành thông qua độ giãn nở của lớp tế bào hạt và tế bào vành tia [15].



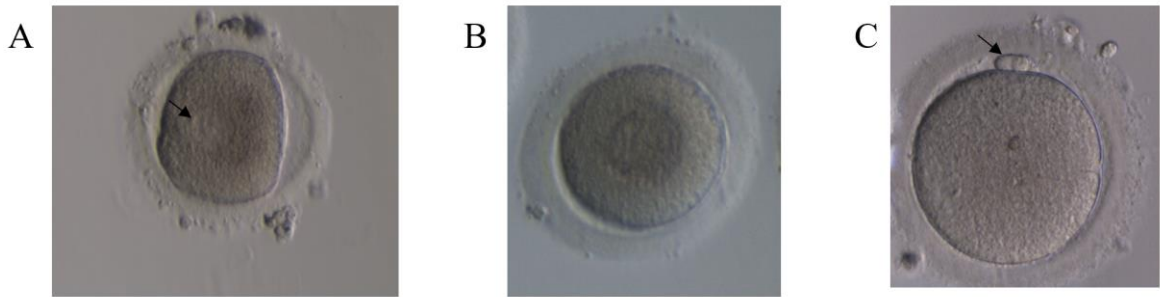
Hình 1.2. OCC trưởng thành và chưa trưởng thành (Nguồn: HP Fertility). (A) OCC trưởng thành có tế bào hạt và tế bào vành tia giãn rộng. (B) OCC chưa trưởng thành tế bào hạt và tế bào vành tia nén chặt

1.2.2.2. Đánh giá độ trưởng thành của noãn

❖ ***Trưởng thành nhân***

Trưởng thành nhân của noãn được đánh giá sau khi loại bỏ các tế bào hạt và tế bào vành tia. Noãn ở giai đoạn túi mầm (GV) có nhân vẫn dạng túi hình cầu chứa 1 hạt nhân to. Giai đoạn kỳ giữa giảm phân I (metaphase I) được xác định túi nhân biến mất và chưa phóng thích thể cực thứ nhất. Noãn trưởng thành

(MII) được xác định bởi sự hiện diện của thể cực thứ nhất trong khoang quanh noãn.



Hình 1.3. Noãn ở các giai đoạn (Nguồn: HP Fertility). (A) Noãn GV có túi nhân (mũi tên). (B): Noãn MI. (C). Noãn MII với thể cực thứ nhất (mũi tên)

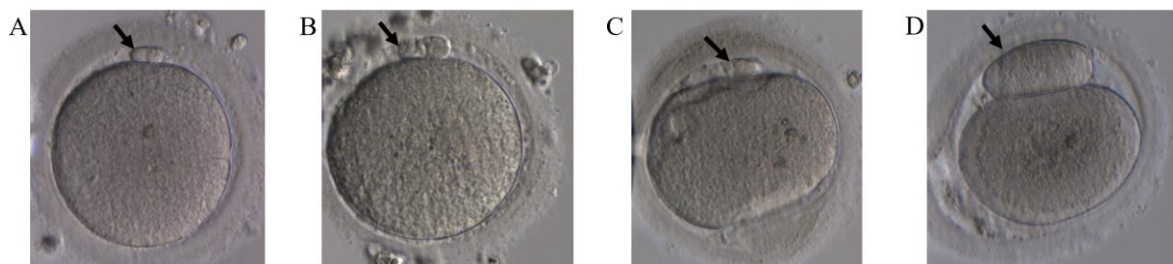
❖ *Trưởng thành tế bào chất*

Trưởng thành tế bào chất được xác nhận khi quan sát thấy những thể hạt vò (CG) từ bộ Golgi đã di chuyển đến rìa ngoài màng bào tương với vai trò quan trọng trong ngăn ngừa hiện tượng đa thụ tinh [16].

1.2.2.3. Một số hình thái bất thường của noãn

❖ *Đánh giá thể cực thứ nhất*

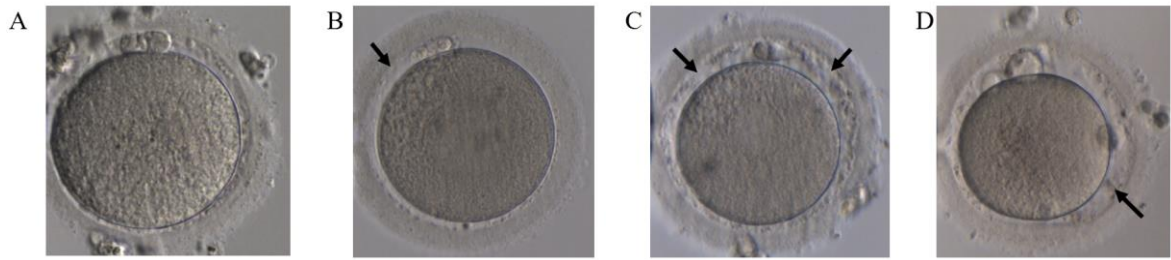
Một số nghiên cứu đã chỉ ra ảnh hưởng của bất thường thể cực thứ nhất đến khả năng thụ tinh và chất lượng phôi [17, 18]. Ngoài ra, noãn có thể cực không lồ khi thụ tinh có khả năng tạo ra phôi lệch bội nhiễm sắc thể cao [12].



Hình 1.4. Phân loại hình thái thể cực thứ nhất (Nguồn: HP Fertility). (A) PB 1: Bề mặt trơn nhẵn. (B) PB 2: Bề mặt nhẵn. (C) PB 3: Thể cực phân mảnh. (D) PB 4: To, bất thường

❖ *Đánh giá khoang quanh noãn (PVS)*

Độ rộng của PVS được cho là có ảnh hưởng đến khả năng sống của noãn sau ICSI [19, 20], tỉ lệ thụ tinh [21] và độ phân mảnh bào tương chất của phôi.



Hình 1.5. Phân loại hình thái khoang quanh noãn (Nguồn: HP Fertility). (A) PVS1: Bình thường, rộng vừa phải, không có hạt. (B) PVS2: Rộng một phần quanh noãn, không có hạt. (C) PVS3: Rộng toàn bộ chu vi quanh noãn. (D) PVS4: Tương tự PVS3 và xuất hiện thêm hạt trong khoang PVS

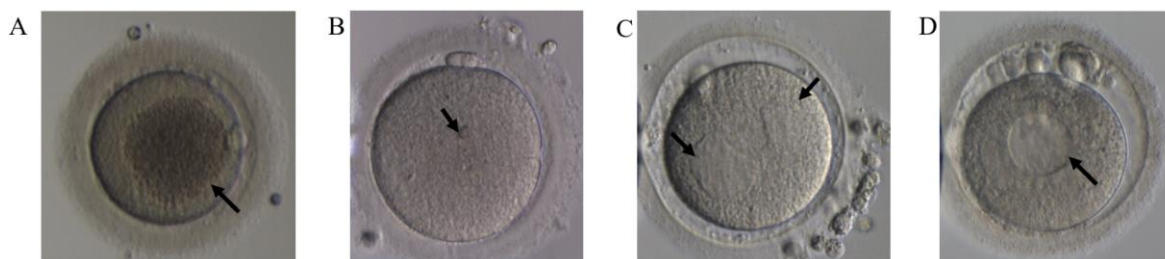
❖ **Đánh giá chất lượng bào tương chất**

Độ mịn bào tương: Sự hiện diện của các quầng hạt thô là một trong những yếu tố có thể ảnh hưởng đến kết quả thụ tinh và sự phát triển phôi. Tùy theo độ dày đặc của quầng hạt bào tương thô từ dạng nhẹ (Gran 1) cho đến nghiêm trọng (Gran 4).

Thể vùi (Incls): Các thể vùi quan sát dưới kính hiển vi là các túi nhỏ dạng lipofuscin, được cho là phức hợp giữa lipid và vật liệu cô đặc, đậm màu từ bào tương [22]. Những thể vùi này khi có kích thước lớn ($>5\mu\text{m}$) có khả năng ảnh hưởng đến sự thụ tinh cũng như quá trình phát triển của phôi nang [23].

Lưới nội chất trơn (SER): SER là một thành phần bào quan của tế bào, ở dạng đĩa, có chức năng tổng hợp carbohydrate và lipid và đóng vai trò trung gian vận chuyển các sản phẩm từ lưới nội chất đến các cơ quan khác trong tế bào chất. Noãn trưởng thành sẽ có thể thụ tinh bình thường nếu không làm vỡ SER trong quá trình thao tác [24].

Không bào: Không bào là một dạng thể vùi hình cầu có màng bao quanh chứa đầy dịch cặn bã cần loại bỏ ra khỏi tế bào noãn. Các không bào lớn $>14\mu\text{m}$ thường gây ra bất lợi đối với tỉ lệ thụ tinh và quá trình phát triển của phôi [25]. Không bào xuất hiện sau giai đoạn 2PN có thể gây trở ngại đối với các mặt phẳng phân bào, dẫn đến giảm tỉ lệ tạo phôi nang.



Hình 1.6. Các bất thường chất lượng bào tương chất (Nguồn: HP Fertility). (A) Gran 4. (B) Incls 2. (C) SER 4. (D) VAC 4

❖ *Đánh giá chất lượng màng trong suốt (ZP)*

Màng ZP bất thường hay gặp ở dạng màng hình bầu dục, màng kép, ZP quá dày hoặc quá mỏng. Độ dày ZP 13-15 μ m được coi là bình thường, nếu kích thước nhỏ hơn ZP được xem là mỏng, các trường hợp còn lại được xem là ZP dày [26, 27].

1.2.2.4. *Cơ chế hình thành lệch bội ở noãn*

Các con đường phân chia giảm nhiễm khác nhau được cho là góp phần vào nguyên nhân gây ra tình trạng lệch bội ở tế bào trứng. Sự không phân ly xảy ra khi các nhiễm sắc thể tương đồng hoặc các nhiễm sắc tử chị em không thể phân tách tương ứng trong kỳ giữa I hoặc kỳ giữa II, dẫn đến tăng hoặc giảm nhiễm sắc thể [28]. Ngoài ra, một số nghiên cứu đã báo cáo rằng lệch bội trong kỳ giữa I là kết quả của sự phân tách sớm nhiễm sắc tử chị em của một nhiễm sắc thể tương đồng và sự phân chia ngẫu nhiên của các nhiễm sắc thể đơn [29-31]. Các phân tích về các thể cực của noãn bào cho thấy các lỗi phân chia giảm nhiễm do sự phân tách nhiễm sắc tử chị em sớm xảy ra thường xuyên hơn so với các lỗi do sự không phân ly nhiễm sắc thể gây ra [32, 33]. Gần đây, kiểu phân ly nhiễm sắc thể thứ ba góp phần gây ra lệch bội, được gọi là phân ly ngược đã được báo cáo [34]. Trong trường hợp này, các nhiễm sắc tử chị em của cả hai nhiễm sắc thể tương đồng tách ra ở kỳ giữa I dẫn đến một noãn lưỡng bội có một nhiễm sắc tử chị em từ mỗi nhiễm sắc thể tương đồng thay vì cả hai nhiễm sắc thể từ một nhiễm sắc thể tương đồng. Các nhiễm sắc tử chị em này vẫn không liên kết và có thể không xếp thẳng hàng với trục chính trong kỳ giữa II hoặc trải qua sự phân chia ngẫu nhiên ở kỳ sau II [35]. Sự phân tách nhiễm sắc tử chị em sớm và phân ly ngược không phải lúc nào cũng dẫn đến lệch bội và một số tế bào trứng vẫn có số lượng nhiễm sắc thể chính xác ở cuối kỳ giữa II. Thật vậy, gần đây đã có báo cáo rằng 78% trứng có phân ly ngược ở kỳ giữa

II phân tách chính xác [36]. Các tác giả tương tự đã chứng minh rằng sự không phân ly trong kỳ giữa I giảm theo tuổi phụ nữ, sự phân tách nhiễm sắc tử chị em sớm tăng tuyến tính theo tuổi, trong khi phân ly ngược tăng chủ yếu theo tuổi mẹ cao [36]. Do đó, tần số tương đối của ba kiểu phân chia này trong quá trình giảm phân hình thành giao tử cái dẫn đến biểu hiện lệch bội ở tế bào trứng người và phôi tiền làm tổ.

1.3. BẢO QUẢN LẠNH NOÃN

1.3.1. Định nghĩa

Trữ lạnh noãn là quá trình thay đổi từ nhiệt độ sinh lý 37°C xuống -196°C trong nitơ lỏng, làm ngưng trệ tất cả các hoạt động sinh học của tế bào sống, duy trì khả năng tồn tại của noãn cho việc sử dụng trong tương lai.

1.3.2. Các phương pháp trữ lạnh và rã đông noãn

Trữ lạnh noãn được phát triển từ phương pháp hạ nhiệt độ chậm cho đến gần đây nhất là phương pháp thủy tinh hóa, chúng đều có những tác động đến hoạt động chức năng sau này của noãn và ảnh hưởng đến khả năng phát triển sau rã đông [37]. Hai phương pháp đều bao gồm các bước chính sau: sử dụng chất bảo vệ đông lạnh, làm lạnh, cất trữ, rã đông. Sự khác biệt chủ yếu là ở sử dụng chất bảo vệ đông lạnh (CPA) và quá trình làm lạnh.

1.3.2.1. Hạ nhiệt độ chậm

Trường hợp sinh sống đầu tiên từ noãn trữ lạnh bằng phương pháp hạ nhiệt độ chậm được báo cáo vào năm 1986 [38]. Trong phương pháp này, trước khi giảm nhiệt độ tế bào xuống dưới 0°C, noãn sẽ được cho tiếp xúc với môi trường có chứa CPA nồng độ 1,0-1,5 mol/L để làm mất nước nội bào. Người ta chỉ sử dụng một chất bảo vệ đông lạnh như propanediol (PROH), dimethylsulfoxide (DMSO) hay ethylene glycol. Do tính thấm qua màng của nước cao hơn CPA nên nước ra khỏi tế bào nhanh hơn CPA đi vào tế bào khiến ban đầu thể tích tế bào giảm sau đó sẽ phục hồi dần dần lại. Giai đoạn mất nước thứ hai diễn ra khi cho noãn tiếp xúc với môi trường có CPA ban đầu kết hợp với một số CPA không có khả năng thấm qua màng tế bào, thường là sucrose hay các oligosaccharide khác. Sau đó noãn được làm lạnh xuống dưới 0°C.

Ở nhiệt độ -30°C đến -40°C, khi nước nội bào đã gần như được loại bỏ và hầu hết nước ngoại bào đã chuyển thành tinh thể đá, noãn và dụng cụ chứa

được nhúng trực tiếp vào ni tơ lỏng và lưu giữ ở nhiệt độ -196°C . Quá trình rã đông nên được tiến hành ở tốc độ cao để hạn chế sự lớn lên của các tinh thể đá nội bào đến kích thước có thể làm tổn thương tế bào noãn. Quá trình rã đông noãn diễn ra với nguyên lý hoàn toàn ngược lại trữ lạnh, trong đó, quá trình bù nước phải diễn ra theo từng bước một với nồng độ CPA giảm dần. Trong thời gian qua, nhiều nghiên cứu được thực hiện nhằm cải thiện hiệu quả của trữ lạnh noãn. Năm 2001, Fabbri và cộng sự cho thấy nếu tăng nồng độ sucrose lên 0,3 M và tăng thời gian tiếp xúc của noãn với môi trường trữ lạnh lên 15 phút thì tỉ lệ sống sau rã đông cải thiện đáng kể (82% so với 60%, $p < 0,05$) [39].

1.3.2.2. Thủy tinh hoá

Trường hợp có thai và sinh sống đầu tiên từ noãn trữ lạnh bằng thủy tinh hóa được báo cáo vào năm 1999 [40]. Thủy tinh hóa dựa vào khả năng làm lạnh cực nhanh thông qua sự tiếp xúc trực tiếp của môi trường thủy tinh hóa (chứa CPA nồng độ cao) với ni tơ lỏng. Tuy nhiên, để đạt được trạng thái này, tốc độ làm lạnh phải rất nhanh và nồng độ CPA tăng đáng kể so với phương pháp hạ nhiệt độ chậm. Các CPA sử dụng trong phương pháp thủy tinh hóa cũng tương tự phương pháp hạ nhiệt độ chậm. Tuy nhiên, do nồng độ CPA cao nên người ta ưu tiên chọn CPA có độc tính thấp và thấm qua màng tế bào tốt. Ethylene glycol trở thành thành phần chuẩn trong phác đồ trữ lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa, đồng thời phối hợp với một hay hai CPA không thấm qua màng tế bào khác để làm giảm độc tính của từng loại CPA nếu sử dụng riêng lẻ. CPA không thấm màng thường được chọn là sucrose [41].

Một cách khác để hạn chế tổn thương do độc tính của CPA là cho noãn tiếp xúc với môi trường có nồng độ CPA tăng dần. Môi trường thứ nhất thường có nồng độ CPA 20-50% so với môi trường thứ hai. Noãn tiếp xúc với môi trường thứ nhất khoảng 5-15 phút và với môi trường thứ hai từ vài chục giây đến một phút trước khi môi trường và noãn được nhúng trực tiếp vào ni tơ lỏng. Tuy thời gian tiếp xúc với môi trường ngắn, nhưng do nồng độ thẩm thấu của môi trường cao đủ để kéo nước ra khỏi tế bào, tránh hình thành tinh thể đá nội bào. Mặt khác, thời gian tiếp xúc ngắn giúp hạn chế CPA vào tế bào, làm giảm độc tính và các khó khăn trong việc lấy CPA ra khỏi tế bào trong quá trình rã đông [42].

Hiệu quả của một chu kỳ trữ lạnh – rã đông noãn có thể được đánh giá qua tỉ lệ noãn sống sau rã đông, tỉ lệ tạo phôi, tỉ lệ mang thai và trong điều kiện lý tưởng là tỉ lệ trẻ sinh sống. Năm 2006, Oktay và cộng sự đã tiến hành một phân tích gộp để so sánh hiệu quả của hạ nhiệt độ chậm so với thủy tinh hóa trong trữ lạnh noãn người, các số liệu ban đầu cho thấy thủy tinh hóa có khả năng cải thiện cơ hội thành công [43]. Trong một nghiên cứu ngẫu nhiên có nhóm chứng, Cao và cộng sự cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ noãn sống sau rã đông giữa hai nhóm noãn trữ lạnh bằng hạ nhiệt độ chậm và thủy tinh hóa (61% so với 91,8%, $p < 0,01$) [44]. Tỉ lệ thụ tinh ở hai nhóm là tương đương nhưng tỉ lệ phôi phân chia ở nhóm hạ nhiệt độ chậm là 54,4%, thấp hơn so với 78% ở nhóm thủy tinh hóa. Kết quả cũng cho thấy tỉ lệ phôi có chất lượng tốt và tỉ lệ hình thành phôi nang cao hơn đáng kể ở nhóm sử dụng phương pháp thủy tinh hóa khi trữ lạnh. Một báo cáo của Cobo và cộng sự năm 2010 cho thấy trên 50% các trung tâm IVF tại Mỹ có triển khai thường quy trữ lạnh noãn, trong đó khoảng 2/3 chu kỳ là thủy tinh hóa [45]. Với lợi thế về hiệu quả cao hơn cũng như chi phí ban đầu thấp, thủy tinh hóa đang ngày càng được khuyến khích áp dụng trong trữ lạnh, nhất là trữ lạnh noãn.

1.3.3. Các nghiên cứu về tác động của quá trình trữ rã đối với noãn

❖ *Tiếp xúc với tác động của CPA và sốc thẩm thấu*

Trong hai thập kỷ qua, một số quy trình thủy tinh hóa tế bào trứng, các dụng cụ lưu trữ, các phương pháp hạ nhiệt độ, bảo quản và rã đông đã được đề cập và bàn luận [41]. Các quy trình này khác nhau về nồng độ và độ pha loãng các loại chất bảo quản lạnh (EG, DMSO, propylene glycol-PrOH, sucrose và trehalose) [46].

Cho đến nay, một trong những quy trình được sử dụng nhiều nhất để thủy tinh hóa tế bào trứng ở người là sự kết hợp của 15% DMSO (2,1 M), 15% EG (2,7 M) và 0,5 M sucrose (hoặc trehalose) trong thể tích tối thiểu (1 μ l) [47], và những thay đổi về độ thẩm thấu cực đại gặp phải trong quá trình tiếp xúc và loại bỏ CPA được sử dụng trong quá trình thủy tinh hóa và rã đông có thể được dự đoán trước. Trong quy trình bảo quản lạnh này, sự thay đổi áp suất thẩm thấu có thể thay đổi từ 280 mOsM (độ thẩm thấu của môi trường nuôi cấy) sang 2700 mOsM (độ thẩm thấu của dung dịch cân bằng) trong pha cân bằng. Độ thẩm thấu tăng lên đáng kể lên đến 5600 mOsM của dung dịch thủy tinh hóa

trước khi tế bào trứng được đưa dụng cụ chứa và nhúng vào nitơ lỏng. Trong quá trình làm ấm, những thay đổi thẩm thấu đột ngột được đảo ngược, với sự pha loãng nhanh chóng từ 5600 mOsM đến 1280 mOsM trong dung dịch rã đông và sau đó là hai bước khử CPA thay thế bằng phân tử nước với áp suất thẩm thấu lần lượt là 780 mOsM và 280 mOsM. Trong suốt quá trình làm lạnh – rã đông, màng tế bào của tế bào trứng phải có đủ độ bền để chịu được sự thẩm thấu hai chiều của dung dịch qua màng tế bào một cách đột ngột. Việc thủy tinh hóa tế bào trứng có thể thực hiện được phần lớn là do tế bào trứng có thể chịu được sự dịch chuyển chất lỏng mạnh và nhanh mà không bị xẹp xuống.

Cũng quan trọng như các loại CPA, các điều kiện tiếp xúc với CPA có thể ảnh hưởng đến chức năng và khả năng sống sót của tế bào, với các yếu tố như nồng độ, nhiệt độ tiếp xúc và thời gian tiếp xúc là các biến số quan trọng. Tuy nhiên, không phải tất cả CPA đều hoạt động tốt như nhau đối noãn bào. Điều này có thể xuất phát từ sự cân bằng giữa tính thấm của CPA kết hợp với kích thước và tính thấm đặc biệt của màng tế bào trứng cũng như độc tính của CPA. Sử dụng duy nhất một chất bảo quản lạnh thẩm thấu với nồng độ cao có thể gây chết tế bào [48]. Để loại bỏ những tác động tiêu cực từ CPA, một số phương pháp đã được triển khai và tích hợp vào các quy trình thủy tinh hóa tế bào trứng. Nhiều chất bảo quản lạnh đã được sử dụng kết hợp ở nồng độ thấp hơn để cải thiện độc tính của từng chất bảo quản lạnh đồng thời đạt được dung dịch có độ nhớt cao. Hiện nay, phương pháp thủy tinh hóa tế bào trứng ở người được sử dụng nhiều nhất là sử dụng kết hợp EG và DMSO để đạt được nồng độ thấp nhất cần thiết từ mỗi CPA riêng lẻ [49-51].

