

PHẠM DƯƠNG TOÀN

SINH HỌC THỰC NGHIỆM

NĂM 2024

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO  
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VN



PHẠM DƯƠNG TOÀN

HIỆU QUẢ CỦA VIỆC BỔ SUNG GM-CSF TRONG  
MÔI TRƯỜNG CAPA-IVM LÊN TỈ LỆ TẠO PHÔI NANG  
TRÊN BỆNH NHÂN HIẾM MUỘN  
CÓ HỘI CHỨNG BUỒNG TRỨNG ĐA NANG (PCOS)

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

*Hà Nội - Năm 2024*

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO  
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VN  
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



**PHẠM DƯƠNG TOÀN**

**HIỆU QUẢ CỦA VIỆC BỔ SUNG GM-CSF TRONG  
MÔI TRƯỜNG CAPA-IVM LÊN TỈ LỆ TẠO PHÔI NANG  
TRÊN BỆNH NHÂN HIẾM MUỘN  
CÓ HỘI CHỨNG BUỒNG TRỨNG ĐA NANG (PCOS)**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

**Mã số: 8420114**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:  
PGS. TS. VƯƠNG THỊ NGỌC LAN**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Vương Thị Ngọc Lan", is written over a horizontal line.

**Hà Nội - Năm 2024**

## 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 chịu trách nhiệm trước pháp luật.

**Tác giả luận văn**



**Phạm Dương Toàn**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành đến PGS.TS.BS Vương Thị Ngọc Lan, người đã dìu dắt và hướng dẫn tôi hoàn thành luận văn này. Cảm ơn Học viện Khoa học và Công nghệ đã cho phép và tạo điều kiện cho tôi thực hiện luận văn này. Bên cạnh đó, xin cảm ơn bệnh viện đa khoa Mỹ Đức đã tạo điều kiện tối đa cho tôi lấy mẫu và tiến hành nghiên cứu. Cảm ơn các bạn chuyên viên phôi học và bác sĩ đã hỗ trợ tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu, thu thập dữ liệu. Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số FWO.106-YS.2017.02.

**Tác giả luận văn**



**Phạm Dương Toàn**

## MỤC LỤC

<b>LỜI CAM ĐOAN</b> .....	<b>i</b>
<b>LỜI CẢM ƠN</b> .....	<b>ii</b>
<b>MỤC LỤC</b> .....	<b>iii</b>
<b>DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT</b> .....	<b>v</b>
<b>DANH MỤC CÁC BẢNG</b> .....	<b>vi</b>
<b>DANH MỤC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ</b> .....	<b>vii</b>
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	<b>1</b>
<b>NỘI DUNG NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>3</b>
<b>Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>4</b>
1.1. Lịch sử phát triển của kỹ thuật trưởng thành noãn trong ống nghiệm .....	4
1.3.1. Mô hình trưởng thành noãn trong ống nghiệm dựa trên sinh lí trưởng thành của noãn in vivo .....	6
1.3.2. Môi trường CAPA-IVM .....	8
1.3. Tính mới của đề tài .....	11
<b>Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>12</b>
2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	12
2.2. Đối tượng nghiên cứu .....	12
2.2.1. Dân số mục tiêu .....	12
2.2.2. Dân số nghiên cứu .....	12
2.2.3. Dân số chọn mẫu .....	12
2.3. Cỡ mẫu.....	13
2.4. Cách chọn mẫu.....	13
2.5. Địa điểm và thời gian nghiên cứu .....	13
2.6. Phương pháp tiến hành.....	13
2.6.1. Quy trình tiến hành nghiên cứu .....	13
2.6.2. Dụng cụ, môi trường và trang thiết bị sử dụng cho nghiên cứu .....	20
2.6.5. Thu thập, quản lý và phân tích số liệu .....	22
<b>Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....	<b>23</b>
3.1. Đặc điểm nền của bệnh nhân được thu nhận noãn cho nghiên cứu .....	23

3.1.1. Đặc điểm nền của BN tham gia nghiên cứu được trình bày trong Bảng 3.1.	24
3.2. Nội dung 1.....	27
3.3. Nội dung 2.....	32
3.4. Nội dung 3.....	38
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>42</b>
<b>DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....</b>	<b>44</b>
<b>DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>45</b>
<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>50</b>

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

<b>Từ viết tắt</b>	<b>Tiếng Anh</b>	<b>Tiếng Việt</b>
<b>CAPA</b>	Capacitation	Môi trường tiền nuôi cấy trưởng thành
<b>CNP</b>	c-type natriuretic peptide	
<b>eCRF</b>	Electronic case report form	Bảng thu thập số liệu điện tử
<b>FSH</b>	Follicle stimulating hormone	Nội tiết tố kích thích nang noãn
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	
<b>ICSI</b>	Intracytoplasmic Sperm Injection	Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn
<b>IVF</b>	In vitro fertilization	Thụ tinh ống nghiệm
<b>IVM</b>	In vitro maturation	Nuôi trưởng thành trứng non
<b>KTBT</b>		Kích thích buồng trứng
<b>PCOS</b>	Polycystic Ovary Syndrome	Hội chứng buồng trứng đa nang
<b>PN</b>	Pronucleus	Tiền nhân
<b>QKBT</b>		Quá kích buồng trứng
<b>TTON</b>		Thụ tinh trong ống nghiệm