❖ *Thay đổi siêu cấu trúc*

Sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) cho phép phát hiện những thay đổi về siêu cấu trúc sau quá trình thủy tinh hóa – rã đông trong tế bào trứng ở giai đoạn kỳ giữa II. Những thay đổi về siêu cấu trúc chủ yếu liên quan đến việc tăng không bào, mạng lưới nội chất trơn của ty thể (M-SER) kết hợp với phức hợp ty thể-túi (MV) và các hạt vỏ (CG) [52]. Không bào xuất hiện trong tế bào trứng sau thủy tinh hóa cũng có thể được tạo ra từ ty thể bị biến đổi, sưng tấy hoặc từ sự hợp nhất của các CG thoái hóa, liên quan đến sự mất đi đáng kể hàm lượng hạt đậm đặc electron. Không bào ngoại vi cũng có thể bắt nguồn từ sự xâm lấn của noãn bào và/hoặc cụm túi nội bào hình thành trong vỏ tế bào trứng, bởi nó chỉ xuất hiện ở tế bào trứng khi tiếp xúc với chất bảo quản lạnh

[53]. Không bào cũng hiện diện trong các tế bào trứng quá trưởng thành hoặc trứng thoái hóa, trong khi ở các tế bào trứng trưởng thành tươi có rất ít hoặc hầu như không có không bào. Do đó, sự xuất hiện của không bào trong tế bào trứng thủy tinh hóa có thể được coi là một dạng tổn thương cấu trúc như một phản ứng không đặc hiệu của tế bào trứng đối với tổn thương lạnh và/hoặc áp suất thẩm thấu.

Các liên kết tổng hợp được xác định rõ ràng giữa ty thể và màng tế bào chất được tìm thấy một cách đặc trưng trong tế bào trứng trưởng thành ở người, và được đặt gọi là tập hợp M-SER và phức hợp MV. Các tập hợp M-SER này có thể điều chỉnh nồng độ canxi và sản xuất ATP của ty thể, do đó có khả năng góp phần điều chỉnh các đường dẫn truyền tín hiệu phụ thuộc canxi khi thụ tinh [54-56]. Do đó, những rối loạn về hình thái và chức năng của các tập hợp M-SER và phức hợp MV có thể dẫn đến giảm khả năng thụ tinh của tế bào trứng. Vì cả tập hợp M-SER và phức hợp MV đều có thể biến đổi lẫn nhau nên đây là một quá trình tái cấu trúc màng động rất nhạy cảm với những thay đổi của môi trường [57]. Tế bào trứng người sau khi thủy tinh hóa thường xuất hiện các tập hợp M-SER điển hình, tương tự về kích thước, hình dạng và vị trí với các kết quả quan sát được trong đối chứng mới.

Các CG là các bào quan có màng bao quanh, có nguồn gốc từ Golgi, được hình thành trong giai đoạn đầu của quá trình phát triển tế bào trứng và chứa glycosaminoglycan, protease, axit phosphatase và peroxidase. Khi thụ tinh, một lượng lớn CG được tế bào trứng hoạt hóa vào khoang quanh tế bào (PVS), dẫn đến sự cứng lại của màng trong suốt (ZP) giúp ức chế sự xâm nhập của nhiều tinh trùng vào tế bào trứng cùng một lúc. Sự chuyên tiếp canxi khi thụ tinh có liên quan đến việc kích hoạt phản ứng tổng hợp CG với tế bào trứng, dẫn đến giải phóng CG vào PVS. Sự giải phóng CG sớm đã được phát hiện trong quá trình thủy tinh hóa-rã đông và điều này chỉ ra rằng việc kích hoạt tế bào trứng sớm có thể xảy ra sau quá trình bảo quản lạnh [54].

❖ *Tác động tới trực tế bào trứng*

Trực giảm phân cực kỳ nhạy cảm với nhiệt độ thấp. Trong quá trình bảo quản lạnh tế bào trứng, trực noãn bào không chỉ tiếp xúc với nhiệt độ thấp mà còn có thể bị hư hỏng do sự hình thành các tinh thể băng. Trong mô hình thí nghiệm trên chuột, người ta đã chỉ ra rằng quá trình thủy tinh hóa có thể làm xáo trộn chức năng điểm kiểm tra sự lắp ráp trực chính trong tế bào trứng của

chuột thông qua việc kích hoạt lysosome cathepsin B [58]. Một số nghiên cứu chuyên sâu đã chỉ ra rằng cả trực tế bào trứng của chuột và người đều rất nhạy cảm với nhiệt độ thấp bởi sự khử polyme nhanh chóng khi tiếp xúc với nhiệt độ dưới mức sinh lý [59-61].

❖ *Noãn tự hoạt hoá*

Nguy cơ tiềm ẩn với việc bảo quản lạnh tế bào trứng là gây ra hiện tượng kích hoạt tế bào trứng. Sự thụ tinh bắt đầu từ điễm tinh trùng xâm nhập và lan truyền Ca^{2+} dạng sóng khắp toàn bộ tế bào trứng. Mặc dù sự gia tăng Ca^{2+} phần lớn là do sự giải phóng các ion canxi từ nguồn dự trữ bên trong tế bào, lượng Ca^{2+} tăng cao này cũng có thể bắt nguồn từ môi trường bên ngoài hoặc từ sự kết hợp của cả hai. Sự gia tăng Ca^{2+} cũng có thể gây ra hiện tượng xuất bào CG. Sau đó, các CG sẽ biến đổi cấu trúc của ZP và màng bào tương để tinh trùng không thể liên kết hoặc duy trì liên kết với tế bào trứng. Tuy nhiên, nếu sự gia tăng Ca^{2+} này được kích hoạt sớm ở tế bào trứng trưởng thành bởi các yếu tố môi trường, nó có thể gây ra tự hoạt hóa khiến tế bào trứng không thể thụ tinh. Tương tự như vậy, các chất bảo quản lạnh thường được sử dụng trong quá trình thủy tinh hóa, DMSO và EG, có thể gây ra sự gia tăng lớn về nồng độ canxi nội bào trong tế bào trứng trưởng thành của chuột [62].

❖ *Tính toàn vẹn của deoxyribonucleic acid (DNA)*

Mặc dù hầu hết các phương pháp thủy tinh hóa tế bào trứng thành công đều yêu cầu sử dụng nồng độ CPA cao, nhưng một số hợp chất CPA này có thể tự gây ra tác dụng độc hại, chẳng hạn như tổn thương DNA. Ba CPA thường được sử dụng trong phương pháp thủy tinh hóa là EG, DMSO và PrOH đã được đánh giá về tác dụng gây độc gen trong tế bào soma và tế bào trứng. Người ta đã chứng minh rằng nồng độ PrOH cao (7,5 và 15%) gây ra tổn thương DNA đáng kể ở tế bào trứng chuột bất kể thời gian tiếp xúc với CPA [63]. Quá trình thủy tinh hóa tế bào trứng bằng PrOH gây ra tổn thương DNA nhiều hơn đáng kể so với các phương pháp thủy tinh hóa EG và/hoặc DMSO [63]. Các cơ chế gây ra độc tính gen của các chất bảo quản lạnh vẫn đang được xác định và do đó chúng ta nên thận trọng khi chọn CPA cho quá trình thủy tinh hóa tế bào trứng cho đến khi có thêm nghiên cứu về độc tính CPA và đánh giá dài hạn.

❖ *Sự cứng lại của màng ZP sau quá trình đông rã*

Một vấn đề tiềm ẩn hiện nay với đông lạnh tế bào trứng là gây ra một sự kiện kích hoạt, làm cứng màng trong suốt, có thể ảnh hưởng đến quá trình làm

tổ. Sự cứng lại của ZP được tạo ra do sự kết hợp của các hạt vỏ với màng tế bào và giải phóng các thành phần của chúng vào các lớp màng trong của màng trong suốt. Sự hợp nhất màng tế bào phụ thuộc vào canxi và thường được kích hoạt bởi sự gia tăng canxi nội bào được bắt đầu bởi sự hợp nhất giữa tinh trùng và trứng. Sau khi xâm nhập vào noãn bào, tinh trùng kích hoạt một loạt dao động canxi. Sự gia tăng canxi làm cho các hạt vỏ não hợp nhất với màng sinh chất và giải phóng các thành phần của chúng vào các lớp màng trong của ZP [64]. Các enzym phân giải protein nhắm vào các protein liên kết với tinh trùng để ngăn không cho tinh trùng tiếp tục thụ tinh với trứng. Kỹ thuật tiêm tinh trùng vào tế bào chất (ICSI) có thể khắc phục sự cứng lại của màng ZP, nhưng thực tế là trứng đã trải qua phản ứng hạt vỏ cho thấy tế bào trứng đã được kích hoạt nhân tạo trước khi thụ tinh thực sự.

❖ *Tác động của quá trình thủy tinh hóa tế bào trứng đến biểu hiện gen*

Các mô hình nghiên cứu trên bò và lợn tập trung vào các yếu tố chết theo chu trình, biểu hiện của gen BAX tiền chết theo chu trình hầu hết được điều chỉnh tăng lên và gen BCL2 chống chết theo chu trình được điều hòa giảm sau quá trình thủy tinh hóa tế bào trứng trưởng thành [65-67]. Tuy nhiên, một số nghiên cứu chỉ ra không tìm thấy sự khác biệt trong biểu hiện gen liên quan đến chết theo chu trình sau quá trình rã đông bằng phương pháp thủy tinh hóa.

Trong các mô hình nghiên cứu trên bò, một nghiên cứu gần đây đã báo cáo sự biểu hiện quá mức của gen Eg5 liên quan đến phân chia tế bào và gen p53 liên quan đến tế bào chết theo lập trình [68], trong khi một nghiên cứu khác mô tả sự giảm biểu hiện của CD9 sau quá trình thủy tinh hóa, có khả năng dẫn đến khả năng thụ tinh giảm.

1.4. CÁC NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG CỦA QUÁ TRÌNH TRỮ RÃ ĐỐI VỚI KẾT QUẢ PHÔI HỌC VÀ LÂM SÀNG

1.4.1. Kết quả phôi học

Tại Việt Nam, một số nghiên cứu đã được thực hiện đánh giá kết quả phôi học của noãn rã đông với phương pháp thủy tinh hoá. Nghiên cứu của Lê Thị Thanh Huyền và cộng sự (2018) đánh giá biến đổi hình thái noãn và khả năng phát triển của noãn trữ lạnh bằng phương pháp thủy tinh hoá cho kết quả tỉ lệ noãn sống sau rã đông 89,09%, tỉ lệ thụ tinh 71,28%, tỉ lệ phôi tốt ngày 3 là 38,71% [7]. Một nghiên cứu khác của Lê Thụy Hồng Khả và cộng sự (2020)

báo cáo kết quả đông lạnh noãn ở bệnh nhân điều trị thụ tinh trong ống nghiệm với tỉ lệ noãn sống sau rã đông đạt $95,59 \pm 13,60\%$, tỉ lệ thụ tinh $78,96 \pm 24,88\%$ [8].

Hầu hết các nghiên cứu về hiệu quả của quá trình thủy tinh hóa tế bào trứng đã được thực hiện bằng cách sử dụng trứng của người hiến tặng với chất lượng trứng được mong đợi là gần tối ưu. Rất ít nghiên cứu sử dụng tế bào trứng tự thân để so sánh các chu kỳ được thực hiện với trứng tươi và thủy tinh hóa. Kết quả là, chúng ta biết rất ít về kết quả thủy tinh hóa khi sử dụng tế bào trứng tự thân ở bệnh nhân vô sinh. Tuy nhiên, một nghiên cứu từ Ý dường như cũng có kết quả tương tự với tế bào trứng được thủy tinh hóa. Trong giai đoạn 2004–2009, các phòng khám IVF ở Ý bị hạn chế số lượng trứng được thụ tinh. Luật cũng cấm bảo quản lạnh phôi nhưng không cấm việc bảo quản lạnh tế bào trứng [69]. Chỉ ba tế bào trứng có thể được thụ tinh trong các chu kỳ IVF mới, nên các tế bào trứng dư phải được bảo quản lạnh để sử dụng sau hoặc loại bỏ. Hạn chế pháp lý này đã tạo ra cơ hội tự nhiên để so sánh kết quả của tế bào trứng tươi và đông lạnh phát sinh từ một lần lấy tế bào trứng và được thụ tinh với cùng một nguồn tinh trùng. Năm 2010, Ubaldi và cộng sự đã tiến hành một nghiên cứu thuần tập theo chiều dọc trong tương lai bằng cách sử dụng tỉ lệ thai diễn tiến cộng dồn thu được bằng cách thụ tinh noãn tươi và noãn thủy tinh hóa từ cùng một đoàn hệ làm thước đo cho kết quả chính. Các tác giả kết luận rằng thủy tinh hóa không có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng phát triển *in vitro*, phát biểu dựa trên kết quả về tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ noãn phát triển thành phôi chất lượng tốt giữa noãn tươi và noãn rã đông không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê [51].

Điều quan trọng khi nghiên cứu ảnh hưởng của quá trình thủy tinh hóa noãn bào là phải loại trừ các yếu tố gây nhiễu có thể ảnh hưởng đến hiệu quả lâm sàng của quá trình, ngoại trừ kỹ thuật thủy tinh hóa. Bên cạnh đó, một số yếu tố có thể ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi và kết quả lâm sàng, bao gồm chất lượng của giao tử (do tuổi mẹ, kích thích buồng trứng, chất lượng và nguồn gốc tinh trùng). Năm 2013, Chang và cộng sự báo cáo kết quả nghiên cứu điều tra tác động của quá trình thủy tinh hóa ở những bệnh nhân vô sinh với độ tuổi mẹ từ trung bình đến cao (30–39 tuổi) [70]. Những người tham gia đã đồng ý thủy tinh hóa một nửa số tế bào trứng của họ và sử dụng nửa còn lại (tế bào trứng anh chị em) làm nhóm đối chứng tươi. Các tế bào trứng được thủy

ting hóa và rã đông trong vòng <30 phút, đảm bảo điều kiện thụ tinh và nuôi cấy tương đương so với nhóm tươi trong cùng chu kỳ và khoảng thời gian. Tất cả điều kiện về chất lượng trứng, tinh trùng, thời điểm thu hồi trứng, tinh trùng được thực hiện trong cùng một ngày, các thao tác với phôi và giao tử được kiểm soát theo tiêu chuẩn để đảm bảo sự đồng bộ khi so sánh hai nhóm. Do tỉ lệ thoái hoá sau rã đông gần 20%, các tác giả đã báo cáo các kết quả lâm sàng là hàm số của số lượng tế bào trứng ban đầu trước khi đông lạnh chứ không phải là hàm số của số lượng tế bào trứng sống sót sau rã đông. Cách tiếp cận này ngăn chặn sự thiên vị đối với noãn thủy tinh hóa bằng cách đưa các noãn thoái hoá sau rã đông vào mẫu số. Mặc dù cách tính toán này đã tạo ra xu hướng tỉ lệ thụ tinh cao hơn ở nhóm tươi, tỉ lệ thụ tinh và phát triển phôi vẫn có thể so sánh về mặt thống kê giữa nhóm tươi và thủy tinh hóa. Kết quả cho thấy sự thụ tinh và phát triển phôi sớm (được xác định bằng tỉ lệ phôi chất lượng tốt ở ngày thứ 3 và tỉ lệ hình thành phôi nang) không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở trứng thủy tinh hoá so với nhóm đối chứng. Những kết quả này gợi ý mạnh mẽ rằng tác động tiêu cực tiềm tàng của quá trình thủy tinh hóa lên tế bào trứng có thể được giảm thiểu.

1.4.2. Kết quả sản khoa và chu sinh

Mặc dù, thủy tinh hóa là một cải tiến đáng kể so với đông lạnh chậm về hiệu quả bảo quản lạnh tế bào trứng tự thân [51, 70], vẫn chưa biết liệu quá trình thủy tinh hóa có gây ra tổn thương lâu dài hay không, biểu hiện ở sức khỏe theo dõi nhiều năm sau đó hoặc ở các thế hệ tiếp theo. Thủy tinh hóa đã trở thành “tiêu chuẩn vàng” trong chưa đầy một thập kỷ và không có nghiên cứu theo dõi lâu dài nào về sức khỏe trẻ em. Tương tự, kỹ thuật này còn quá mới để có bất kỳ dữ liệu nào về sự phát triển cho đến tuổi trưởng thành. Phân tích kết quả chu sinh cũng như sự phát triển lâu dài của trẻ sinh ra là cần thiết để loại trừ bất kỳ tác động bất lợi nào đối với trẻ sinh sống. Năm 2014, Cobo và cộng sự đã báo cáo một nghiên cứu với một nhóm số lượng lớn trẻ em được sinh ra sau khi sử dụng tế bào trứng thủy tinh hóa (1027 trẻ từ 804 trường hợp mang thai) và tế bào trứng tươi (1224 trẻ từ 996 trường hợp mang thai) [71]. Kết quả khả quan khi không có sự gia tăng các kết quả bất lợi về sản khoa và chu sinh ở trẻ được thụ tinh bằng tế bào trứng thủy tinh hoá khi so sánh với tế bào trứng tươi. Việc theo dõi lâu dài những đứa trẻ sinh ra từ tế bào trứng thủy tinh hóa

vẫn cần thiết để thiết lập sự an toàn chung của quy trình. Quá trình thụ tinh hóa trứng không những không ảnh hưởng xấu đến sự phát triển và sức khỏe của con cái sau giai đoạn sơ sinh mà còn cho thấy sự phát triển hoàn thiện về tinh thần và thể chất của trẻ được so sánh với dữ liệu của nhóm tham khảo trong nghiên cứu sau quá trình 6 năm theo dõi [72].

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Bệnh nhân thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm tại Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng trong giai đoạn 05/2021 – 08/2023 đáp ứng các tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ.

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

- Bệnh nhân có hồ sơ bệnh án lưu trữ đầy đủ thông tin,
- Bệnh nhân có noãn đã đông được tạo phôi tại cùng thời điểm với noãn tươi ở chu kỳ chọc hút noãn tươi sau cùng,
- Bệnh nhân có kết quả sàng lọc bất thường số lượng nhiễm sắc thể ở phôi giai đoạn tiền làm tổ (PGT-A),
- Vợ chồng có kết quả karyotype bình thường và không mắc các bệnh lý tâm thần, tim mạch.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- Bệnh nhân thực hiện thụ tinh bằng phương pháp IVF cổ điển,
- Vợ chồng vô sinh do yếu tố nam giới: tinh trùng được thu nhận từ thủ thuật, tinh dịch đồ kết luận SOAT [73],
- Bệnh nhân xin tinh trùng, noãn, phôi,
- Bệnh nhân có đông phôi ngày 3,
- Bệnh nhân không đáp ứng các tiêu chuẩn lựa chọn.

2.1.3. Thiết kế nghiên cứu

- Nghiên cứu hồi cứu: Số liệu nghiên cứu được thu thập sau khi bệnh nhân đã kết thúc chu kỳ điều trị. Các thông số về kết quả điều trị thụ tinh trong ống nghiệm bao gồm số lượng trứng tươi, số lượng trứng sống sau rã đông, số lượng phôi ngày 3, số lượng phôi nang, số lượng phôi được sàng lọc di truyền được hồi cứu thông qua Phiếu tổng kết phôi cuối chu kỳ thụ

tinh trong hồ sơ bệnh nhân. Kết quả sàng lọc bất thường nhiễm sắc thể được thu thập thông qua Phiếu kết quả phân tích ADN trong hồ sơ bệnh nhân. Các thông số về đặc điểm người mẹ được hồi cứu thông qua Phiếu khám sức khỏe sinh sản nữ trong hồ sơ bệnh án.

- Mô tả cắt ngang: Nghiên cứu cắt ngang từ tháng 05/2021 đến tháng 08/2023. Tất cả bệnh nhân thực hiện thụ tinh với noãn tươi và noãn rã tự thân trong khoảng thời gian trên được đưa vào nghiên cứu. Mỗi chu kỳ thụ tinh được thu thập thông tin một lần duy nhất vào thời điểm hồi cứu hồ sơ bệnh án và không theo dõi xuôi theo thời gian.

2.1.4. Cỡ mẫu và chọn mẫu

Tỉ lệ thụ tinh trung bình của noãn trữ - rã được sử dụng tính cỡ mẫu là một biến định lượng. Do đó, công thức của Yamane [74] được sử dụng để ước tính cỡ mẫu cho một giá trị trung bình với độ chính xác tuyệt đối.

Sử dụng công thức tính cỡ mẫu:

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha/2})^2 \times p(1-p)}{d^2}$$

Trong đó:

n: Cỡ mẫu tối thiểu

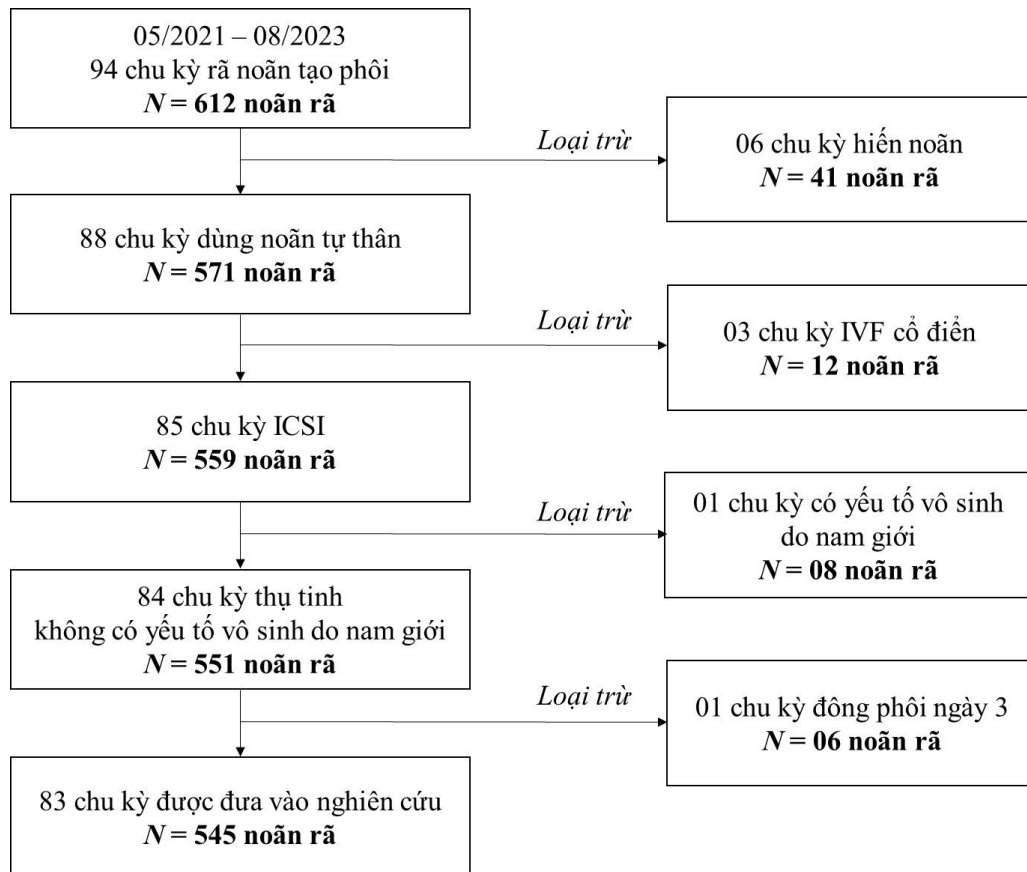
Z(1- α /2): Hệ số tin cậy

p: Tỉ lệ phôi nang lệch bội nhiễm sắc thể

d: Sai số tuyệt đối cho phép

Độ chính xác tuyệt đối (p) được sử dụng là tỉ lệ thụ tinh trung bình của noãn trữ - rã trong nghiên cứu của Joseph O. Doyle và cộng sự (2016) với giá trị là 0,695 [11]. Sử dụng độ tin cậy 95% và sai số tuyệt đối là 5%. Theo tính toán, cỡ mẫu tối thiểu cho nghiên cứu đánh giá kết quả thụ tinh trong ống nghiệm và kết quả sàng lọc bất thường số lượng nhiễm sắc thể ở phôi giai đoạn tiền làm tổ trên nhóm đối tượng trữ lạnh noãn là 76 noãn rã.

Trong giai đoạn từ tháng 05/2021 đến 08/2023, nghiên cứu của tôi ghi nhận được 83 chu kỳ tạo phôi với noãn rã đông và thực hiện sinh thiết phôi có kết quả PGT-A phù hợp với tiêu chuẩn lựa chọn (Xem Hình 2.1). Như vậy, số lượng noãn rã đông trong nghiên cứu này đã đảm bảo cỡ mẫu tối thiểu.



Hình 2.1. Sơ đồ lựa chọn mẫu trong nghiên cứu

2.2. HOÁ CHẤT VÀ THIẾT BỊ

2.2.1. Hoá chất

- Hoá chất thao tác với giao tử, phôi [75].
- Hoá chất tách noãn khỏi phức hợp OCC [76].
- Hoá chất nuôi cấy phôi [77]
- Hóa chất sinh thiết phôi và rửa phôi bào.
- Hoá chất đông và rã phôi noãn có chứa các chất bảo quản lạnh (CPA)

2.2.2. Vật tư, thiết bị

- Hệ thống tủ nuôi cấy tích hợp camera theo dõi phôi liên tục (timelapse)
- Hệ thống kính hiển vi đảo ngược và bộ vi tiêm đ ICSI và sinh thiết phôi
- Tủ thao tác IVF có bề mặt gia nhiệt Astec – Nhật Bản AITT có gắn kính hiển vi soi nổi SMZ1270 NIKON Nhật Bản sử dụng cho quy trình trữ rã phôi, noãn và quy trình rửa phôi bào sau sinh thiết phôi.
- Các vật tư trong IVF: ống đáy tròn, ống đáy nhọn, đĩa petri các kích thước, đĩa timelapse, đĩa 4 giếng, đầu côn có màng lọc, ống effendorf...

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Phương pháp trữ lạnh noãn/phôi

Quy trình trữ lạnh và rã đông noãn/phôi được thực hiện theo mô tả của Masashige Kuwayama [78].

- Bước 1. Noãn được tách khỏi tế bào hạt và tế bào vành tia xung quanh bằng hyaluronidase 80 IU/mL.
- Bước 2. Quy trình trữ lạnh bắt đầu với noãn được cân bằng trong môi trường ES chứa 7% EG (ethylene glycol), 7% DMSO (dimethyl sulfoxide) trong tối đa 15 phút trước khi được chuyển sang môi trường thủy tinh hoá (VS) chứa 14.5% EG, 14.5% DMSO, 0.5 M trehalose trong tối đa 90 giây. Noãn được chuyển lên dụng cụ chứa Cryotec với thể tích môi trường tối thiểu và nhúng trực tiếp vào hộp xốp chứa ni tơ lỏng và được lưu giữ trong bình lưu trữ mẫu.

2.3.2. Phương pháp rã đông noãn/phôi

- Bước 1. Quy trình rã đông được thực hiện với môi trường rã (TS) chứa 1.0 M trehalose được làm ấm đến 37°C ít nhất 1 giờ.
- Bước 2. Nhúng thật nhanh cọng phôi/noãn từ ni tơ lỏng vào TS cho tới khi noãn trên cọng nổi lên bề mặt môi trường. Sau 1 phút, noãn/phôi được chuyển sang và giữ trong môi trường trung hoà (DS) chứa 0.5 M trehalose trong 3 phút trước khi được chuyển sang môi trường tráng (WS1). Noãn ở trong WS1 trong 5 phút và trong WS2 1 phút.
- Bước 3. Chuyển noãn vào đĩa nuôi cấy, đánh giá hình thái dưới kính hiển vi.

2.3.3. Phương pháp vi tiêm tinh và nuôi cấy phôi

Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) được thực hiện với noãn trưởng thành (MII) sống sót sau quá trình rã đông. Noãn sau khi ICSI được nuôi cấy liên tục trong môi trường đơn bước trong tủ nuôi cấy 37°C sử dụng khí trộn có nồng độ 7% CO₂, 5% O₂.

2.3.4. Phương pháp đánh giá sự phát triển của phôi

2.3.4.1. Đánh giá hợp tử vào ngày 1 (17±1 giờ sau ICSI)

Noãn thụ tinh bình thường có hình cầu với 2 thể cực và 2 tiền nhân (pronuclei – PN) có màng bao riêng biệt.

2.3.4.2. *Đánh giá phôi phân chia vào ngày 3 (68±1 giờ sau ICSI)*

Bảng 2.1. Đánh giá hình thái và xếp loại chất lượng phôi ngày 3

Xếp loại	Số lượng phôi bào (phôi bào)	Độ phân mảnh bào tương chất (%)
Loại I	7 – 9	<10
Loại II	7 – 9	11 - 20
	6 hoặc > 9	0 – 20
Loại III	5	0 – 30
	> 5	25 – 30

2.3.4.3. *Đánh giá phôi nang vào ngày 5 (116±2 giờ sau thụ tinh) hoặc ngày 6 (140±2 giờ sau thụ tinh).*

Phôi được đánh giá dựa trên độ nở rộng của khoang phôi, khối tế bào nụ phôi (ICM) và lớp tế bào lá nuôi. Sau khi chấm điểm 3 yếu tố trên, phôi sẽ được xếp thành 3 loại dựa trên hình thái theo đồng thuận Alpha 2011 [12]:

- Loại I: 3/4/5/6 AA, AB, BA
- Loại II: 3/4/5/6 BB, AC, CA
- Loại III: 3/4/5/6 CC, BC, CB

Nếu độ nở rộng khoang phôi ≤ 2 thì chất lượng phôi sẽ bị hạ 1 bậc.

2.3.5. **Phương pháp sinh thiết phôi**

Sinh thiết được tiến hành trên lớp tế bào lá nuôi (TE) vào ngày 5 hoặc ngày 6 sau khi thụ tinh. Quy trình sinh thiết phôi được tiến hành với các bước cơ bản bao gồm: (1) sử dụng kính hiển vi đảo ngược có gắn kèm bộ vi thao tác và hệ thống laser để ngắt 2-3 tế bào TE ra khỏi phôi, (2) các tế bào TE sau khi sinh thiết được rửa qua 3 giọt môi trường đệm trước khi được đặt vào ống PCR, (3) các ống PCR chứa phôi bào được ghi mã sinh thiết phôi, (4) vận chuyển các mẫu phôi bào tới phòng xét nghiệm di truyền để thực hiện PGT-A [79].

2.3.6. Chuyển phôi trữ đông

Bệnh nhân sẽ được bác sĩ tư vấn và đưa ra quyết định lựa chọn phôi chuyển. Tiến hành rã phôi và chuyển vào tử cung của bệnh nhân. Theo dõi kết quả thụ thai bằng xét nghiệm máu định lượng β -hCG. Theo dõi thai kỳ bằng siêu âm.

Kết cục lâm sàng được ghi nhận bởi các biến số sau [80] :

- Có thai: kết quả xét nghiệm β -hCG dương tính ($>25\text{IU}$)
- Thai sinh hoá: không có túi thai trên hình ảnh siêu âm sau khi có.
- Thai lâm sàng: xuất hiện túi thai trên hình ảnh siêu âm.
- Thai diễn tiến: thai phát triển đến tuần tuổi thứ 12.
- Trẻ sinh sống: trẻ sinh ra có dấu hiệu của sự sống.

2.3.7. Phân tích số liệu nghiên cứu

2.3.7.1. Phương pháp thu thập số liệu

- Chất lượng phôi, noãn được đánh giá bằng hình ảnh phôi từ tủ nuôi cấy Timelapse hoặc quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi đảo ngược.
- Kết quả sàng lọc bất thường số lượng nhiễm sắc thể (PGT-A) và kết quả thai trên hồ sơ bệnh án tại Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng.
- Các biến số nghiên cứu chính gồm: (1) Số lượng noãn trữ đông, (2) Số lượng noãn sống sau rã đông, (3) Số lượng noãn thụ tinh, (4) Số lượng phôi hữu dụng, (5) Kết quả PGT-A, (6) các yếu tố người mẹ (tuổi, thời gian vô sinh, AMH, BMI).

2.3.7.2. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được mã hóa, thu thập và xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0. Kiểm định t-test được sử dụng để so sánh các giá trị trung bình. Sử dụng kiểm định χ^2 so sánh sự khác biệt giữa các tỉ lệ ở hai nhóm noãn tươi và noãn rã bao gồm tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi ngày 3, tỉ lệ tạo phôi nang, tỉ lệ phôi nguyên bội, tỉ lệ phôi lệch bội, tỉ lệ phôi khảm, tỉ lệ có thai, tỉ lệ thai sinh hoá, tỉ lệ thai lâm sàng, tỉ lệ thai diễn tiến, tỉ lệ trẻ sinh sống. Vùng dưới đường cong ROC (AUC) được sử dụng để xác định giá trị của yếu tố tiên lượng và chỉ số Youden ước tính chẩn đoán để xác định ngưỡng chẩn đoán có hay không có phôi nang nguyên bội. Tỉ suất chênh Odds ratio (OR) đánh giá mức tương quan. Các test

thống kê được kiểm định với sự khác biệt $P < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê. Các tỉ lệ được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỉ lệ thụ tinh bình thường} = \frac{\text{Số lượng hợp tử 2 PN}}{\text{Số lượng noãn được thụ tinh}} \times \frac{\text{Số lượng ca}}{\text{Số chu kỳ chuyển phôi}}$$

$$\text{Tỉ lệ có thai} = \frac{\text{có kết quả xét nghiệm } \beta - \text{hCG dương } (> 25\text{IU})}{\text{Số chu kỳ chuyển phôi}}$$

$$\text{Tỉ lệ thai sinh hóa} = \frac{\text{Số lượng ca **không** có túi thai trên siêu âm}}{\text{Số chu kỳ chuyển phôi}}$$

$$\text{Tỉ lệ thai lâm sàng} = \frac{\text{Số lượng ca có túi thai trên siêu âm}}{\text{Số chu kỳ chuyển phôi}}$$

$$\text{Tỉ lệ thai diễn tiến} = \frac{\text{Số lượng ca thai có tuổi thai } \geq 12 \text{ tuần}}{\text{Số lượng ca}} \times \frac{\text{Số chu kỳ chuyển phôi}}{\text{Số lượng ca}}$$

$$\text{Tỉ lệ trẻ sinh sống} = \frac{\text{có ít nhất 1 trẻ sinh ra có dấu hiệu sự sống}}{\text{Số chu kỳ chuyển phôi}}$$

2.4. VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU

- Nghiên cứu được sự cho phép của lãnh đạo Khoa Hỗ trợ Sinh sản, Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng và tuân theo các quy định về đạo đức trong nghiên cứu y sinh.
- Các văn bản pháp lý, quy trình lâm sàng, cận lâm sàng được thực hiện theo đúng quy định của pháp luật Việt Nam về thụ tinh trong ống nghiệm, sàng lọc phôi.
- Bệnh nhân đồng ý, tự nguyện ký đơn đề nghị thực hiện thụ tinh ống nghiệm, phiếu đề nghị phân tích di truyền phôi tiền làm tổ và được thông báo về mục đích nghiên cứu. Thông tin cá nhân của đối tượng nghiên cứu được bảo mật tuyệt đối.
- Quá trình đánh giá thụ tinh và chất lượng phôi đảm bảo không ảnh hưởng tới chất lượng phôi.
- Kỹ thuật sinh thiết phôi, tiêm tinh trùng vào bào tương noãn và PGT-A không ảnh hưởng đến sức khỏe của trẻ sơ sinh.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. ĐẶC ĐIỂM CHUNG CỦA ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Từ tháng 05/2021 đến tháng 08/2023, trung tâm Hỗ trợ sinh sản – Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng đã thực hiện 94 chu kỳ rã đông noãn với 88 chu kỳ sử dụng trứng tự thân. Áp dụng tiêu chuẩn loại trừ, 79 bệnh nhân với tổng cộng 83 chu kỳ thụ tinh có sử dụng noãn trữ rã thỏa tiêu chuẩn nhận được đưa vào nghiên cứu.

Bảng 3.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Các thông số đánh giá	Giá trị trung bình	Khoảng tin cậy 95%
Tuổi mẹ (năm)	37,7 ± 4,2	36,8 - 38,8
Thời gian vô sinh (năm)	2,9 ± 2,4	2,4 - 3,5
Chỉ số khối cơ thể (BMI)	21,8 ± 2,1	21,3 - 22,3
AMH (ng/mL)	1,53 ± 1,37	1,23 - 1,84
Số chu kỳ chọc hút trứng (chu kỳ)	2,9 ± 1,5	2,6 - 3,2
Số lượng trứng MII được tạo phôi mỗi chu kỳ thụ tinh (trứng)	5,2 ± 3,8	4,3 - 6,0

Đặc điểm nền của đối tượng trong nghiên cứu không thuộc nhóm tiên lượng tốt với tuổi trung bình của dân số nghiên cứu là 37,7 ± 4,2 tuổi; thời gian vô sinh kéo dài trung bình 2,9 ± 2,4 năm; dự trữ buồng trứng thấp với giá trị AMH trung bình 1,53 ± 1,37. Số chu kỳ chọc hút trứng trung bình 2,9 ± 1,5 thấp tương ứng với số lượng trứng trung bình được tạo phôi mỗi chu kỳ ở mức 5,2 ± 3,8.

Độ tuổi dân số trong nghiên cứu của tôi tương đồng với một số nghiên cứu của Goldman và cs., 2015 [81] và Doyle và cs., 2016 [11] thực hiện đánh giá kết quả trữ lạnh noãn với độ tuổi trung bình đều trên 35 tuổi.

Số lượng và chất lượng trứng giảm dần theo độ tuổi. Theo Hiệp hội Y học Sinh sản Hoa Kỳ, phụ nữ ở độ tuổi từ 35 trở lên được xem xét để thực hiện xét nghiệm đánh giá giảm dự trữ buồng trứng thông qua xét nghiệm AMH [82].

AMH đã được đánh giá là một yếu tố tiên lượng có độ chính xác cao cho khả năng đáp ứng buồng trứng [83]. Một số yếu tố có thể được sử dụng để đánh giá đáp ứng buồng trứng bao gồm AMH, đếm số nang có hóc đầu chu kỳ (AFC), hoặc môn FSH, trong đó AMH có độ chính xác cao nhất. Bệnh nhân đáp ứng buồng trứng kém có khả năng thu hồi trứng kém hơn, do đó, số lượng trứng được thực hiện thụ tinh thấp phù hợp với giá trị AMH trong nghiên cứu.

Phụ nữ càng lớn tuổi, số lượng trứng ít và chất lượng trứng càng kém là một trong những nguyên nhân chính dẫn đến thất bại khi thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm. Bệnh nhân có thể lựa chọn một trong hai phương án được đưa ra để cải thiện tỉ lệ thành công bao gồm thực hiện thụ tinh với số lượng trứng ít và đông phôi tích trữ trước khi thực hiện chuyển phôi, hoặc trữ lạnh noãn tích lũy và rã đông toàn bộ để thực hiện thụ tinh trong một chu kỳ ICSI. Phương án trữ lạnh noãn được xem là khả quan khi đáp ứng đồng thời hai mục tiêu là tiết kiệm chi phí thụ tinh và tăng số lượng phôi hữu dụng để sử dụng cho chuyển phôi.

Trong nghiên cứu của tôi, 97% (77/79) bệnh nhân có ít nhất 2 chu kỳ chọc hút trứng phù hợp với xu hướng tích lũy noãn thay vì tích lũy phôi giúp bệnh nhân giảm gánh nặng chi phí mà vẫn đạt được số lượng trứng mong muốn để thực hiện thụ tinh.

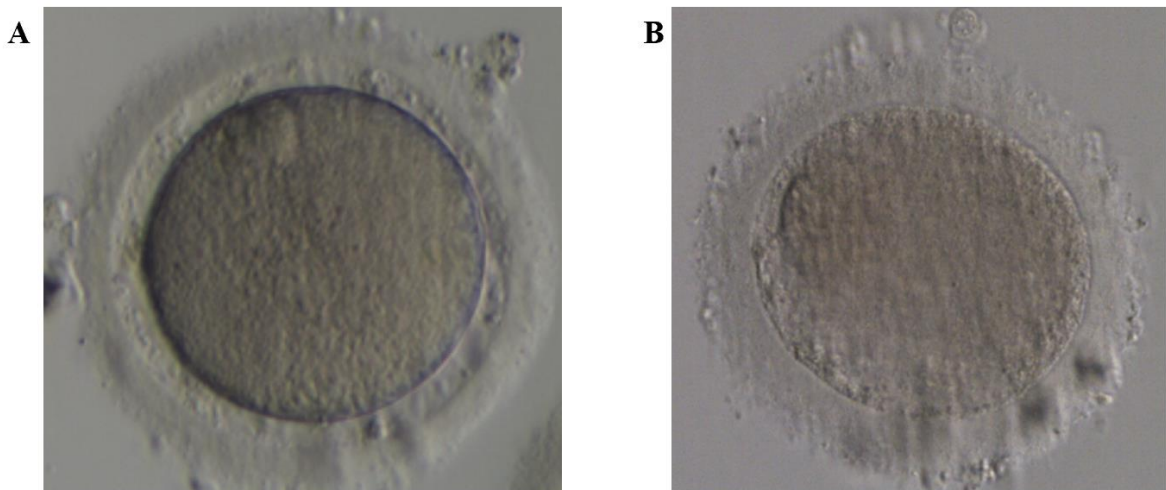
BMI là chỉ số được sử dụng để đánh giá tình trạng thừa cân/béo phì. Tỉ lệ béo phì ở phụ nữ trong độ tuổi sinh sản ngày càng tăng và có xu hướng trở nên nghiêm trọng, với gần một nửa phụ nữ trải qua IVF ở Hoa Kỳ bị thừa cân/béo phì. Bệnh nhân béo phì có nguy cơ cao mắc các biến chứng sản khoa và sơ sinh như tiểu đường thai kỳ, rối loạn tăng huyết áp khi mang thai, sinh mổ, thai chết lưu, thai to so với tuổi thai, dị tật bẩm sinh. Về kết quả điều trị thụ tinh trong ống nghiệm, thừa cân/béo phì trước đây được cho là có liên quan đến đáp ứng kém khi kích thích buồng trứng, chất lượng tế bào noãn và phôi thấp hơn, khả năng tiếp nhận nội mạc tử cung kém và tỉ lệ trẻ sinh sống thấp hơn. Nguy cơ sảy thai cũng đã được ghi nhận, ngay cả sau khi chuyển phôi nguyên bội, chứng tỏ rằng lệch bội có thể không phải là nguyên nhân chính gây sảy thai ở phụ nữ.

Trong nghiên cứu của tôi, giá trị BMI trung bình là $21,8 \pm 2,1$ và được định nghĩa là cân nặng bình thường theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO).

3.2. KHẢ NĂNG SỐNG SỐT CỦA NOÃN SAU RÃ ĐÔNG

Noãn sống sót sau rã đông là những noãn vẫn giữ được hình thái ban đầu: bào tương chất sáng màu tròn và mịn, có độ chiết quang khi thay đổi tiêu cự quan sát dưới kính hiển vi, màng ZP và màng bào tương có cấu trúc ổn định, không bị tổn thương.

Ngược lại, noãn thoái hoá sau rã đông có bào tương chất tối màu, màng bào tương vỡ, bào tương chất tràn ra xung quanh khoang quanh noãn làm mất khoang quanh noãn. Quan sát dưới kính hiển vi, noãn thoái hoá không còn cấu trúc không gian 3 chiều như noãn sống sót



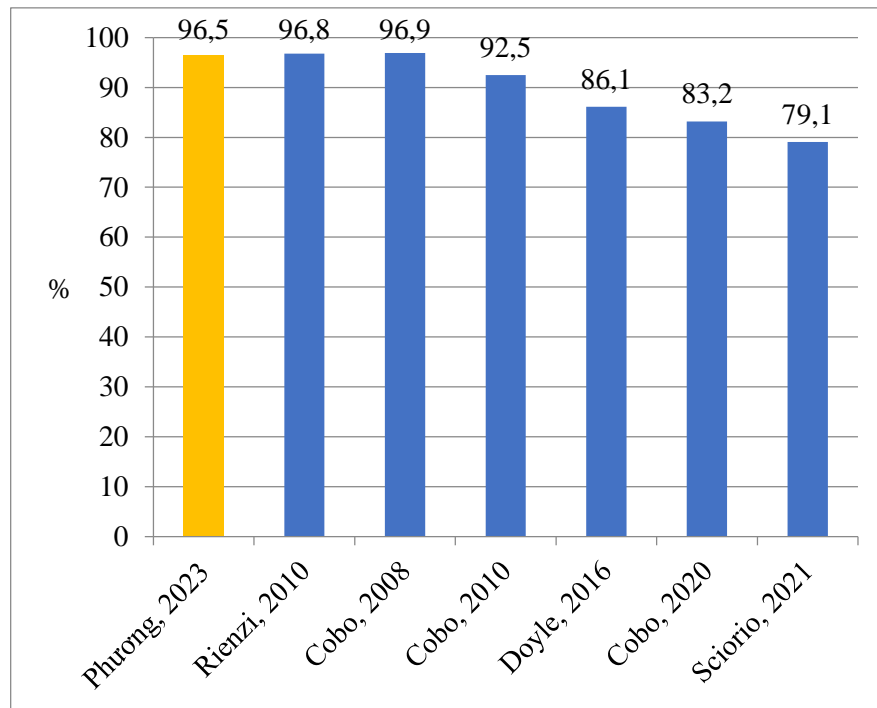
Hình 3.1. Phân biệt hình thái noãn sống sót và noãn thoái hoá sau rã đông (Nguồn: HP Fertility). (A) Noãn sống sót sau rã đông. (B) Noãn thoái hoá sau rã đông.

Bảng 3.2. Tỷ lệ noãn sống sót sau rã đông

Các chỉ số	Tổng	Giá trị trung bình	Khoảng tin cậy 95%
Số lượng noãn MII trữ đông (noãn)	565	$6,8 \pm 3,6$	6,0 - 7,6
Số lượng noãn MII sống sau rã đông (noãn)	545	$6,6 \pm 3,6$	5,8 - 7,3
Tỷ lệ noãn sống sau rã đông (%)		$96,5 \pm 7,6$	94,9 - 98,2

Tỷ lệ noãn sống sau rã đông trong nghiên cứu của tôi đạt trung bình 96,5%, tương đồng với các nghiên cứu thực hiện trữ noãn với phương pháp Cryotec hoặc Cryotop [45, 84, 85]. Bên cạnh đó, kết quả của tôi cao hơn so với 3 nghiên cứu của các tác giả Doyle và cs., 2016 [11], Cobo và cs., 2020 [10], Sciorio và cs., 2021 [86] khi các nghiên cứu này có tỷ lệ noãn sống sau rã đông đạt dưới 90%. Tỷ lệ noãn sống sau rã đông được duy trì ở mức trên 90% củng cố thêm cho xu hướng tích lũy noãn bằng phương pháp thủy tinh hoá đối với các bệnh nhân lựa chọn đông trứng.

Biểu đồ 3.1. So sánh tỉ lệ sống sót sau rã đông với các nghiên cứu khác



Năm 2010, Cobo và cộng sự thực hiện thử nghiệm ngẫu nhiên có đối chứng trên nhóm noãn tươi và noãn thủy tinh hoá sử dụng phương pháp Cryotop. Các CPA trong thành phần của môi trường thủy tinh hoá bao gồm 15% EG, 15% DMSO bổ sung 0,5 M sucrose và 20% SSS. Tỉ lệ noãn sống sót đạt 92,5% [45].

Năm 2016, Doyle và cộng sự sử dụng môi trường thủy tinh hoá có sự kết hợp của 20% SSS và 0,5 M sucrose tương tự nghiên cứu của tác giả Cobo và cộng sự với 1182 noãn rã đông từ 148 chu kỳ đông trứng của 137 bệnh nhân. Tỉ lệ noãn sống sót sau rã đông chỉ đạt 86,1% [11].

Năm 2010, Rienzi và cộng sự cũng thực hiện một nghiên cứu tương tự, tuy nhiên, 20% SSS trong của môi trường thủy tinh hoá được loại bỏ và chỉ sử dụng 0,5 M sucrose cho kết quả tỉ lệ sống sót tăng lên 96,8%.

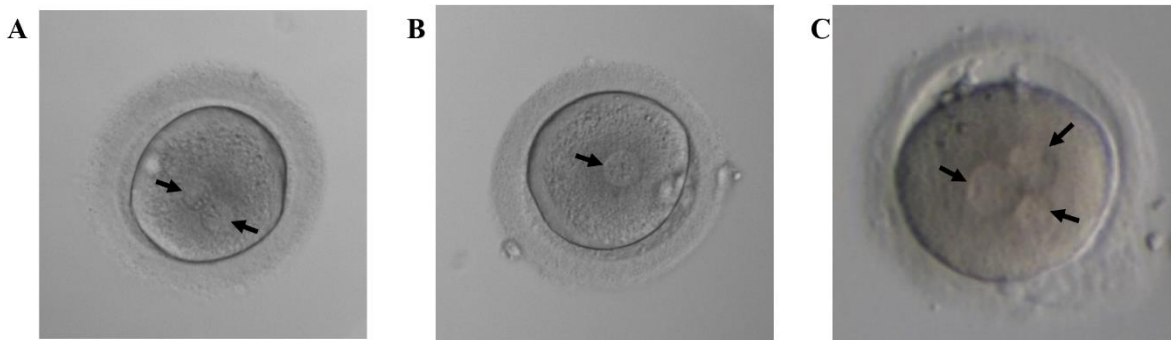
Trong nghiên cứu của tôi, sucrose và SSS được thay bằng 0,5 M trehalose với phương pháp Cryotec với hiệu quả rã đông noãn đạt 96,5%.

Các nghiên cứu về hiệu quả trữ rã noãn sử dụng môi trường thủy tinh hoá có chứa các CPA xuyên màng tương tự nhau (EG và DMSO) và chỉ khác biệt về thành phần và nồng độ của các CPA không xuyên màng (SSS, sucrose, trehalose). CPA không xuyên màng được bổ sung vào môi trường thủy tinh hoá có hiệu quả trong việc bảo tồn chức năng của màng, hạn chế tốc độ khử nước quá nhanh dẫn đến phá vỡ cấu trúc làm chết tế bào.

Cean và cộng sự (2013) đã so sánh độc tính của các CPA khi trữ đông trứng trưởng thành bằng việc đánh giá khả năng thụ tinh của chúng sau khi rã đông. Nhóm nghiên cứu kết luận khi trứng tiếp xúc với môi trường chứa sucrose 10% và sucrose 20% cho tỉ lệ thụ tinh lần lượt là 24% và 22,67%. Trehalose có độc tính thấp nhất khi tỉ lệ thụ tinh của trứng không giảm và không phụ thuộc vào thời gian tiếp xúc ở nồng độ 10% và 15%.

3.3. KẾT QUẢ PHÔI HỌC

3.3.1. Đặc điểm thụ tinh



Hình 3.2. Đặc điểm hình thái hợp tử thụ tinh (Nguồn: HP Fertility). (A) Hợp tử thụ tinh bình thường (2PN). (B) Hợp tử thụ tinh bất thường 1 PN. (C) Hợp tử thụ tinh bất thường 3 PN (đa thụ tinh)

Hợp tử thụ tinh bình thường được định nghĩa với sự xuất hiện của 2 tiền nhân, sự thụ tinh bất thường xảy ra khi hợp tử có 1 tiền nhân hoặc 3 tiền nhân (đa thụ tinh).

Nguyên nhân gây ra sự thụ tinh bất thường có thể từ việc noãn tự hoạt hoá mà không có sự thụ tinh của tinh trùng tạo ra hợp tử 1 PN. Hợp tử 3 PN có thể xuất hiện khi noãn được thụ tinh với nhiều tinh trùng cùng một lúc, bất thường trong giảm phân hoặc trực phân bào bị tổn thương trong quá trình thay đổi nhiệt độ dẫn đến giao tử lưỡng bội (2n).

Trong nghiên cứu của tôi, tỉ lệ thụ tinh bình thường được tính theo công thức sau:

Bảng 3.3. Tỷ lệ thụ tinh

Các thông số đánh giá	Noãn tươi (n = 72)	Noãn trữ (n = 83)	P value
Số lượng noãn MII tạo phôi (noãn)	410	545	
Số lượng noãn MII trung bình được tạo phôi (noãn)	4,9 ± 3,7	6,6 ± 3,6	0,005
Số lượng hợp tử 2PN (hợp tử)	323	409	
Tỷ lệ thụ tinh bình thường (%)	78,1 ± 2,3	75,5 ± 2,9	0,461

Số lượng noãn MII trung bình được tạo phôi ở nhóm noãn trữ-rã nhiều hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm noãn tươi ($P < 0,05$). Nguyên nhân có thể được giải thích bởi sự tích lũy tế bào trứng qua nhiều chu kỳ bảo quản lạnh, sau đó các tế bào trứng này được rã đông và thực hiện thụ tinh tại cùng một thời điểm với các trứng tươi ở chu kỳ chọc hút noãn cuối cùng, dẫn đến có sự khác biệt đáng kể về số lượng trứng được thụ tinh giữa hai nhóm noãn. Tuy nhiên, tỷ lệ thụ tinh bình thường ở hai nhóm là như nhau ($P > 0,05$).

Kết quả này tương đồng với nhiều nghiên cứu khác được thực hiện trước đó khi so sánh tỷ lệ thụ tinh giữa noãn rã và noãn tươi là không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê [11, 45, 81, 84, 85].

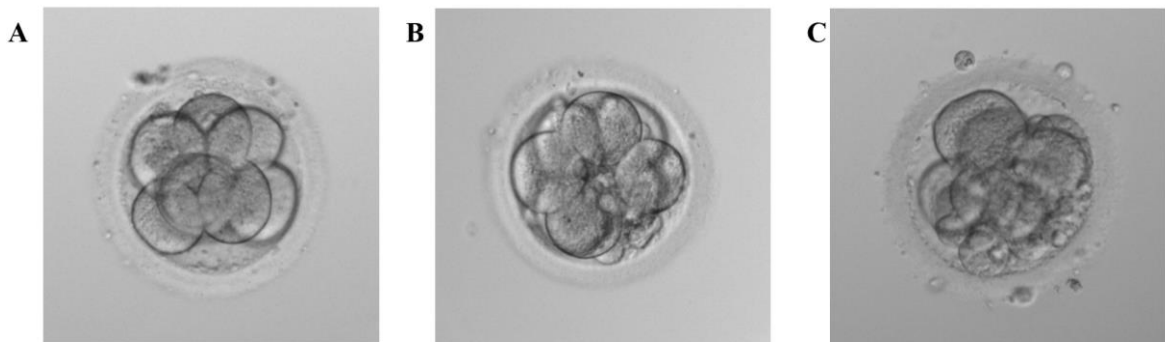
Xét riêng khả năng thụ tinh của noãn trữ, kết quả của tôi thấp hơn so với hai nghiên cứu của Deng và cs., 2015 [87] và Sciorio và cs., 2021 [86] có tỷ lệ thụ tinh lần lượt là 85,3% và 90,2%. Sự khác biệt này có thể được giải thích bởi đối tượng nghiên cứu trong hai nghiên cứu này có độ tuổi trung bình trẻ hơn so với nghiên cứu của tôi, lần lượt là 25 và 28 tuổi.

Như vậy, ảnh hưởng của quá trình thủy tinh hoá đến sự thụ tinh không còn là vấn đề đáng lo ngại. Kỹ thuật ICSI giúp giải quyết vấn đề xơ cứng của

màng trong suốt noãn bào sau quá trình biến đổi nhiệt độ trong bảo quản lạnh, giúp khả năng thụ tinh tương đồng giữa noãn tươi và noãn trữ rã.

3.3.2. Khả năng tạo phôi phân chia (ngày 3)

Phôi phân chia được đánh giá chất lượng hình thái vào ngày thứ 3 sau khi được thụ tinh. Phôi được xếp loại I, II, III dựa trên số lượng phôi bào và độ phân mảnh bào tương chất. Các phôi ngày 3 xếp loại I và loại II được coi là phôi chất lượng tốt.



Hình 3.3. Chất lượng hình thái phôi nuôi cấy ngày 3 (Nguồn: HP Fertility). (A) Phôi 8 tế bào kích thước đồng đều, độ phân mảnh 5%, xếp loại I. (B) Phôi 8 tế bào kích thước không đồng đều, độ phân mảnh 15%, xếp loại II. (C) Phôi 7 tế bào kích thước không đồng đều, độ phân mảnh 25%, xếp loại III

Chất lượng phôi phân chia được coi là yếu tố quan trọng trong việc đánh giá tiềm năng của phôi giai đoạn sớm. Yu và cộng sự (2018) đã phân tích 1564 phôi từ 234 bệnh nhân thực hiện thụ tinh bằng IVF cổ điển để xác định mối tương quan giữa các thông số đánh giá hình thái phôi ngày 3 (số lượng tế bào, độ phân mảnh và độ đồng đều giữa các tế bào, hiện diện không bào, phôi bào đa nhân) và tiềm năng phát triển thành phôi nang chất lượng tốt ($\geq 3BB$). Kết quả cho thấy, số lượng tế bào của phôi tăng lên vào ngày 3 có liên quan đến sự tiến triển đến giai đoạn phôi nang và hình thái phôi nang được cải thiện. Đồng thời, các thông số khác như độ phân mảnh và độ đồng đều giữa các tế bào, hiện diện không bào, phôi bào đa nhân cũng có liên quan đến sự tạo thành phôi nang chất lượng tốt. Bên cạnh đó, nghiên cứu đã xây dựng thành công mô hình tiên lượng phôi nang chất lượng tốt bằng số lượng tế bào, độ phân mảnh và độ đồng đều giữa các tế bào của phôi ngày 3 với giá trị AUC là 0,79 (95% CI: 0,766 – 0,813) [88].

Nghiên cứu của Bo Li và cộng sự (2021), tỉ lệ làm tổ và thai lâm sàng của những phôi ngày 3 có 6 tế bào giảm đáng kể, còn tỉ lệ sảy thai lại tăng đáng kể khi so với những phôi ≥ 7 tế bào. Tuy nhiên khi nuôi cấy những phôi ≤ 6 tế bào lên phôi nang, thì những phôi nang này cho kết quả làm tổ và thai lâm sàng tương tự như những phôi nang có nguồn gốc từ phôi ngày 3 ≥ 7 tế bào [89].

Bảng 3.4. Đặc điểm phôi phân chia (ngày 3)

Các thông số đánh giá	Noãn tươi (n = 72)	Noãn trữ (n = 83)	P value
Số lượng phôi ngày 3 (phôi)	3,3 \pm 2,5	4,2 \pm 2,5	
Số lượng phôi tốt ngày 3 (phôi)	2,5 \pm 2,2	3 \pm 2,4	
Tỉ lệ tạo phôi ngày 3 (%)	86,9	87,2	0,916
Tỉ lệ tạo phôi tốt ngày 3 (%)	65	61	0,416

Kết quả nghiên cứu của tôi cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ tạo phôi ngày 3 và phôi tốt ngày 3 giữa hai nhóm noãn tươi và noãn trữ ($P > 0,05$). Kết quả tương tự được tìm thấy trong nghiên cứu của Buderatska và cs., 2020 [85] khi không có sự khác biệt đáng kể về khả năng tạo phôi ngày 3 giữa hai nhóm. Ngoài ra, sự tương đồng có thể được nhận thấy rõ rệt giữa nghiên cứu của tôi và tác giả Buderatska khi tỉ lệ tạo phôi ngày 3 đều trên 80% và tỉ lệ tạo phôi tốt ngày 3 đều trên 60%.

Năm 2010, Cobo và cộng sự đã tiến hành một thử nghiệm ngẫu nhiên có đối chứng cho kết quả sự khác biệt về tỉ lệ tạo phôi tốt ngày 3 giữa phôi từ noãn tươi và phôi từ noãn trữ-rã là không đáng kể, lần lượt là 37,7% và 36,1% [45].

Những lần phân bào đầu tiên ở phôi giai đoạn sớm chủ yếu dựa vào nguyên liệu là các bản phiên mã mRNA và các protein do tế bào trứng cung cấp. Do đó, chất lượng trứng đóng vai trò vô cùng quan trọng trong sự hình thành và phát triển của phôi giai đoạn sớm. Nghiên cứu của tôi và một số tác giả khác cho kết quả về sự phát triển tương đương ở phôi giai đoạn phân chia

từ cả noãn tươi và noãn trữ-rã. Điều này có thể góp phần khẳng định chất lượng noãn ít bị ảnh hưởng bởi quá trình thụ tinh hoá.

3.3.3. Khả năng tạo phôi nang

Bảng 3.5. Khả năng tạo phôi nang

Các thông số đánh giá	Noãn tươi (n = 72)	Noãn trữ (n = 83)	<i>P</i> value
Số lượng phôi nang trung bình (phôi)	2,1 ± 1,9	2,8 ± 2,3	
Số lượng phôi nang tốt (phôi)	1,3 ± 1,4	1,7 ± 1,7	
Tỉ lệ tạo phôi nang (%)	44,4	54,0	0,049
Tỉ lệ tạo phôi nang tốt (%)	33,6	33,5	0,994

Tỉ lệ tạo phôi nang có sự khác biệt đáng kể giữa noãn tươi và noãn trữ rã ($P < 0,05$). Tuy nhiên, tỉ lệ phôi nang chất lượng tốt khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm.

Năm 2020, Buderatska và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu so sánh 19 chu kỳ chọc hút trứng với 262 noãn tươi và 11 chu kỳ với 121 noãn trữ rã. Kết quả cho thấy tỉ lệ phôi nang từ noãn tươi cao hơn đáng kể so với noãn trữ (71,1% và 62,7%, $P < 0,05$). Tuy nhiên, tỉ lệ phôi nang tốt có xu hướng ngược lại khi nhóm noãn tươi có tỉ lệ thấp hơn đáng kể so với nhóm noãn thụ tinh hoá (38,5% và 55,8%, $P < 0,05$) [85].

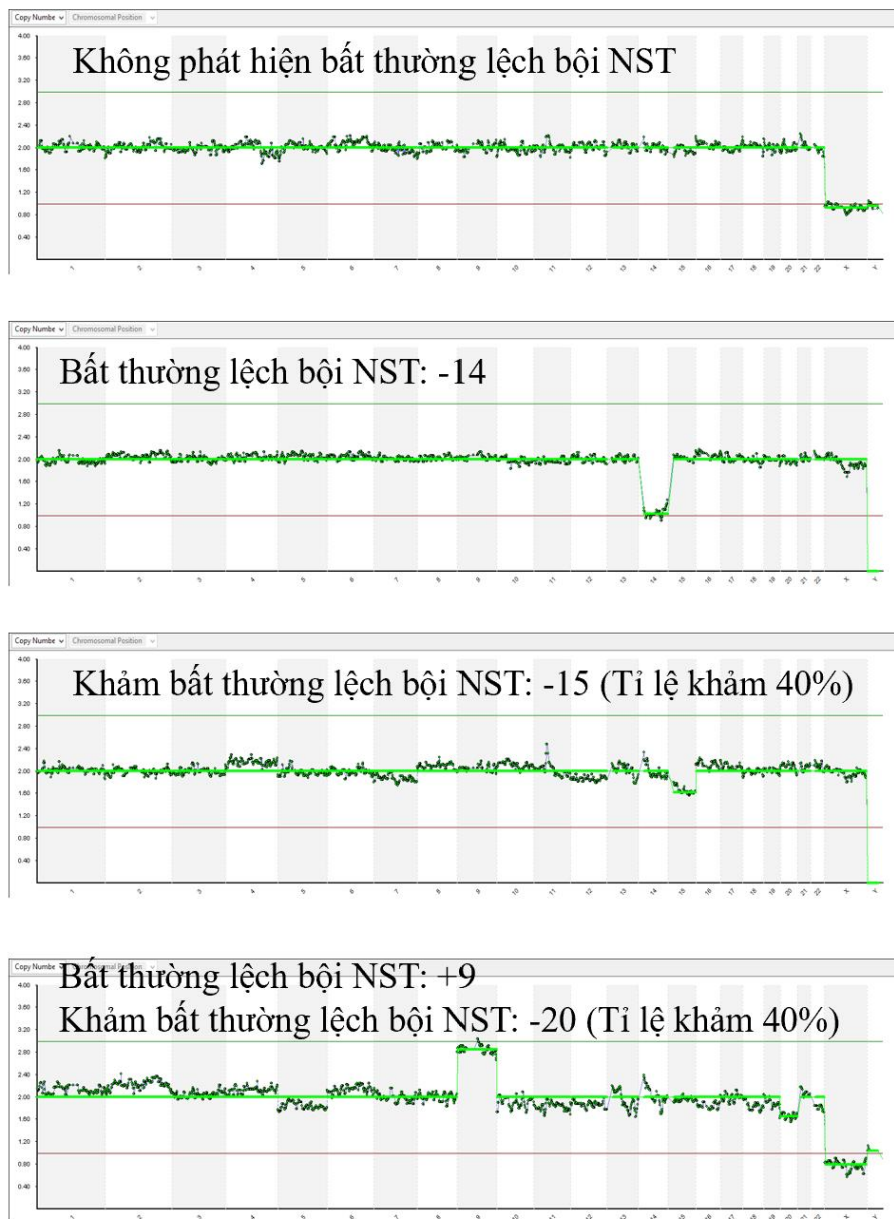
Sự khác biệt về tỉ lệ phôi nang tốt giữa kết quả nghiên cứu của tôi và của tác giả Buderatska có thể được giải thích bởi sự khác biệt về độ tuổi trung bình của dân số nghiên cứu ($35,5 \pm 4,8$ so với $27,2 \pm 2,4$). Một nghiên cứu của Phạm Văn Anh và cs., 2022 đã chỉ ra mối tương quan nghịch giữa tuổi mẹ và chất lượng hình thái phôi nang [90].

Khả năng tạo phôi nang phụ thuộc vào các yếu tố bao gồm chất lượng giao tử, điều kiện thụ tinh và nuôi cấy phôi. Do đó, khi chất lượng tinh trùng, điều kiện thụ tinh và nuôi cấy phôi tương đồng tại cùng một thời điểm, sự đánh

giá về chất lượng noãn liên quan đến khả năng tạo phôi nang có thể được coi là khách quan.

3.3.4. Chất lượng di truyền

Trong giai đoạn 05/2021 – 08/2023, tổng cộng 322 phôi được tiến hành sàng lọc bất thường số lượng nhiễm sắc thể ở phôi giai đoạn tiền làm tổ (PGT-A), trong đó 145/322 phôi có nguồn gốc từ noãn tươi (45%) và 177 phôi có nguồn gốc từ noãn sau rã đông (55%). Kết quả thể nguyên bội, lệch bội và khảm của phôi tiền làm tổ được phân tích bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) (xem hình 3.5)



Hình 3.4. Kết quả phân tích số lượng NST bằng NGS

Số lượng phôi nang được sinh thiết ở hai nhóm noãn là tương đương nhau ($P > 0,05$). Kết quả phân bố số lượng phôi nguyên bội, lệch bội và khảm chia theo hai nhóm noãn được mô tả chi tiết trong bảng 3.6.

Bảng 3.6. Phân bố phôi theo chất lượng di truyền và nguồn gốc noãn

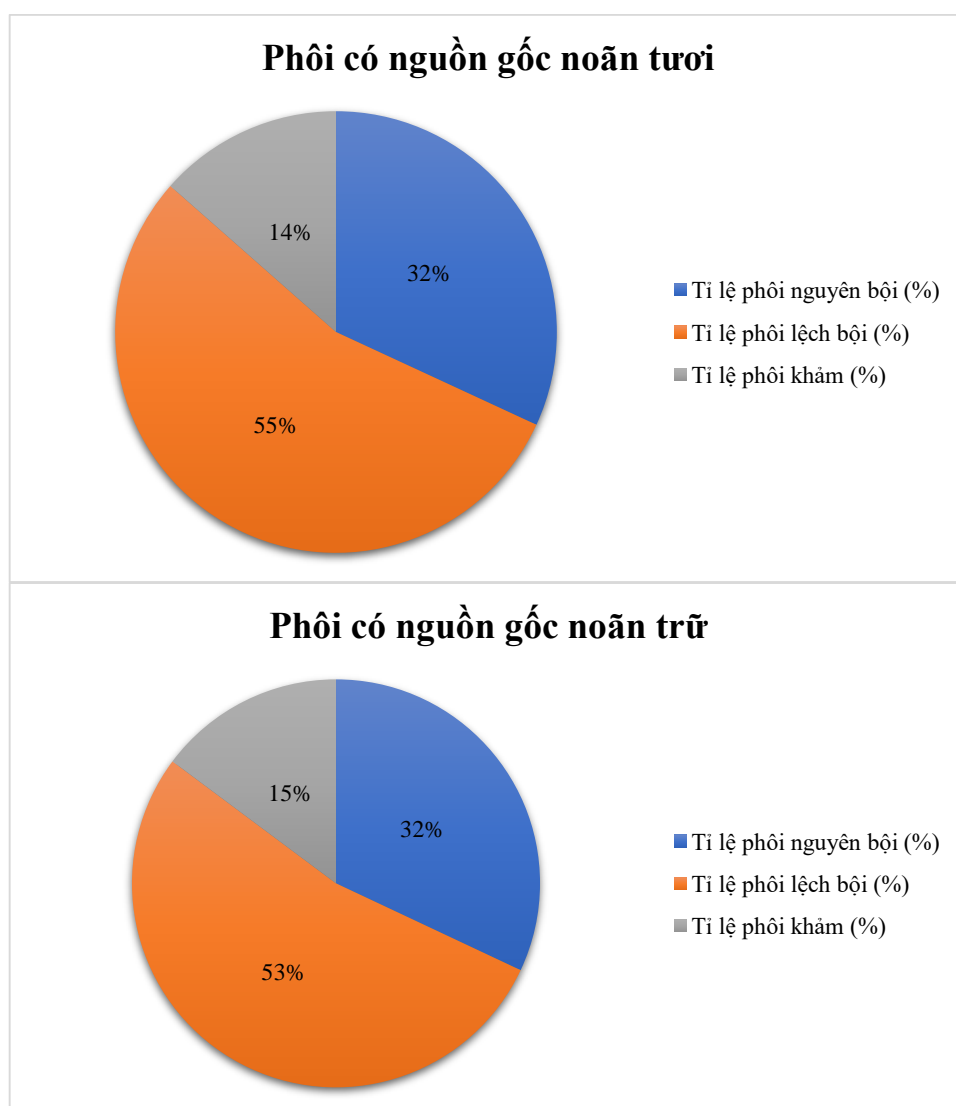
Các thông số đánh giá	Noãn tươi (n = 72)	Noãn trữ (n = 83)
Số lượng phôi nguyên bội (phôi)	49	56
Số lượng phôi lệch bội (phôi)	74	96
Số lượng phôi khảm (phôi)	22	25

Tỉ lệ phôi nguyên bội, lệch phôi và khảm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa phôi từ noãn tươi và phôi từ noãn trữ rã ($P > 0,05$). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Buderatska và cs., 2020 khi so sánh tỉ lệ phôi nguyên bội và lệch bội giữa hai nhóm trên không cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (45,9% so với 44,2% và 54,1% so với 55,8%; $P > 0,05$).

Năm 2015, Goldman và cộng sự tiến hành nghiên cứu so sánh kết cục phôi học, di truyền và lâm sàng trên nhóm bệnh nhân có phôi được bảo quản lạnh bằng phương pháp thủy tinh hoá hoặc đông lạnh chậm so với nhóm chứng (không bảo quản lạnh) trong giai đoạn 12/2011 – 07/2014. Kết quả cho thấy tỉ lệ phôi nguyên bội ở phôi từ noãn bảo quản lạnh không có sự khác biệt đáng kể so với phôi từ noãn không bảo quản lạnh (44,5% so với 47,6%, $P > 0,05$) [81, 91].

Theo lý thuyết, thoi vô sắc của noãn rất nhạy cảm với sự thay đổi của nhiệt độ. Bất kỳ tổn thương nào của thoi vô sắc cũng có nguy cơ dẫn đến sự phân ly không chính xác của nhiễm sắc thể và được coi là một trong các nguyên nhân dẫn đến sự hình thành của phôi và giao tử lệch bội. Tuy nhiên, trữ lạnh noãn với phương pháp thủy tinh hoá cho thấy sự tương đồng về tình trạng thể bội giữa phôi có nguồn gốc noãn trữ-rã so với phôi có nguồn gốc từ noãn tươi. Kết quả từ nghiên cứu của tôi góp phần khẳng định tính an toàn của phương pháp thủy tinh hoá noãn với chất lượng di truyền của phôi người giai đoạn tiền làm tổ.

Biểu đồ 3.2. Tỷ lệ các dạng bất thường NST theo nguồn gốc noãn



Từ biểu đồ 3.2 có thể thấy, tỉ trọng phôi nguyên bội, lệch bội và phôi khuyết có sự tương đồng giữa phôi có nguồn gốc noãn tươi và phôi có nguồn gốc noãn trữ. Phôi lệch bội chiếm tỉ lệ lớn nhất, đều > 50%, trong khi tỉ lệ phôi nguyên bội thấp hơn, chiếm khoảng 32% tổng số phôi được sinh thiết ở mỗi nhóm, phôi khuyết chiếm tỉ lệ nhỏ nhất, khoảng 10% -15%.

Năm 2015, Deng và cộng sự tiến hành nghiên cứu kết quả sàng lọc di truyền phôi tiền làm tổ trên 75 chu kỳ sử dụng hoàn toàn noãn trữ rã. Tỷ lệ phôi nguyên bội chiếm 84,2% so với chỉ 15,8% phôi có kết quả lệch bội. Điều này có thể được giải thích bởi đối tượng nghiên cứu có độ tuổi trung bình trẻ ($25,1 \pm 3,9$). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng tuổi mẹ là yếu tố ảnh hưởng tới khả năng bất thường số lượng nhiễm sắc thể ở phôi [90-92].

3.4. KẾT QUẢ LÂM SÀNG

3.4.1. Phân bố phôi chuyển theo chất lượng di truyền và hình thái

Từ tháng 05/2021 tới tháng 08/2023, tổng cộng 44 lượt chuyển phôi được thực hiện với các phôi đã có kết quả sàng lọc phôi PGT-A ở các bệnh nhân có sử dụng noãn rã đông tại Khoa Hỗ trợ Sinh sản, Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng.

Các bệnh nhân đều thực hiện chuyển đơn phôi trong đó: 33 phôi nguyên bội (75%), 10 phôi thể khảm (23%). Một trường hợp duy nhất chuyển phôi lệch bội có nguồn gốc từ noãn trữ rã có kết quả di truyền: Khảm bất thường lệch bội nhiễm sắc thể: -18 (Tỉ lệ khảm 30%) và bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể: +11s (thêm đoạn 14,7 Mb - chưa phát hiện hội chứng, bệnh liên quan).

Bảng 3.7. Phân bố phôi chuyển theo chất lượng di truyền

Các thông số đánh giá	Noãn tươi (n = 16)	Noãn trữ (n = 28)	Tổng
Phôi nguyên bội (phôi)	12/16	21/28	33
Phôi lệch bội (phôi)	0/16	1/28	1
Phôi khảm (phôi)	4/16	6/28	10

Trong số 44 phôi được chuyển, số lượng phôi loại I chiếm 59% (26/44), phôi loại II chiếm 32% (14/44) và phôi loại III chiếm 9% (4/44).

Bảng 3.8. Phân bố phôi chuyển theo chất lượng hình thái

Xếp loại	Noãn tươi (n = 16)	Noãn trữ (n = 28)	Tổng
Loại I	10/16	16/28	26
Loại II	5/16	9/28	14
Loại III	1/16	3/28	4

3.4.2. Kết quả thai

Các kết cục lâm sàng chính sau chuyển phôi được ghi nhận gồm: Tỷ lệ có thai, tỷ lệ thai sinh hoá, tỷ lệ thai lâm sàng, tỷ lệ thai diễn tiến, tỷ lệ trẻ sinh sống.

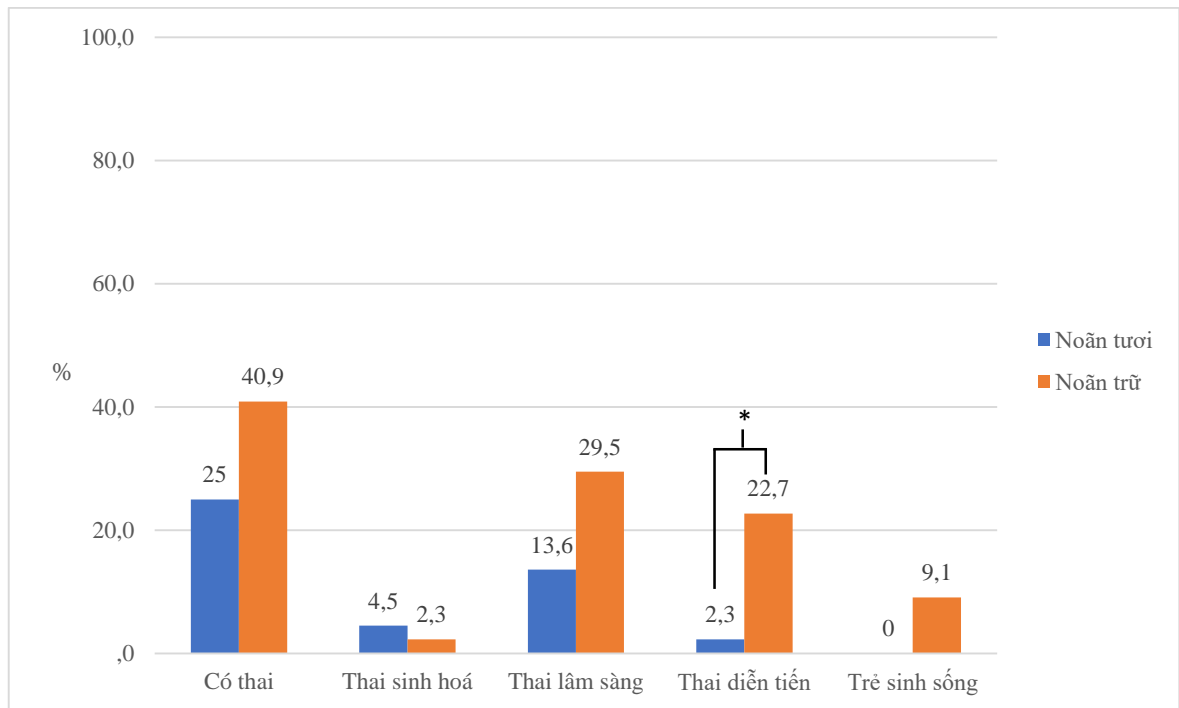
Bảng 3.9. Đặc điểm thai ở 2 nhóm noãn

Đặc điểm thai	Noãn tươi (n = 16)	Noãn trữ (n = 28)
Số lượng ca có thai (ca)	11/16	18/28
Số lượng ca thai sinh hoá (ca)	2/16	1/28
Số lượng ca thai lâm sàng (ca)	6/16	13/28
Số lượng ca thai diễn tiến (ca)	1/16	10/28
Số lượng trẻ sinh sống (ca)	0/16	4/28

Trong số các ca chuyển phôi, việc lựa chọn phôi chuyển của bác sĩ và bệnh nhân phụ thuộc hoàn toàn vào chất lượng hình thái và chất lượng di truyền. Do đó, nguồn gốc noãn là yếu tố ngẫu nhiên không có sự thiên vị. Nghiên cứu của tôi thống kê số lượng chu kỳ chuyển phôi có nguồn gốc noãn trữ nhiều hơn phôi từ noãn tươi.

Kết cục lâm sàng bao gồm các so sánh về tỷ lệ có thai, tỷ lệ thai sinh hoá, tỷ lệ thai lâm sàng, tỷ lệ thai diễn tiến và tỷ lệ trẻ sinh sống giữa hai nhóm noãn tươi và noãn trữ-rã được mô tả chi tiết ở biểu đồ 3.3

Biểu đồ 3.3. Kết cục lâm sàng theo nguồn gốc noãn



* $P > 0,05$

Tỉ lệ có thai không có sự khác biệt đáng kể giữa 2 nhóm chuyển phôi có nguồn gốc từ noãn tươi và noãn trữ rã ($P > 0,05$). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Cobo và cs., 2010 so sánh tỉ lệ có thai giữa 2 nhóm noãn tươi và noãn trữ không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (55% so với 55,9%, $P > 0,05$) [45]. Xét riêng nhóm chuyển phôi từ noãn rã đông, tỉ lệ có thai trong nghiên cứu của tôi tương đồng với nghiên cứu của Rienzi và cs., 2010 (38,5%) [84] và nghiên cứu của Sciorio và cs., 2021 (37,8%) [86].

Kết quả nghiên cứu của tôi cũng cho thấy tỉ lệ thai sinh hoá không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh chuyển phôi từ noãn tươi với noãn rã ($P > 0,05$).

Tỉ lệ thai lâm sàng ở nhóm chuyển phôi từ noãn trữ có xu hướng cao hơn nhóm chuyển phôi từ noãn tươi, tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Kết quả tương tự cũng được chứng minh trong nghiên cứu của Cobo và cs., 2010 (55,4% so với 55,6%, $P > 0,05$) và Buderatska và cs., 2020 (62,5% so với 64,7%, $P > 0,05$).

Nghiên cứu của tôi cho kết quả tỉ lệ thai diễn tiến ở nhóm chuyển phôi từ noãn trữ cao hơn có ý nghĩa thống kê so với chuyển phôi từ noãn tươi (22,7% so với 2,3%, $P = 0,03$). Nghiên cứu của Cobo và cs., 2010 [45] và nghiên cứu

của Doyle và cs., 2016 [11] đều cho kết quả không có sự khác biệt đáng kể về tỉ lệ thai diễn tiến ở 2 nhóm chuyển phôi có nguồn gốc từ noãn trữ và noãn tươi (49,1% so với 48,3%, 39% so với 35%, $P > 0,05$). Kết quả nghiên cứu của tôi và các tác giả nêu trên có thể chứng minh quá trình trữ rã noãn không làm giảm tỉ lệ thai diễn tiến.

Bốn trẻ sinh sống từ 28 chu kỳ chuyển phôi nguồn gốc noãn trữ rã cho tỉ lệ trẻ sinh sống 9,1% và không có trẻ nào sinh ra từ 16 chu kỳ chuyển phôi tươi. Tuy nhiên, sự khác biệt về tỉ lệ trẻ sinh sống không có ý nghĩa thống kê. Năm 2021, Sciorio và cộng sự tiến hành nghiên cứu về hiệu quả lâm sàng của những chu kỳ hiến noãn và kết quả ghi nhận 42 trẻ sinh ra từ 148 chu kỳ chuyển phôi cho tỉ lệ trẻ sinh sống đạt 28,8% [86]. Tuy nhiên, các chu kỳ chuyển phôi trong nghiên cứu này không phân biệt chuyển phôi tươi hay chuyển phôi trữ cũng như chuyển đơn phôi hay chuyển hai phôi.

3.4.3. Ảnh hưởng của chất lượng di truyền phôi tới tỉ lệ có thai

Các trường hợp chuyển phôi thể khảm được thực hiện do bệnh nhân không có phôi nguyên bội trong chu kỳ tạo phôi đó. Một số nghiên cứu đã chỉ ra phôi thể khảm được chuyển vẫn có thể dẫn đến thai kỳ, mặc dù tỉ lệ có thai của chuyển phôi thể khảm thấp hơn đáng kể so với chuyển phôi nguyên bội [93, 94]. Do đó, các trường hợp chuyển phôi nguyên bội và phôi thể khảm được tách biệt, tính toán và so sánh giữa noãn tươi và noãn rã.

Bảng 3.10. Tỉ lệ có thai chuyển phôi nguyên bội

Đặc điểm chuyển phôi	Noãn tươi		Noãn rã		P value
	Số lượng	Tỉ lệ (%)	Số lượng	Tỉ lệ (%)	
Số ca FET (ca)	12		21		
B-hCG (+)	5/12	41,7	6/21	28,6	0,347

Xét các trường hợp chuyển phôi nguyên bội, khả năng đậu thai của nhóm phôi có nguồn gốc noãn rã khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với phôi có nguồn gốc noãn tươi.

Bảng 3.11. Tỷ lệ có thai chuyển phôi thể khám

Đặc điểm chuyển phôi	Noãn tươi		Noãn rã		P value
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
Số ca FET (ca)	4		6		
B-hCG (+)	0/4	0	4/6	66,7	0,071

Tổng cộng 10 lượt chuyển phôi thể khám được thực hiện trên tổng số 44 chu kỳ chuyển phôi. Tỷ lệ có thai ở noãn rã cao có xu hướng cao hơn so với noãn tươi, tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê.

3.5. ĐÁNH GIÁ CÁC YẾU TỐ NGƯỜI MẸ TIÊN LƯỢNG PHÔI NGUYÊN BỘI

Các yếu tố người mẹ được đưa vào mô hình tiên lượng phôi nguyên bội bao gồm: tuổi mẹ, BMI, số chu kỳ chọc hút trứng, thời gian vô sinh, AMH, tổng số trứng trưởng thành được tạo phôi. Đường cong ROC được sử dụng có thể phân định các yếu tố tiên lượng trên thành 2 nhóm tiên lượng tốt và tiên lượng kém dựa vào độ chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu.

Mỗi điểm trên đường cong ROC là tọa độ tương ứng với tần suất dương tính thật (độ nhạy) trên trục tung và tần suất dương tính giả (1-độ đặc hiệu) trên trục hoành. Đường biểu diễn càng lệch về phía bên trên và bên trái thì sự phân biệt giữa 2 trạng thái có phôi nguyên bội hay không có phôi nguyên bội càng rõ. Độ chính xác được đo lường bằng diện tích dưới đường cong ROC. Nếu diện tích bằng 1 là yếu tố tiên lượng rất tốt và nếu bằng 0,5 thì yếu tố tiên lượng không có giá trị. Mức độ chính xác của yếu tố tiên lượng dựa vào hệ thống điểm sau đây:

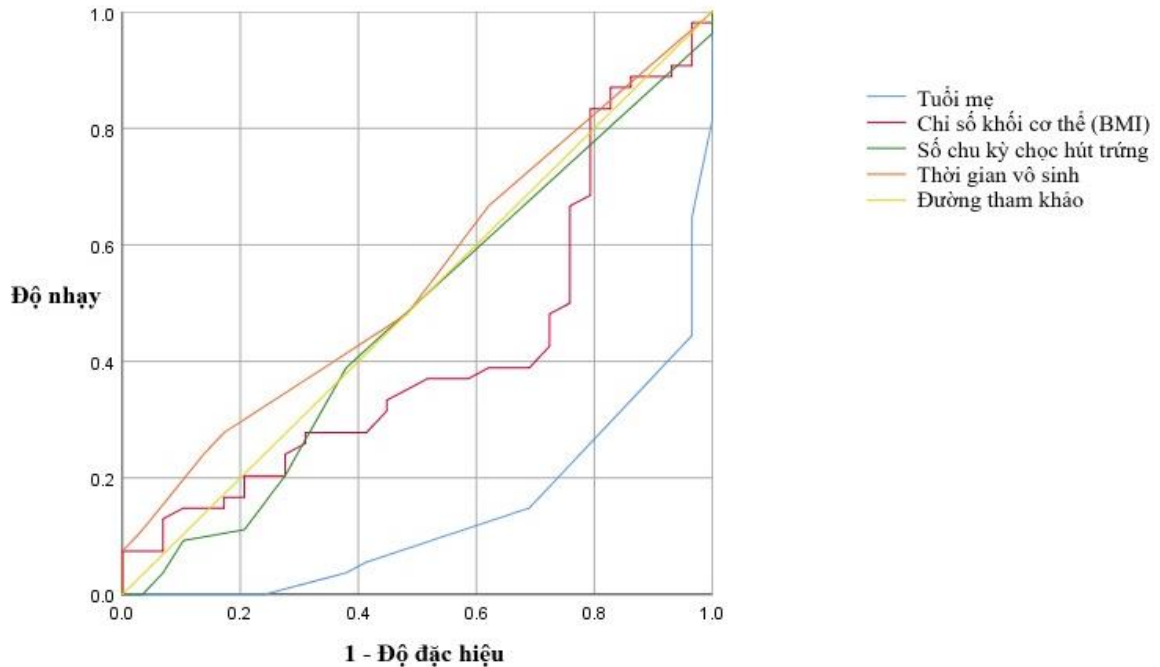
0,50 – 0,60 = không giá trị

0,60 – 0,70 = tạm được

0,80 – 0,90 = tốt

3.5.1. Nhóm tiên lượng kém

Biểu đồ 3.4. Đường cong ROC xác định các yếu tố tiên lượng kém cho mô hình tiên lượng phôi nguyên bội



Biểu đồ trên gồm có 4 đường cong ROC tương ứng với các yếu tố tiên lượng với AUC lần lượt là: tuổi mẹ (AUC 0,14; 95% CI 0,06 – 0,22; $P < 0,001$), BMI (AUC 0,42; 95% CI 0,29 – 0,55), số chu kỳ chọc hút trứng (AUC 0,48; 95% CI 0,34 – 0,60) và thời gian vô sinh (AUC 0,54; 95% CI 0,42 – 0,62).

Các yếu tố này đều có giá trị AUC nằm trong khoảng 0,50– 0,60 nên được xét là các yếu tố không có giá trị trong việc tiên lượng phôi nguyên bội.

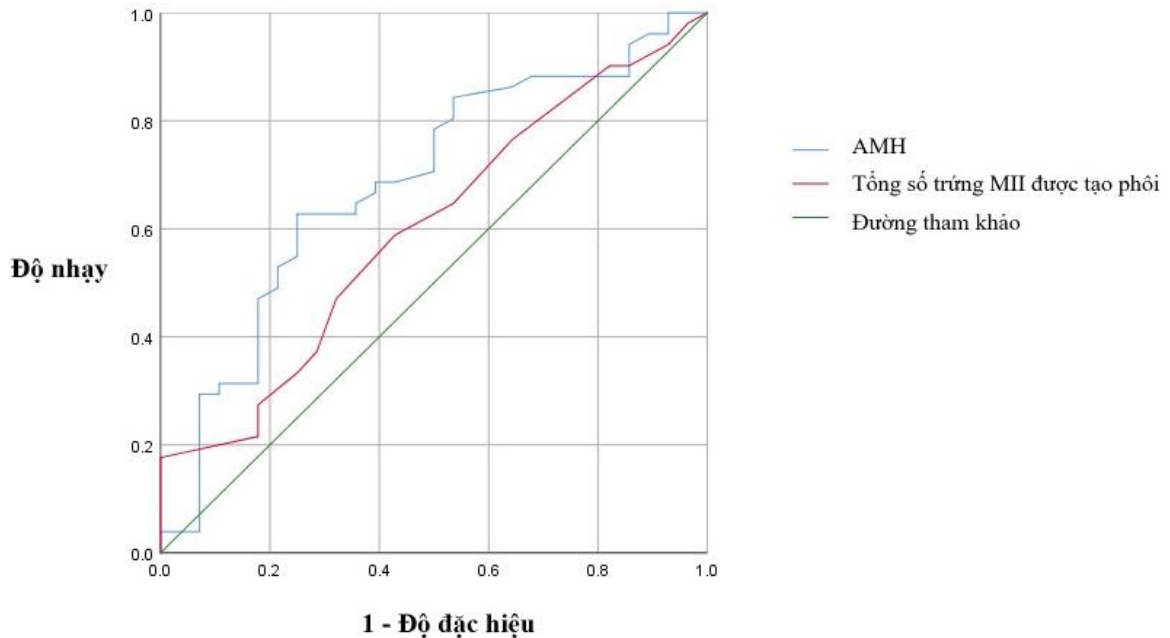
Tuổi mẹ được coi là yếu tố có liên quan đến khả năng bất thường của phôi tiền làm tổ. Tuổi mẹ càng cao thì càng ít khả năng có phôi nguyên bội. Trong mô hình tiên lượng, kết quả có phôi nguyên bội được dùng làm giá trị tham chiếu, do đó đối với những trường hợp tuổi mẹ cao thì cần nhiều số liệu hơn để tiếp tục xem xét tiên lượng phôi nguyên bội theo tuổi mẹ.

Mặc dù BMI được cho là có ảnh hưởng đến tỉ lệ tạo phôi nang tốt [95], tuy nhiên các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng không có mối liên hệ nào giữa BMI và khả năng nguyên bội của phôi [95, 96]. Nhận định này tương đồng với kết quả nghiên cứu của tôi với BMI là yếu tố tiên lượng phôi nguyên bội kém.

Số lượng chu kỳ chọc hút trứng và thời gian vô sinh trong nghiên cứu không có giá trị tiên lượng cho bệnh nhân có ít nhất 1 phôi nguyên bội.

3.5.2. Nhóm tiên lượng tốt

Biểu đồ 3.5. Đường cong ROC xác định các yếu tố tiên lượng tốt cho mô hình tiên lượng phôi nguyên bội



AMH (AUC 0,69; 95% CI 0,56 – 0,81; P = 0,007) và tổng số trứng MII được tạo phôi (AUC 0,60; 95% CI 0,47 – 0,73) có đường cong ROC thuộc khoảng chấp nhận được (0,60 – 0,70) có tiềm năng trong việc xác định phôi nguyên bội nên được xếp vào nhóm tiên lượng tốt.

Yếu tố số lượng trứng trưởng thành có AUC nằm trong ngưỡng chấp nhận, tuy nhiên không có ý nghĩa thống kê (P = 0,146).

AMH có diện tích dưới đường cong ROC là 0,685 hay 68,5% với P = 0,007. Như vậy, bệnh nhân có phôi nguyên bội hay không có khả năng phân biệt giữa việc có phôi và không có phôi. Chỉ số Youden (Youden index) J xác định điểm cắt AMH ở nồng độ 1,36 là ngưỡng có độ nhạy và độ đặc hiệu cao nhất với độ nhạy 0,63 và độ đặc hiệu 0,75.

3.5.3. Tiên lượng phôi nguyên bội theo ngưỡng AMH

Ngưỡng AMH 1,36 được lấy làm điểm cắt chia thành 2 nhóm: nhóm thứ nhất bao gồm tất cả các ca có AMH < 1,36 và các ca có AMH ≥ 1,36 thuộc nhóm còn lại. Kết quả so sánh tỉ lệ ca có ít nhất một phôi nguyên bội giữa 2 nhóm cho thấy nhóm bệnh nhân có AMH ≥ 1,36 có tỉ lệ ca có ít nhất một phôi

nguyên bội cao hơn đáng kể so với nhóm bệnh nhân có AMH < 1,36 (P = 0,007).

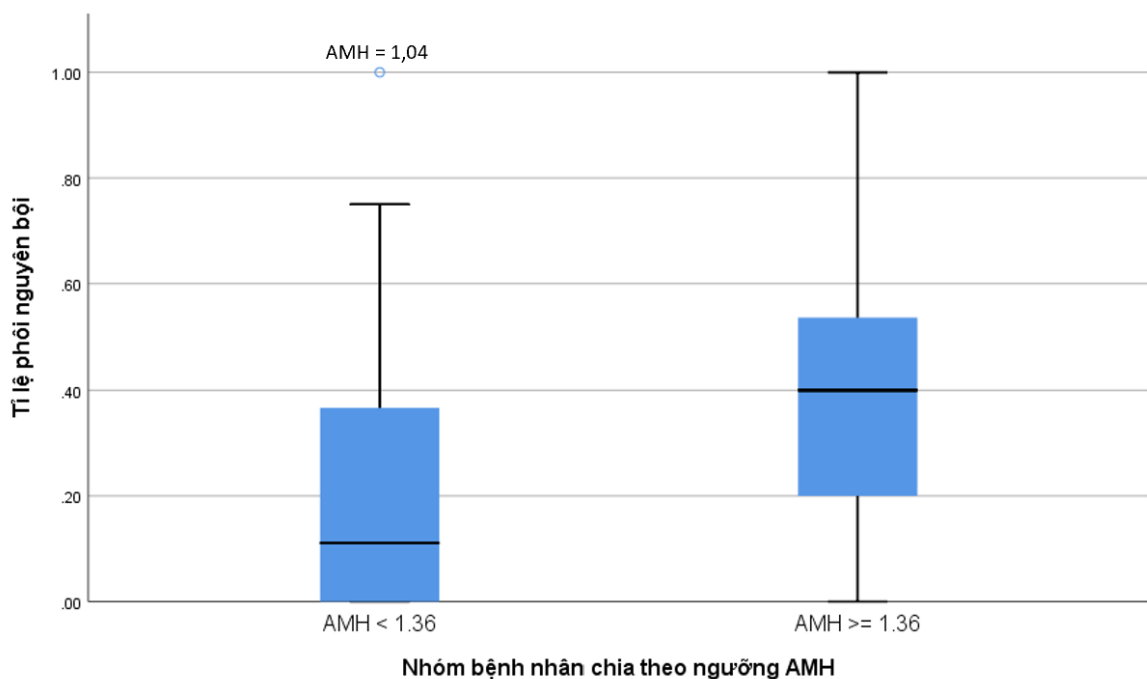
Tỉ suất chênh (OR) mô tả khả năng nhóm AMH $\geq 1,36$ có ít nhất một phôi nguyên bội cao gấp 4 lần so với nhóm AMH < 1,36 (P = 0,008)

Bảng 3.12. Tiên lượng phôi nguyên bội theo ngưỡng AMH

Các thông số đánh giá	AMH < 1,36 (Nhóm 1)	AMH $\geq 1,36$ (Nhóm 2)	P value
Tỉ lệ ca có ít nhất một phôi nguyên bội (%)	27,8	36,7	0,007
OR (Khoảng tin cậy 95%)	<i>Vs. Nhóm 1</i>	3,95 (1,43 – 10,96)	0,008

Dựa trên số liệu về tỉ lệ phôi nguyên bội của 83 chu kỳ thụ tinh trong nghiên cứu, tôi đã tiến hành phân tích sự phân bố của tỉ lệ phôi nguyên bội theo nhóm bệnh nhân với ngưỡng AMH 1,36 và thể hiện kết quả bằng biểu đồ hộp Box and Whisker plot (Xem biểu đồ 3.6)

Biểu đồ 3.6. Phân bố tỉ lệ phôi nguyên bội theo ngưỡng AMH 1,36



Từ biểu đồ 3.6, có thể thấy tỉ lệ phôi nguyên bội của từng ca tăng lên khi AMH $\geq 1,36$. Nhóm AMH < 1,36 có giá trị trung vị 10% thấp hơn so với nhóm AMH $\geq 1,36$ với giá trị trung vị 40%.

Năm 2017, La Marca và cộng sự tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ AMH tới tỉ lệ phôi nguyên bội trong các chu kỳ IVF/ICSI cho kết quả có mối tương quan giữa nồng độ AMH huyết thanh với tỉ lệ phôi nguyên bội (AMH; $r = 0,21$ [95% CI 0,13 to 0,29]; $P < 0,0001$) [97].

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Trữ lạnh và rã đông noãn bằng phương pháp thủy tinh hoá, thực hiện thụ tinh và nuôi cấy phôi tới giai đoạn phôi nang có sử dụng kỹ thuật phân tích bất thường số lượng nhiễm sắc thể ở phôi giai đoạn tiền làm tổ trên 83 chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm với 545 noãn rã đông, tôi có những kết luận sau:

- ❖ **Khả năng sống sót của noãn sau rã đông bằng phương pháp thủy tinh hoá**
 - Tỷ lệ noãn sống sót sau rã đông bằng phương pháp thủy tinh hoá đạt $96,5\% \pm 7,6$
- ❖ **So sánh kết quả phôi học giữa noãn tươi và noãn rã tự thân**
 - Tỷ lệ thụ tinh bình thường không có sự khác biệt ($78,1 \pm 2,3$ so với $75,5 \pm 2,9$, $P > 0,05$)
 - Tỷ lệ tạo phôi phân chia (ngày 3) và phôi phân chia chất lượng tốt khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($86,9$ so với $87,2$ và 65 so với 61 , $P > 0,05$)
 - Tỷ lệ tạo phôi nang ở nhóm noãn tươi ($44,4\%$) thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm noãn trữ (54%), $P < 0,05$
 - Tỷ lệ tạo phôi nang chất lượng tốt không có sự khác biệt đáng kể ($33,6$ so với $33,5$, $P > 0,05$)
- ❖ **So sánh kết quả sàng lọc bất thường số lượng NST ở phôi giai đoạn tiền làm tổ giữa noãn tươi và noãn rã tự thân**
 - Xu hướng phân bố thể nguyên bội, lệch bội và khảm tương đồng ở hai nhóm: thể lệch bội chiếm tỷ lệ lớn nhất ($>50\%$), tiếp theo là thể nguyên bội và thấp nhất là thể khảm.
 - Tỷ lệ phôi nguyên bội, lệch bội, khảm không có sự khác biệt đáng kể ở nhóm noãn trữ so với nhóm noãn tươi ($31,9$ so với 32 ; $54,6$ so với $53,3$; $13,5$ so với $14,8$; $P > 0,05$)
- ❖ **So sánh kết cục lâm sàng giữa noãn tươi và noãn rã tự thân**
 - Tỷ lệ có thai, thai sinh hoá, thai lâm sàng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (25% so với $40,9\%$; $4,5\%$ so với $2,3\%$; $13,6\%$ so với $29,5\%$; $P > 0,05$)

- Tỷ lệ thai diễn tiến ở nhóm noãn tươi thấp hơn đáng kể so với noãn trữ-rã (2,3% so với 22,7%; $P < 0,05$)
- Tỷ lệ trẻ sinh sống ở nhóm noãn tươi thấp hơn so với nhóm noãn trữ có ý nghĩa thống kê (0 so với 9,1%; $P > 0,05$)

KIẾN NGHỊ

- Do thời gian thực hiện nghiên cứu còn ngắn nên cần tiếp tục theo dõi và thực hiện nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn.
- Theo dõi kết quả sản khoa và chu sinh của trẻ sinh ra từ noãn rã
- Nghiên cứu thêm các yếu tố tiên lượng khác để dự đoán phôi nguyên bội và tình trạng có thai.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN

1. A comparison of embryonic, genetic and clinical outcomes between fresh and vitrified oocyte

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cobo A., Domingo J., Pérez S., Crespo J., Remohí J. and Pellicer A., 2008, Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients, *Clinical Translational Oncology*, 10, pp. 268-273.
2. Noyes N., Labella P.A., Grifo J. and Knopman J.M., 2010, Oocyte cryopreservation: a feasible fertility preservation option for reproductive age cancer survivors, *Journal of assisted reproduction genetics*, 27, pp. 495-499.
3. Noyes N., Knopman J.M., Melzer K., Fino M.E., Friedman B. and Westphal L.M., 2011, Oocyte cryopreservation as a fertility preservation measure for cancer patients, *Reproductive biomedicine online*, 23(3), pp. 323-333.
4. Stoop D., Nekkebroeck J. and Devroey P., 2011, A survey on the intentions and attitudes towards oocyte cryopreservation for non-medical reasons among women of reproductive age, *Human reproduction*, 26(3), pp. 655-661.
5. Milán M., Cobo A.C., Rodrigo L., Mateu E., Mercader A., Buendía P., Peinado V., Delgado A., Mir P. and Simón C., 2010, Redefining advanced maternal age as an indication for preimplantation genetic screening, *Reproductive biomedicine online*, 21(5), pp. 649-657.
6. Kim S.S., Donnez J., Barri P., Pellicer A., Patrizio P., Rosenwaks Z., Nagy P., Falcone T., Andersen C. and Hovatta O., 2012, Recommendations for fertility preservation in patients with lymphoma, leukemia, and breast cancer, *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(6), pp. 465-468.
7. Lê Thanh Huyền Q.H.L., Nguyễn Thanh Tùng, 2018, Biến đổi hình thái noãn và kết quả thụ tinh trong ống nghiệm của noãn sau đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hoá, *Tạp chí Y - Dược học quân sự*, 6, pp. 30-36.
8. Lê Thụy Hồng Khả T.T.C., Phạm Dương Toàn, 2020, Kết quả đông lạnh noãn ở bệnh nhân điều trị thụ tinh trong ống nghiệm, *Tạp chí Phụ sản*, 18(1), pp. 45-48.
9. De Munck N. and Vajta G., 2017, Safety and efficiency of oocyte vitrification, *Cryobiology*, 78, pp. 119-127.

10. Cobo A., García-Velasco J.A., Coello A., Domingo J., Pellicer A., Remohí J. and sterility, 2016, Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation, *Fertility sterility*, 105(3), pp. 755-764. e758.
11. Doyle J.O., Richter K.S., Lim J., Stillman R.J., Graham J.R. and Tucker M.J., 2016, Successful elective and medically indicated oocyte vitrification and warming for autologous in vitro fertilization, with predicted birth probabilities for fertility preservation according to number of cryopreserved oocytes and age at retrieval, *Fertility sterility*, 105(2), pp. 459-466. e452.
12. 2011, The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting, *Human reproduction*, 26(6), pp. 1270-1283.
13. Gardner D.K., Lane M., Stevens J., Schlenker T. and Schoolcraft W.B., 2000, Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer, *Fertility sterility*, 73(6), pp. 1155-1158.
14. Strauss III J.F. and Williams C.J., 2019, Ovarian life cycle. *Yen and Jaffe's reproductive endocrinology*, Elsevier, pp 167-205. e169.
15. Veeck L.L., 1986, Atlas of the human oocyte and early conceptus, pp.
16. Vogt E.-J., Tokuhiko K., Guo M., Dale R., Yang G., Shin S.-W., Movilla M.J., Shroff H. and Dean J., 2019, Anchoring cortical granules in the cortex ensures trafficking to the plasma membrane for post-fertilization exocytosis, *Nature communications*, 10(1), pp. 2271.
17. Ebner T., Yaman C., Moser M., Sommergruber M., Feichtinger O. and Tews G., 2000, Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection, *Human reproduction*, 15(2), pp. 427-430.
18. De Santis L., Cino I., Rabellotti E., Calzi F., Persico P., Borini A. and Coticchio G., 2005, Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality, *Reproductive biomedicine online*, 11(1), pp. 36-42.
19. Ebner T., Yaman C., Moser M., Sommergruber M., Jesacher K. and Tews G., 2001, A prospective study on oocyte survival rate after ICSI:

influence of injection technique and morphological features, *Journal of assisted reproduction genetics*, 18, pp. 623-628.

20. Plachot M., Selva J., Wolf J., Bastit P. and De Mouzon J., 2002, Consequences of oocyte dysmorphism on the fertilization rate and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. A prospective multicenter study, *Gynecologie, Obstetrique Fertilité*, 30(10), pp. 772-779.
21. Rienzi L., Ubaldi F.M., Iacobelli M., Minasi M.G., Romano S., Ferrero S., Sapienza F., Baroni E., Litwicka K. and Greco E., 2008, Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome, *Fertility sterility*, 90(5), pp. 1692-1700.
22. Otsuki J., Nagai Y. and Chiba K., 2007, Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality, *Journal of assisted reproduction genetics*, 24, pp. 263-270.
23. Kahraman S., Yakın K., Dönmez E., Şamlı H., Bahce M., Cengiz G., Sertyel S., Şamlı M. and İmirzalıoğlu N., 2000, Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection, *Human reproduction*, 15(11), pp. 2390-2393.
24. Ebner T., Moser M., Shebl O., Sommergruber M., Yaman C. and Tews G., 2008, Blood clots in the cumulus–oocyte complex predict poor oocyte quality and post-fertilization development, *Reproductive biomedicine online*, 16(6), pp. 801-807.
25. Ebner T., Moser M., Sommergruber M., Gaiswinkler U., Shebl O., Jesacher K. and Tews G., 2005, Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development, *Fertility sterility*, 83(6), pp. 1635-1640.
26. Shen Y., Stalf T., Mehnert C., Eichenlaub-Ritter U. and Tinneberg H.-R., 2005, High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles, *Human reproduction*, 20(6), pp. 1596-1606.
27. Hagemann A.R., Lanzendorf S.E., Jungheim E.S., Chang A.S., Ratts V.S. and Odem R.R., 2010, A prospective, randomized, double-blinded study of assisted hatching in women younger than 38 years undergoing in vitro fertilization, *Fertility sterility*, 93(2), pp. 586-591.

28. Hassold T., Hall H. and Hunt P., 2007, The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going, *Human molecular genetics*, 16(R2), pp. R203-R208.
29. Angell R., 1997, First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes, *The American Journal of Human Genetics*, 61(1), pp. 23-32.
30. Pellestor F., Andréo B., Arnal F., Humeau C. and Demaille J., 2003, Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes, *Human genetics*, 112, pp. 195-203.
31. Pellestor F., Anahory T. and Hamamah S., 2005, Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes, *Cytogenetic genome research*, 111(3-4), pp. 206-212.
32. Gabriel A., Thornhill A.R., Ottolini C., Gordon A., Brown A., Taylor J., Bennett K., Handyside A. and Griffin D.K., 2011, Array comparative genomic hybridisation on first polar bodies suggests that non-disjunction is not the predominant mechanism leading to aneuploidy in humans, *Journal of medical genetics*, 48(7), pp. 433-437.
33. Handyside A.H., 2012, Molecular origin of female meiotic aneuploidies, *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Basis of Disease*, 1822(12), pp. 1913-1920.
34. Ottolini C.S., Newnham L.J., Capalbo A., Natesan S.A., Joshi H.A., Cimadomo D., Griffin D.K., Sage K., Summers M.C. and Thornhill A.R., 2015, Genome-wide maps of recombination and chromosome segregation in human oocytes and embryos show selection for maternal recombination rates, *Nature genetics*, 47(7), pp. 727-735.
35. Webster A. and Schuh M., 2017, Mechanisms of aneuploidy in human eggs, *Trends in cell biology*, 27(1), pp. 55-68.
36. Gruhn J.R., Zielinska A.P., Shukla V., Blanshard R., Capalbo A., Cimadomo D., Nikiforov D., Chan A.C.-H., Newnham L.J. and Vogel I., 2019, Chromosome errors in human eggs shape natural fertility over reproductive life span, *Science*, 365(6460), pp. 1466-1469.
37. Smith G.D. and Silva C.A.S.E., 2004, Developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos, *Reproductive biomedicine online*, 9(2), pp. 171-178.

38. Chen C., 1986, Pregnancy after human oocyte cryopreservation, *The Lancet*, 327(8486), pp. 884-886.
39. Fabbri R., Porcu E., Marsella T., Rocchetta G., Venturoli S. and Flamigni C., 2001, Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival, *Human reproduction*, 16(3), pp. 411-416.
40. Kuleshova L., Gianaroli L., Magli C., Ferraretti A. and Trounson A., 1999, Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report, *Human reproduction*, 14(12), pp. 3077-3079.
41. Vajta G. and Nagy Z.P., 2006, Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification, *Reproductive biomedicine online*, 12(6), pp. 779-796.
42. Shaw J. and Jones G., 2003, Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos, *Human reproduction update*, 9(6), pp. 583-605.
43. Oktay K., Cil A.P. and Bang H., 2006, Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis, *Fertility sterility*, 86(1), pp. 70-80.
44. Cao Y.-X., Xing Q., Li L., Cong L., Zhang Z.-G., Wei Z.-L. and Zhou P., 2009, Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification, *Fertility sterility*, 92(4), pp. 1306-1311.
45. Cobo A., Meseguer M., Remohí J. and Pellicer A., 2010, Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial, *Human reproduction*, 25(9), pp. 2239-2246.
46. Katayama K.P., Stehlik J., Kuwayama M., Kato O. and Stehlik E., 2003, High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy, *Fertility sterility*, 80(1), pp. 223-224.
47. Kuwayama M., 2007, Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method, *Theriogenology*, 67(1), pp. 73-80.
48. Ali J. and Shelton J., 1993, Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos, *Reproduction*, 99(2), pp. 471-477.

49. Kuwayama M., Vajta G., Kato O. and Leibo S.P., 2005, Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes, *Reproductive biomedicine online*, 11(3), pp. 300-308.
50. Cobo A., Kuwayama M., Pérez S., Ruiz A., Pellicer A. and Remohí J., 2008, Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method, *Fertility sterility*, 89(6), pp. 1657-1664.
51. Ubaldi F., Anniballo R., Romano S., Baroni E., Albricci L., Colamaria S., Capalbo A., Sapienza F., Vajta G. and Rienzi L., 2010, Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program, *Human reproduction*, 25(5), pp. 1199-1205.
52. Khalili M.A., Shahedi A., Ashourzadeh S., Nottola S.A., Macchiarelli G. and Palmerini M.G., 2017, Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review, *Journal of assisted reproduction genetics*, 34, pp. 1413-1426.
53. Schalkoff M.E., Oskowitz S.P. and Douglas Powers R., 1989, Ultrastructure rat Observations of Human and Mouse Oocytes Treated with Cryopreservatives, *Biology of reproduction*, 40(2), pp. 379-393.
54. Bianchi V., Macchiarelli G., Borini A., Lappi M., Cecconi S., Miglietta S., Familiari G. and Nottola S.A., 2014, Fine morphological assessment of quality of human mature oocytes after slow freezing or vitrification with a closed device: a comparative analysis, *Reprod Biol Endocrinol*, 12(1), pp. 1-13.
55. Motta P.M., Nottola S.A., Micara G. and Familiari G., 1988, Ultrastructure of human unfertilized oocytes and polyspermic embryos in an IVF-ET program a, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 541(1), pp. 367-383.
56. Motta P.M., Nottola S.A., Makabe S. and Heyn R., 2000, Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells, *Human reproduction*, 15(suppl_2), pp. 129-147.
57. Nottola S.A., Albani E., Coticchio G., Palmerini M.G., Lorenzo C., Scaravelli G., Borini A., Levi-Setti P.E., Macchiarelli G.J.J.o.a.r. and genetics, 2016, Freeze/thaw stress induces organelle remodeling and membrane recycling in cryopreserved human mature oocytes, *Journal of assisted reproduction genetics*, 33, pp. 1559-1570.

58. Balboula A.Z., Schindler K., Kotani T., Kawahara M. and Takahashi M., 2020, Vitrification-induced activation of lysosomal cathepsin B perturbs spindle assembly checkpoint function in mouse oocytes, *Molecular human reproduction*, 26(9), pp. 689-701.
59. Keefe D., Liu L., Wang W. and Silva C., 2003, Imaging meiotic spindles by polarization light microscopy: principles and applications to IVF, *Reproductive biomedicine online*, 7(1), pp. 24-29.
60. Pickering S.J. and Johnson M.H., 1987, The influence of cooling on the organization of meiotic spindle of the mouse oocyte, *Human reproduction*, 2(3), pp. 207-216.
61. Van der Elst J., Van den Abbeel E., Jacobs R., Wisse E. and Van Steirteghem A., 1988, Effect of 1, 2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte, *Human reproduction*, 3(8), pp. 960-967.
62. Larman M.G., Sheehan C.B. and Gardner D.K., 2006, Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes, *Reproduction*, 131(1), pp. 53-61.
63. Berthelot-Ricou A., Perrin J., Di Giorgio C., de Meo M., Botta A. and Courbiere B., 2013, Genotoxicity assessment of mouse oocytes by comet assay before vitrification and after warming with three vitrification protocols, *Fertility sterility*, 100(3), pp. 882-888.
64. Tahara M., Tasaka K., Masumoto N., Mammoto A., Ikebuchi Y. and Miyake A., 1996, Dynamics of cortical granule exocytosis at fertilization in living mouse eggs, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 270(5), pp. C1354-C1361.
65. Zhao X.M., Hao H.S., Du W.H., Zhao S.J., Wang H.Y., Wang N., Wang D., Liu Y., Qin T. and Zhu H.B., 2016, Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes, *Journal of Pineal Research*, 60(2), pp. 132-141.
66. Dai J., Wu C., Muneri C.W., Niu Y., Zhang S., Rui R. and Zhang D., 2015, Changes in mitochondrial function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their impacts on apoptosis and developmental ability, *Cryobiology*, 71(2), pp. 291-298.

67. Anchamparuthy V., Pearson R. and Gwazdauskas F., 2010, Expression pattern of apoptotic genes in vitrified-thawed bovine oocytes, *Reproduction in Domestic Animals*, 45(5), pp. e83-e90.
68. Wu H., Yu X.-L., Guo X.-F., Zhang F., Pei X.-Z., Li X.-X., Han W.-X. and Li Y.-H., 2017, Effect of liquid helium vitrification on the ultrastructure and related gene expression of mature bovine oocytes after vitrifying at immature stage, *Theriogenology*, 87, pp. 91-99.
69. Benagiano G. and Gianaroli L., 2004, The new Italian IVF legislation, *Reproductive biomedicine online*, 9(2), pp. 117-125.
70. Chang C.-C., Elliott T.A., Wright G., Shapiro D.B., Toledo A.A. and Nagy Z.P., 2013, Prospective controlled study to evaluate laboratory and clinical outcomes of oocyte vitrification obtained in in vitro fertilization patients aged 30 to 39 years, *Fertility sterility*, 99(7), pp. 1891-1897.
71. Cobo A., Serra V., Garrido N., Olmo I., Pellicer A. and Remohí J., 2014, Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes, *Fertility sterility*, 102(4), pp. 1006-1015. e1004.
72. Takeshige Y., Takahashi M., Hashimoto T. and Kyono K., 2021, Six-year follow-up of children born from vitrified oocytes, *Reproductive biomedicine online*, 42(3), pp. 564-571.
73. Organization W.H., 2021, *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, World Health Organization.
74. Yamane T., 1973, *Statistics: An introductory analysis*.
75. Vitrolife, 2023, *G-MOPSTTM PLUS*, <https://www.vitrolife.com/products/ivf-media--oil/g-mops/>
76. Vitrolife, 2023, *HYASE-10XTM*, <https://www.vitrolife.com/products/ivf-media--oil/hyase-10x/>
77. Scientific F.I., 2023, *Continuous Single Culture-NX with Gentacimin*, <https://irvinescientific-art-eu.fujifilm.com/en/ivf-media/culture-media.html>
78. Kuwayama M., 2017, The human oocyte: Vitrification. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*, CRC Press, pp 322-329.

79. Kofinas J., McCaffrey C. and Grifo J., 2017, Human embryo biopsy procedures. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*, CRC Press, pp 168-176.
80. Zegers-Hochschild F., Adamson G.D., De Mouzon J., Ishihara O., Mansour R., Nygren K., Sullivan E. and Van der Poel S., 2009, The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009, *Human reproduction*, 24(11), pp. 2683-2687.
81. Goldman K.N., Kramer Y., Hodes-Wertz B., Noyes N., McCaffrey C. and Grifo J.A., 2015, Long-term cryopreservation of human oocytes does not increase embryonic aneuploidy, *Fertility sterility*, 103(3), pp. 662-668.
82. Penzias A., Azziz R., Bendikson K., Falcone T., Hansen K., Hill M., Hurd W., Jindal S., Kalra S. and Mersereau J., 2020, Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion, *Fertility sterility*, 114(6), pp. 1151-1157.
83. Vuong T., Vo M. and Ho M., 2015, Predictive value of AMH, FSH and AFC for determining ovarian response in Vietnamese women undergoing assisted reproductive technologies: a prospective study, *JFIV Reprod Med Genet*, 3, pp. 151.
84. Rienzi L., Romano S., Albricci L., Maggiulli R., Capalbo A., Baroni E., Colamaria S., Sapienza F. and Ubaldi F., 2010, Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study, *Human reproduction*, 25(1), pp. 66-73.
85. Buderatska N., Gontar J., Ilyin I., Lavrinenko S., Petrushko M. and Yurchuk T., 2020, Does human oocyte cryopreservation affect equally on embryo chromosome aneuploidy?, *Cryobiology*, 93, pp. 33-36.
86. Sciorio R., Antonini E. and Engl B., 2021, Live birth and clinical outcome of vitrification-warming donor oocyte programme: an experience of a single IVF unit, *Zygote*, 29(5), pp. 410-416.
87. Deng A. and Wang W.-H., 2015, Assessment of aneuploidy formation in human blastocysts resulting from cryopreserved donor eggs, *Molecular Cytogenetics*, 8(1), pp. 1-8.

88. Yu C.-h., Zhang R.-p. and Li J., 2018, A predictive model for high-quality blastocyst based on blastomere number, fragmentation, and symmetry, *Journal of assisted reproduction genetics*, 35, pp. 809-816.
89. Li B., Huang J., Li L., He X., Wang M., Zhang H., He Y., Kang B., Shi Y. and Chen S., 2021, Improving the clinical outcomes by extended culture of day 3 embryos with low blastomere number to blastocyst stage following frozen-thawed embryo transfer, *Archives of Gynecology Obstetrics*, 303, pp. 573-580.
90. Anh P.V., 2022, *Đánh giá ảnh hưởng của tuổi mẹ tới hình thái phôi nang, kết quả sàng lọc bất thường số lượng nhiễm sắc thể ở phôi giai đoạn tiền làm tổ (PGT-A) và tỷ lệ có thai của thụ tinh trong ống nghiệm*, Luận văn Thạc sĩ Sinh học Học viện Khoa học và Công nghệ, Hà Nội.
91. Ngân H.M., 2020, *Nghiên cứu mối liên quan giữa hình thái phôi nang và đột biến nhiễm sắc thể của phôi trong thụ tinh ống nghiệm*, Luận văn Thạc sĩ Sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ, Hà Nội.
92. Minasi M.G., Colasante A., Riccio T., Ruberti A., Casciani V., Scarselli F., Spinella F., Fiorentino F., Varricchio M.T. and Greco E., 2016, Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study, *Human reproduction*, 31(10), pp. 2245-2254.
93. Munné S., Spinella F., Grifo J., Zhang J., Beltran M.P., Fragouli E. and Fiorentino F., 2020, Clinical outcomes after the transfer of blastocysts characterized as mosaic by high resolution Next Generation Sequencing-further insights, *European journal of medical genetics*, 63(2), pp. 103741.
94. Abhari S. and Kawwass J.F., 2021, Pregnancy and neonatal outcomes after transfer of mosaic embryos: a review, *Journal of Clinical Medicine*, 10(7), pp. 1369.
95. Goldman K.N., Hodes-Wertz B., McCulloh D.H., Flom J.D. and Grifo J.A., 2015, Association of body mass index with embryonic aneuploidy, *Fertility sterility*, 103(3), pp. 744-748.
96. Hallisey S., Makhijani R., Thorne J., Godiwala P., Nulsen J., Benadiva C., Grow D. and Engmann L., 2022, The association of obesity with euploidy rates in women undergoing in vitro fertilization with preimplantation genetic testing, *Journal of assisted reproduction genetics*, 39(11), pp. 2521-2528.

97. La Marca A., Minasi M.G., Sighinolfi G., Greco P., Argento C., Grisendi V., Fiorentino F. and Greco E., 2017, Female age, serum antimüllerian hormone level, and number of oocytes affect the rate and number of euploid blastocysts in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles, *Fertility sterility*, 108(5), pp. 777-783. e772.

PHỤ LỤC
DANH SÁCH BỆNH NHÂN

STT	Họ tên	Năm sinh	STT	Họ tên	Năm sinh
1	Đông T. N.	1987	26	Giáp Thị M. T.	1983
2	Đoàn T. N.	1985	27	Phạm Thị L. P.	1984
3	Phùng T. M.	1987	28	Nguyễn T. H.	1979
4	Nguyễn Thị M. N.	1983	29	Nguyễn T. P.	1987
5	Nguyễn T. M.	1987	30	Đoàn T. H.	1983
6	Đỗ T. B.	1982	31	Phạm T. H.	1983
7	Nguyễn T. L.	1984	32	Bùi T. N.	1985
8	Phạm Thị N. Á.	1984	33	Phạm Thị T. H.	1987
9	Đào T. D.	1983	34	Hà T. D.	1982
10	Hà H. V.	2001	35	Đỗ Thị T. H.	1983
11	Hà Thị N. N.	1989	36	Ngô Thị N. H.	1982
12	Hoàng T. N.	1982	37	Lê Thị B. N.	1980
13	Trần Phạm N. H.	1989	38	Bùi Thị N. B.	1982
14	Phạm Thị H. N.	1986	39	Nguyễn Thị H. Q.	1981
15	Đỗ Thị M. N.	1983	40	Hoàng K. N.	1980
16	Phạm Thị T. M.	1982	41	Vũ T. T.	1992
17	Hoàng T. T.	1986	42	Nguyễn T. H.	1979
18	Nguyễn T. H.	1987	43	Trần T. L.	1985
19	Lê Thị P. D.	1987	44	Đoàn T. N.	1986
20	Trần T. X.	1986	45	Nguyễn T. H.	1980
21	Trần T. X.	1978	46	Ngô Thị T. H.	1982
22	Nguyễn Thị T. H.	1983	47	Nguyễn T. H.	1986
23	Nguyễn Thị H. G.	1982	48	Ngô T. H.	1987
24	Vũ Thị T. C.	1980	49	Vũ T. D.	1980
25	Đỗ Thị L. N.	1987	50	Bùi Thị K. D.	1994

DANH SÁCH BỆNH NHÂN

STT	Họ tên	Năm sinh	STT	Họ tên	Năm sinh
51	Nguyễn Thị H. H.	1978	66	Cao P. T.	1985
52	Nguyễn T. Y.	1983	67	Nguyễn T. H.	1983
53	Nguyễn Thị T. D.	1987	68	Nguyễn T. L.	1987
54	Nguyễn Thị N. Q.	1983	69	Nguyễn Thị Q. H.	1989
55	Phan T. H.	1984	70	Nguyễn Thị T. L.	1982
56	Lục Thị V. H.	1982	71	Vũ T. M.	1979
57	Dương A. Q.	1991	72	Tạ Thị M. P.	1994
58	Hoàng T. L.	1981	73	Nguyễn Thị L. A.	1984
59	Nguyễn K. H.	1989	74	Lê Thị T. L.	1982
60	Mạc T. H.	1983	75	Nguyễn Thị B. H.	1982
61	Chu Thị P. N.	1982	76	Đông H. A.	2000
62	Đinh Thị H. O.	1980	77	Nguyễn T. H.	1980
63	Lương T. D.	1985	78	Trần T. H.	1983
64	Nguyễn T. P.	1984	79	Đoàn Thị H. G.	1984
65	Phạm T. H.	1987			

PHIẾU THU THẬP SỐ LIỆU ĐỀ TÀI LVTS

Phần 1: Đặc điểm bệnh nhân và kết quả nuôi cấy/sàng lọc phôi

Mã hồ sơ IVF: **A. Đặc điểm nền**A.1. Tuổi mẹ: A.2. Thời gian vô sinh (năm): A.3. Loại vô sinh: A.5. AMH: A.7. Số chu kỳ chọc trứng: A.4. Chỉ số khối: A.6. Số lượng phôi chuyển: **B. Kết quả nuôi cấy phôi từ noãn tươi**B.1. Số lượng noãn MII tươi B.2. Số noãn thụ tinh bình thường B.3. Số lượng phôi phân chia B.4. Số lượng phôi nang B.3.1. Số lượng phôi loại I B.4.1. Số lượng phôi loại I B.3.2. Số lượng phôi loại II B.4.2. Số lượng phôi loại II B.3.3. Số lượng phôi loại III B.4.3. Số lượng phôi loại III

B.5. Số lượng phôi sinh thiết

B.5.1. Mã số phôi sinh thiết B.5.2. Số lượng phôi nguyên bội B.5.3. Số lượng phôi lệch bội B.5.4. Số lượng phôi thể khảm **C. Kết quả nuôi cấy phôi từ noãn rã**C.1. Số lượng noãn MII đông: C.2. Số lượng noãn MII sống sau rã đông: C.3. Số noãn thụ tinh bình thường: C.4. Số lượng phôi phân chia: C.5. Số lượng phôi nang: C.4.1. Số lượng phôi loại I C.5.1. Số lượng phôi loại I C.4.2. Số lượng phôi loại II C.5.2. Số lượng phôi loại II C.4.3. Số lượng phôi loại III C.5.3. Số lượng phôi loại III

C.6. Số lượng phôi sinh thiết

C.6.1. Mã số phôi sinh thiết C.6.2. Số lượng phôi nguyên bội C.6.3. Số lượng phôi lệch bội C.6.4. Số lượng phôi thể khảm

PHIẾU THU THẬP SỐ LIỆU ĐỀ TÀI LVTS**Phần 2: Kết quả PGT**Mã phôi: A. Tuổi mẹ: B. Nguồn gốc phôi:

[1: Trứng tươi

2: Trứng rã]

C. Hình thái phôi:

[1: Loại I

2: Loại II

3: Loại III]

D. Kết quả PGT-A:

[1: Nguyên bội

2: Lệch bội

3: Khảm]

Phần 3: Kết quả chuyển phôiMã hồ sơ IVF: **A. Đặc điểm phôi chuyển**A.1. Tuổi phôi:

[1: Ngày 5

2: Ngày 6]

A.2. Nguồn gốc noãn:

[1: Trứng tươi

2: Trứng rã]

A.3. Chất lượng hình thái:

[1: Loại I

2: Loại II

3: Loại III]

A.4. Chất lượng di truyền:

[1: Nguyên bội

2: Lệch bội

3: Khảm]

B. Kết cục lâm sàng sau chuyển phôi:

1. Không có thai

3. Thai sinh hoá

5. Thai diễn tiến

2. Có thai

4. Thai lâm sàng

6. Trẻ sinh sống

TỔNG CÔNG TY HÀNG KÈNH - CTCP CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
BỆNH VIỆN QUỐC TẾ SẢN - NHI HẢI PHÒNG **Độc lập – Tự do – Hạnh phúc**

Hải Phòng, ngày 05 tháng 09 năm 2023

**ĐƠN XIN XÁC NHẬN NGHIÊN CỨU
 CHO PHÉP THỰC HIỆN TRÊN BỆNH NHÂN KHÁM VÀ ĐIỀU TRỊ**

Kính gửi: Ban lãnh đạo Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng

Khoa Hỗ trợ Sinh sản – Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng

Tôi tên là: Đào Thị Phương

Sinh ngày: 04 tháng 10 năm 1996

Hiện tại tôi đang công tác tại Khoa Hỗ trợ Sinh sản – Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng. Trong quá trình công tác, tôi có tiến hành nghiên cứu đề tài: “Đánh giá kết quả tạo phôi trong ống nghiệm và sàng lọc di truyền phôi tiền làm tổ từ noãn trữ lạnh tại Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng giai đoạn 05/2021 – 08/2023”. Thời gian nghiên cứu từ tháng 05 năm 2021 đến tháng 08 năm 2023.

Đối tượng nghiên cứu trong đề tài này là: kết quả phôi học về hình thái, kết quả sàng lọc bất thường số lượng nhiễm sắc thể ở phôi giai đoạn tiền làm tổ (PGT-A) và kết quả lâm sàng sau chuyển phôi của các cặp vợ chồng vô sinh đến thăm khám tại Khoa Hỗ trợ Sinh sản – Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng từ tháng 05 năm 2021 đến tháng 08 năm 2023. Các kết quả nghiên cứu không ảnh hưởng tới kết quả của bệnh nhân và đảm bảo vấn đề đạo đức trong nghiên cứu.

GIÁM ĐỐC BỆNH VIỆN

TRƯỞNG KHOA

NGHIÊN CỨU VIÊN


 BỆNH VIỆN QUỐC TẾ SẢN - NHI HẢI PHÒNG
 GIÁM ĐỐC ĐIỀU HÀNH
Phạm Thu Hằng


 BSKL Nguyễn Đức Thuận


 CN. Đào Thị Phương

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN NGHIÊN CỨU HỆ GEN

Số: 44 -2023/ NCHG-HDDĐ
Yv: Chấp thuận DDNCYSH

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – tự do – hạnh phúc

Hà Nội, ngày 02 tháng 03 năm 2023

CHỨNG NHẬN CHẤP THUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH HỌC

Căn cứ Quyết định số 115/QĐ-NCHG ngày 04 tháng 06 năm 2021 của Viện trưởng Viện Nghiên cứu hệ gen về việc thành lập Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học cấp cơ sở.

Căn cứ biên bản họp ngày 02 tháng 03 năm 2023 của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Viện Nghiên cứu hệ gen (IGR IBR) và kiến nghị phê duyệt của chủ nhiệm đề tài về các vấn đề đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học.

HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH HỌC VIỆN NGHIÊN CỨU HỆ GEN

Chấp thuận về các khía cạnh đạo đức đối với đề tài:

Tên đề tài: Đánh giá kết quả tạo phôi trong ống nghiệm và sàng lọc di truyền phôi tiền làm tổ từ noãn trữ lạnh tại Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng giai đoạn 05/2021 – 08/2023.

- Chủ nhiệm đề tài: Đào Thị Phương
- Cơ quan: Học viện Khoa học và Công nghệ Việt nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- Thời gian nghiên cứu: 03/2023 – 08/2023
- Ngày chấp thuận: Ngày 2 tháng 03 năm 2023

PHÓ CHỦ TỊCH

GS. TS. Nguyễn Duy Bắc

VIỆN TRƯỞNG
VIỆN NGHIÊN CỨU HỆ GEN

GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng

CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ

A COMPARISON OF EMBRYONIC, GENETIC AND CLINICAL OUTCOMES BETWEEN FRESH AND VITRIFIED OOCYTE

Phuong Dao Thi^{1,2}, Son Dang Truong¹, Thuan Nguyen Duc¹, Anh Pham Van¹, Anh Do Tuan¹,

Van Hanh Nguyen^{2,3,*}

¹HP Fertility – Hai Phong International Hospital of Obstetrics and Pediatrics, Haiphong, 100000

Vietnam

²Graduate Unive

Hanoi, 100000

³Institute of Bio

Asian Pacific Journal of
Reproduction

Q3

Obstetrics and
Gynecology

best quartile

SJR 2022

0.19



powered by scimagojr.com

The screenshot shows the Medknow journal submission system interface. The top navigation bar includes links for HOME, SUBMIT NEW MANUSCRIPT, TEMPLATES, REPORTS, HELP, COMMENTARY INVITATION, LETTERS ON ARTICLES, ANNOUNCEMENT, and NOTIFICATION. The user is logged in as HANH (Author). The main content area displays 'View Comments And Files' for a manuscript with ID 'apjr_98_23'. The comments section contains a message from the reviewer: 'Dear author, Thank you for your patience. Please revise the manuscript well as per the peer reviewers' and editors' comments. We will re-review and make final decision on your revised manuscript accordingly. All your revisions should be marked in color. Thank you!' and a reviewer note: 'The MS has minor changes, required to be incorporated.' The interface also shows a sidebar with 'Dashboard' and 'Manuscript' sections.

Comment	Version	Date	File
<p>Dear author, Thank you for your patience. Please revise the manuscript well as per the peer reviewers' and editors' comments. We will re-review and make final decision on your revised manuscript accordingly. All your revisions should be marked in color. Thank you!</p> <p>Reviewer: The MS has minor changes, required to be incorporated.</p>			

**A COMPARISON OF EMBRYONIC, GENETIC AND CLINICAL OUTCOMES BETWEEN
FRESH AND VITRIFIED OOCYTE**

**Phuong Dao Thi^{1,2}, Son Dang Truong¹, Thuan Nguyen Duc¹, Anh Pham Van¹, Anh Do Tuan¹,
Van Hanh Nguyen^{2,3,*}**

¹HP Fertility – Hai Phong International Hospital of Obstetrics and Pediatrics, Haiphong, 100000
Vietnam

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,
Hanoi, 100000 Vietnam

³Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, 100000 Vietnam

**Corresponding author email: nvhanh@ibt.ac.vn*

ABSTRACT

Oocyte cryopreservation (OC) has been deemed a crucial technique in assisted reproductive technology by fertility preservation. This study made a comparison of embryonic development and ploidy status between fresh and frozen-thawed eggs. The patient underwent several ovarian stimulation cycles to accumulate a certain number of eggs, that would be vitrified. In the last oocyte retrieval (OR), all patient's eggs including both frozen and fresh would be fertilised with spermatozoa by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). This data was retrospectively collected from 79 patients with 83 ICSI cycles. The total number of fresh mature oocytes is 410 and the figure for the frozen oocyte group is 565 with a 95.5% survival rate after thawing. The results showed that there was no statistically significant difference when comparing fresh and frozen oocytes regarding fertilisation rate (78.1% and 75.5%, $P = 0.461$), usable cleavage embryo rate (86.9% and 87.2%, $P = 0.916$) but usable blastocyst rate was found higher statistically in frozen oocyte group (54% and 44.4%, 95% CI 0.00, 0.19; $P = 0.049$). This study also revealed that the percentages of euploid, aneuploid and mosaic embryos between the fresh group and vitrified group had no significant differences (31.9% and 32%, $P = 0.984$; 54.6% and 53.2%, $P = 0.806$; 13.5% and 14.8%, $P = 0.821$; respectively). In terms of clinical outcomes, the pregnancy rate, the biochemical pregnancy rate and the clinical pregnancy rate had no statistical difference (25% and 40.9%, $P=0.764$; 4.5% and 2.3%, $P=0.258$; 13.6% and 29.5%,

$P=0.565$). In addition, this study also estimated that 17 mature oocytes are the minimum to have at least one euploid embryo. We suggest that oocytes can be cryopreserved for accumulation to postpone insemination in certain indications without affecting embryology, clinical and genetic results. The number of mature oocytes should be considered for fertilisation in some cases.

Keywords: Oocyte cryopreservation, vitrified oocyte, embryonic development, ploidy status.

INTRODUCTION

In vitro fertilisation (IVF) plays an important role in supporting infertile couples to have children. Reproductive health can be affected by many different factors such as environmental pollutant exposure, unhealthy lifestyle, medicine-taking habits and reproductive system dysfunction. Nowadays, lots of research-based techniques are applied for patients to optimise treatment results and egg freezing is one of them, giving a chance for women to shift their time of motherhood or have their babies without an oocyte donation.

The ovum is fertilized with sperm into an embryo and then transferred to the patient's uterus. In case of fertilization is not performed immediately after oocyte retrieval, these should be frozen to preserve their morphology and function. Among reproductive cells and tissues, oocytes are most vulnerable to damage during cryopreservation. This sensitivity is mainly due to the large cell size, low surface area relative to volume, and ice crystal formation resulting in a survival rate of only 75% for the slow freezing method [1]. Oocytes damaged during cryopreservation may affect the structure of microfilaments and microtubules which are responsible for normal chromosomal segregation. Functional changes in mitochondria harden the zona pellucida (ZP) that prevent natural sperm penetration [2]. However, it has been shown that the spindle could be reassembled again in most oocytes after the vitrification and thawing process [3, 3]. Moreover, several studies stated that oocyte cryopreservation does not increase pregnancy complications and frequency of developmental abnormalities [4, 4]. Since the first baby was born from frozen oocytes [5], numerous studies conducted worldwide using vitrification techniques have consistently demonstrated enhanced efficiency in oocyte cryopreservation, resulting in improved outcomes for both embryonic development and clinical success rates[6] but some research give a deep insight into ploidy status

including euploidy, aneuploidy and mosaicism not mention to how many oocytes need to be obtained through accumulating cycles for euploidy result. This study aims for the following goals: (1) whether the potential development and pregnancy outcome of oocytes are affected by vitrification; (2) compare genetic results of embryos derived from fresh oocytes vs. frozen eggs; and (3) give a cut-off number of mature oocytes to get at least one euploid embryo.

MATERIALS AND METHODS

A retrospective analysis was performed of OC cycles completed at the HP Fertility at Hai Phong International Hospital of Obstetrics and Pediatrics. Patients were included if they had a fertilisation cycle with frozen eggs, blastocyst culture and trophectoderm biopsy for preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) between May 2021 and May 2023. Data collection was divided into fresh and frozen oocytes of each patient. During the last oocyte retrieval cycle, frozen eggs would be warmed and fertilised at the same time as fresh ones. Most patients performed multiple OC so patient characteristics were obtained from the first cycle to limit data missing. This research does not include cases having patients having cleavage embryo freezing because of concern about affecting the usable blastocyst rate. Donation cycles were also excluded from the data to control maternal factors. Another excluding criterion was a couple having infertility caused by male factor: moderate male factor (MMF), severe oligoasthenoteratozoospermia (OAT-S), obstructive azoospermia (OA), and nonobstructive azoospermia (NOA) that has been found impairing fertilization rate and developmental potential [7].

Parameters were used for comparison including the total number of mature oocytes (metaphase II – MII), fertilisation rate, usable cleavage embryo rate, usable blastocyst rate, euploidy rate, aneuploidy rate and mosaic rate. The fertilisation rate definition was the number of two pronuclei (2PN) zygotes per the number of MII oocytes fertilised with sperm. The usable cleavage embryo rate and usable blastocyst rate were defined as the number of cleavage and blastocyst embryos per 2PN zygotes. Euploidy was the normal complete set of 46 chromosomes while aneuploidy was a genetic disorder where the total number of chromosomes does not equal 46. Mosaicism was defined as the presence of two or more cell lines with different genotypes arising from a single embryo. Pregnancy was

confirmed when a beta-hCG test on day 9 or 10 after embryo transfer showed a result greater than 25 IU/L. Biochemical pregnancy was defined as one where despite the beta hCG test being “positive”, the pregnancy fails to progress to the point of ultrasound confirmation and never reaches the stage where a gestational sac is seen on ultrasound examination. Clinical pregnancy was the actual pregnancy confirmed by ultrasound by a transvaginal transducer with the presence of an amniotic sac, embryo, and fetal heart after 3-4 weeks of embryo transfer.

Our procedures were based on the revised guidelines for good practice in IVF laboratories [8] and we stated that the procedures were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000.

Oocyte vitrification

Oocyte freezing uses Vitrification Kit 101 and the Cryotec method [9]. After oocyte retrieval, oocyte cumulus complexes (OCC) were cultured in an incubator at 37°C, 5% O₂ and 6% CO₂ for 2 hours before oocytes were denuded from granulosa and corona cells by hyaluronidase 80 IU/mL. Vitrification started with oocytes equilibrated in ES medium containing 7% EG (ethylene glycol), 7% DMSO (dimethyl sulfoxide) for up to 15 min before being transferred to vitrification medium (VS) containing 14.5% EG, 14.5% DMSO, 0.5 M trehalose for up to 90 seconds. The oocytes were loaded onto the Cryotec straw surface with minimal media volume and then directly embedded in the cooling rack containing liquid nitrogen. Close the Cryotec plastic cap and keep the oocyte in the storage container.

Oocyte thawing

The thawing protocol was based on the Cryotec method [9] using Warming Solution Set 205. Prepare the thawing medium (TS) containing 1.0 M trehalose and thawing plate in a heated incubator for at least 2 hours before use. Remove the cap and place the straw in liquid nitrogen. Pour TS into a warming plate and insert straw immediately into TS (within 1 second) and stay still for 1 minute, and then transfer oocyte to the diluent solution (DS) containing 0.5 M trehalose and keep in there within 3 minutes. After 3 minutes, aspirate oocytes from DS to expel to washing solution 1 (WS) for 5 minutes

and place to WS2 for 1 minute. In the end, oocytes were transferred into a culture dish and observed under a stereoscope.

Intracytoplasmic sperm injection and embryo culture

In the last OR cycle at 39 – 41 hours post trigger for initiation of oocyte maturation, ICSI was performed with fresh mature oocytes (MII) and frozen MII that had survived after thawing. Sperm was prepared by gradient or swim-up method before being used for injection. The oocytes after ICSI were cultured continuously in the single-step medium in a time-lapse incubator using mixed gas with a concentration of 6% CO₂, 5% O₂ and 37°C.

Embryo grading

Cleavage embryo was assessed on day 3 regarding the number of blastomere and fragmentation degree and blastocyst was based on 3 criteria including embryo expansion, inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE). Usable embryos are embryos with grades I, II, and III according to the morphological classification criteria of David Gardner [10] and the Istanbul consensus workshop on embryo assessment [11]

Blastocyst biopsy

Cleavage embryos underwent laser-assisted hatching on day 3 or day 4 to create a tunnel on zona pellucida (ZP). On day 5 or day 6, several trophectoderm cells extruding from ZP would be removed without inner cell mass (ICM) disruption. These biopsied cells were tubed and transferred to a genetic laboratory for analysis.

Statistical Analysis

Data were analyzed using a *t-test* for unusual variance and the chi-square (χ^2) test to compare the differences between ratios. The area under the receiver operating characteristics (ROC) curve (AUC) was used to determine the value of the predictor and the Youden index estimate the minimum number of MII oocytes to obtain at least one euploid blastocyst for transfer. Statistical difference was defined when $P < 0.05$

RESULTS

Seventy-nine patients underwent 83 ICSI cycles with a total of 410 fresh oocytes and 545 cryopreserved eggs between May 2021 and May 2023. Patients accepted for egg freezing because of the following reasons: MII accumulation (n = 81), planned OC (n = 2). Women characteristics in this study were described by parameters in Table 1 including the mean age, infertility duration, BMI, AMH, number of OR cycle and the average number of fresh and frozen oocytes per ICSI cycle

Table 4. Patient characteristics

	Mean	Std. Deviation
Maternal age	37.7	4.2
Infertility duration	2.9	2.4
BMI	21.8	2.1
AMH	1.5	1.4
Number of OR cycle	2.9	1.5
Mean MII per ICSI cycle	5.2	3.8

A total of 565 oocyte obtained in previous cycles was vitrified and 545 of these were survival after thawing resulting in the oocyte survival rate stood at 96.5%. There was a significant lower in the quantity between fresh and frozen oocyte fertilised (4.9 ± 3.7 vs. 6.6 ± 3.6 , $P=0.005$) but no differences were found in the rate of fertilisation (78.1% vs. 75.5%, $P=0.461$) and the usable cleavage embryo rate (86.9% vs. 87.2%, $P=0.916$). The usable blastocyst rate was lower significantly in the fresh group compared with the vitrified group (44.4% vs. 54.0%, 95% CI 0.00, 0.19; $P=0.049$). When it comes to the ploidy status of embryos derived from fresh and frozen eggs, the euploidy and mosaicism rate in the former group were lower than the latter group (31.9% vs. 32.0%, $P=0.984$; 13.5% vs. 14.8%, $P=0.821$) while the rate of aneuploid embryos tends to go on the opposite side (54.6% vs. 53.2%, $P=0.806$). However, these numbers did not reach statistical significance (Table 2).

Table 5. Laboratory outcomes

	Fresh (n = 72)	Frozen (n = 83)	P value
Total of MII retrieved	410	565	
Total of survival MII		545	
Oocyte Survival Rate (%)		96.5	
Mean MII ICSI	4.9 ± 3.7	6.6 ± 3.6	0.005
Fertilisation rate	78.1	75.5	0.461
Usable cleavage embryo rate	86.9	87.2	0.916
Usable blastocyst rate	44.4	54.0	0.049
Euploidy rate	31.9	32.0	0.984
Aneuploidy rate	54.6	53.2	0.806
Mosacism rate	13.5	14.8	0.821

A total of 44 frozen embryo transfer (FET) cycles were performed, of which 16 were derived from fresh eggs and 28 developed from frozen oocytes. Outcomes between the two groups including the number of beta-hCG (+) cases, the number of biochemical pregnancy cases, the number of clinical pregnancy cases, pregnancy rate, biochemical pregnancy rate and clinical pregnancy rate were described on Table 3

Table 6. Clinical outcomes

	Fresh (n = 16)	Frozen (n = 28)	P value
The number of beta-hCG (+) cases	11	18	
The number of biochemical pregnancy cases	2	1	
The number of clinical pregnancy cases	6	13	
Pregnancy rate (%)	25	40.9	0.764
Biochemical pregnancy rate (%)	4.5	2.3	0.258
Clinical pregnancy rate (%)	13.6	29.5	0.565

To account for the value of the MII quantity predictor detecting euploid blastocyst, the ROC curve was used depending on two variances including the number of euploid embryos and the number of MII being fertilised. The result showed that AUC was 60.3% ($P=0.124$, 95% CI 47.8 – 72.8) which was valid in detecting euploid blastocyst (Fig. 1). The Youden index identified 17 mature oocytes per ICSI cycle as the threshold for at least 1 euploid blastocyst with optimal sensitivity and specificity standing at 19% and 100%, respectively.

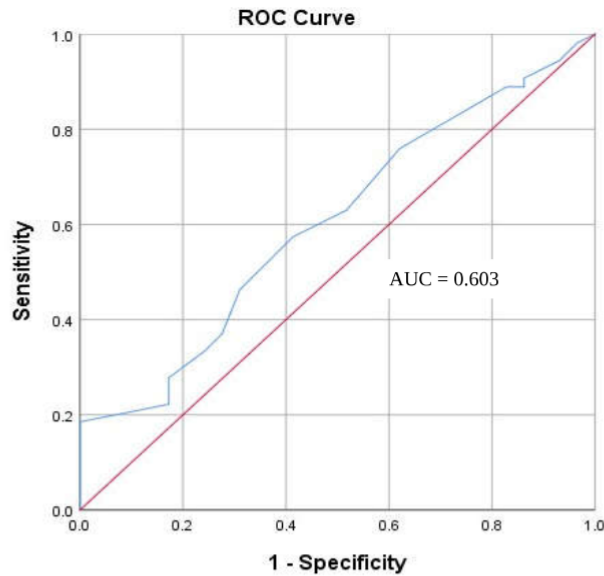


Figure 2. ROC curve showing true positive (horizontal axis) and false positive (vertical axis) of the factor of MII oocyte quantity in detecting euploid embryos in ICSI cases using frozen eggs

DISCUSSION

The mean age of women in this study was quite high compared to previous research in relation to ploidy status [12] because most cases included had the sign of diminished ovarian reserve with mean AMH serum level of 1.5 being considered low. Because diminished ovarian reserve is associated with poor ovarian response [13], only 5.2 oocytes per cycle of ovarian stimulation are obtained in our study. This was the reason why there was a difference in the average number of MII oocytes per ICSI cycle between the fresh and frozen groups. Many studies have shown that the oocyte survival rate is significantly improved with the vitrification method ranging from 92% to 97% [14] and so similar to our result of 96.5%. Our results demonstrated no difference between fresh and cryopreserved oocytes in fertilisation rate and usable cleavage embryo rate but the usable blastocyst rate was found lower significantly in the former group and this could be explained by the significant difference in the mean MII oocyte per ICSI cycle between two groups. Thus, it might be a confounder factor in our study. Despite the usable blastocyst rate difference, embryos that survive culture to the blastocyst stage

display equivalent rates of euploidy, aneuploidy, and mosaicism compared with blastocysts derived from fresh oocytes. Our data suggested that oocyte vitrification has no detrimental effect on chromosomal competence, further supporting the efficacy and safety of this technology. Clinical outcomes reflected better results in vitrified oocytes in comparison with the fresh group but differences were not statistically significant. Results of this retrospective study indicated that, overall, the number of mature oocytes can be the predictor of at least one euploid blastocyst. Nevertheless, the AUC did not reach statistical significance because out of the 83 cycles, only 10 with at least 17 mature eggs were fertilized, representing 12% of the dataset. In our study, an MII cut-off value of 17 had a sensitivity of 19% and a specificity of 100%. When it comes to the need of having euploid blastocyst for transfer, a predictor with 100% specificity may be considered acceptable for aged women. However, we suggested that subsequent studies may further evaluate other maternal-related predictors such as age, AMH, and BMI to find a better predictor of both sensitivity and specificity.

CONCLUSION

The embryonic and clinical results of the oocytes are less affected by vitrification. The number of MII oocytes fertilized per ICSI cycle can be used to predict ploidy in the group using frozen oocytes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Institute of Biotechnology, VAST, Vietnam and the doctors, embryologists, nurses and midwife at Hai Phong International of Obstetrics and Pediatrics, who all contributed to patient care.

REFERENCES

1. Cao Y-X, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang Z-G, Wei Z-L, et al. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. 2009; 92(4): 1306-1311.

2. Jones A, Van Blerkom J, Davis P and Toledo A A J H R. Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. 2004; 19(8): 1861-1866.
3. Gook D A, Osborn S M, Bourne H and Johnston W J H R. Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes. 1994; 9(4): 684-691; Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, Minasi M-G, Iacobelli M, Tesarik J, et al. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. 2004; 19(3): 655-659.
4. Chian R-C, Huang J Y, Tan S L, Lucena E, Saa A, Rojas A, et al. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. 2008; 16(5): 608-610; Forman E J, Li X, Ferry K M, Scott K, Treff N R, Scott Jr R T J F, et al. Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: a novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting. 2012; 98(3): 644-649.
5. Chen C J T L. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. 1986; 327(8486): 884-886.
6. Oktay K, Cil A P, Bang H J F and sterility. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. 2006; 86(1): 70-80; Edgar D H and Gook D A J R B O. How should the clinical efficiency of oocyte cryopreservation be measured? 2007; 14(4): 430-435; Borini A, Cattoli M, Bulletti C and Coticchio G J A o t N Y A o S. Clinical efficiency of oocyte and embryo cryopreservation. 2008; 1127(1): 49-58.
7. Mazzilli R, Cimadomo D, Vaiarelli A, Capalbo A, Dovere L, Alviggi E, et al. Effect of the male factor on the clinical outcome of intracytoplasmic sperm injection combined with

- preimplantation aneuploidy testing: observational longitudinal cohort study of 1,219 consecutive cycles. 2017; 108(6): 961-972. e963.
8. Labs E G G o G P i I, De los Santos M J, Apter S, Coticchio G, Debrock S, Lundin K, et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). 2016; 31(4): 685-686.
 9. Gandhi G, Kuwayama M, Kagalwala S and Pangerkar P. Appendix A: Cryotech® Vitrification Thawing. Cryopreservation of Mammalian Gametes and Embryos: Methods and Protocols, Z. P. Nagy, A. C. Varghese and A. Agarwal. Springer New York, New York, NY.2017, pp. 281-295.
 10. Sakkas D and Gardner D K. Evaluation of embryo quality analysis of morphology and physiology. Textbook of Assisted reproductive techniques. CRC Press.2017, pp. 225-242.
 11. Medicine A S i R and Embryology E S I G o. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting†. Human Reproduction. 2011; 26(6): 1270-1283.
 12. Goldman K N, Kramer Y, Hodes-Wertz B, Noyes N, McCaffrey C, Grifo J A J F, et al. Long-term cryopreservation of human oocytes does not increase embryonic aneuploidy. 2015; 103(3): 662-668; Buderatska N, Gontar J, Ilyin I, Lavrinenko S, Petrushko M and Yurchuk T J C. Does human oocyte cryopreservation affect equally on embryo chromosome aneuploidy? 2020; 93: 33-36.
 13. Vuong T, Vo M and Ho M J J R M G. Predictive value of AMH, FSH and AFC for determining ovarian response in Vietnamese women undergoing assisted reproductive technologies: a prospective study. 2015; 3: 151.

14. Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J J F, et al. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. 2008; 89(6): 1657-1664; Cobo A, Meseguer M, Remohí J and Pellicer A J H r. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. 2010; 25(9): 2239-2246; Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R, Capalbo A, Baroni E, et al. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. 2010; 25(1): 66-73.