**DANH MỤC CÁC BẢNG**

Bảng 2.1. Tiêu chuẩn đánh giá phôi nang .....	18
Bảng 2.2. Phân loại chất lượng phôi nang.....	18
Bảng 2.3. Các thông số động học phát triển của phôi .....	19
Bảng 2.4. Danh mục thiết bị sử dụng cho nghiên cứu .....	20
Bảng 2.5. Danh mục dụng cụ sử dụng cho nghiên cứu.....	20
Bảng 2.6. Danh mục môi trường tạo phôi và nuôi cấy phôi .....	21
Bảng 3.1. Đặc điểm nền bệnh nhân.....	24
Bảng 3.2. Kết quả điều trị trưởng thành noãn non trong ống nghiệm.....	27
Bảng 3.3. Kết quả động học phát triển của phôi .....	32
Bảng 3.4. Kết quả động học phát triển của phôi có chất lượng loại 1 và 2.....	35
Bảng 3.5. Kết quả động học phát triển của phôi có chất lượng loại 3 .....	36
Bảng 3.6. Kết quả sự phát triển của phôi và kết quả thai .....	38



## DANH MỤC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Mô hình SPOM [4].....	7
Hình 1.2. Ứng dụng các chất trì hoãn giảm phân [46] .....	7
Hình 1.3. Tác động các chất trì hoãn noãn giảm phân [46] .....	8
Hình 1.4. Cơ chế tác dụng CNP trong ức chế giảm phân [27].....	9
Hình 1.5. Cơ chế tác dụng GM-CSF giúp tăng cường hấp thụ Glucose [39] .....	11
Hình 2.1. Các giai đoạn phân loại trong sự trưởng thành noãn theo ESHRE (IVFMD) .....	15
Hình 2.2. Phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn .....	17
Hình 3.1. Lưu đồ nhận bệnh và phân nhóm ngẫu nhiên .....	23
Hình 3.2. Phân bổ các đặc điểm chính quyết định thành công của điều trị TTON ..	25
Hình 3.3. Biểu đồ nội tiết tố của CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF và nhóm chứng .....	26
Hình 3.4. Noãn thu nhận được ở 1 chu kỳ CAPA-IVM.....	28
Hình 3.5. Động học phát triển của phôi .....	33
Hình 3.6. Kết quả động học phát triển của phôi phân tích theo chất lượng phôi .....	37

## MỞ ĐẦU

Kỹ thuật trưởng thành noãn trong ống nghiệm (in vitro maturation - IVM) được công nhận là một kỹ thuật điều trị hỗ trợ sinh sản chính thống. Kỹ thuật này đã được chứng minh mang lại tính an toàn, thân thiện cao hơn trong khi giảm chi phí cho bệnh nhân nhưng vẫn đảm bảo hiệu quả không kém hơn ở nhóm phụ nữ hiếm muộn có hội chứng buồng trứng đa nang (polycystic ovary syndrome – PCOS) [14]. Trong kỹ thuật IVM, bệnh nhân không thực hiện kích thích buồng trứng (KTBT) hoặc chỉ sử dụng một lượng tối thiểu Follicle-Stimulating Hormone (FSH), Human chorionic gonadotropin (hCG) dưới dạng “môi”, do đó, tránh được các biến chứng của KTBT như hội chứng quá kích buồng trứng (HC QKBT), xoắn buồng trứng, huyết khối tĩnh mạch so với các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm (TTON) có KTBT [15]. Hiện nay, đã có hơn 4.000 em bé ra đời từ kỹ thuật IVM trên thế giới. Các nghiên cứu hiện tại không ghi nhận có sự tăng thêm nguy cơ bất thường nào liên quan đến thượng di truyền, di truyền và sức khỏe trẻ sinh ra sau IVM so với trẻ sinh ra sau TTON hay thai kỳ tự nhiên [37].

Ở giai đoạn đầu phát triển của kỹ thuật IVM, tỷ lệ trưởng thành noãn ở người chỉ vào khoảng 30-50%, thấp hơn nhiều so với các chu kỳ có kích thích buồng trứng. Điều này dẫn tới tỉ lệ thai của IVM là thấp [49]. Việc hiểu sâu sắc hơn về cơ chế trưởng thành của noãn giúp ngày càng hoàn thiện điều kiện nuôi cấy trưởng thành và cải thiện tỉ lệ thành công của IVM. Một trong các lý do làm cho noãn non được nuôi cấy trưởng thành noãn trong ống nghiệm có tiềm năng phát triển phôi kém hơn TTON là sự không đồng bộ giữa trưởng thành nhân và tế bào chất của noãn sau nuôi cấy IVM [48]. Theo Pincus, Chang và Edwards, khi còn trong buồng trứng, noãn ở các giai đoạn trưởng thành khác nhau, sau khi được chọc hút noãn lấy ra ngoài, nhân của noãn sẽ tự khôi phục giảm phân. Để đồng bộ hóa sự trưởng thành của nhân và tế bào chất, môi trường trưởng thành noãn CAPA-IVM có bổ sung C-type natriuretic peptide (CPN) đã được áp dụng và ghi nhận có hiệu quả cải thiện tỉ lệ trưởng thành noãn và chất lượng phôi [51]. Tuy nhiên, trong giai đoạn đầu của môi trường IVM sử dụng cơ chế c-type natriuretic peptide (CNP) trên người cho kết quả tạo phôi và chất lượng phôi ngày 3 tương đối thấp so với môi trường IVF cổ điển do đó việc nuôi đến giai đoạn ngày 5 là không khả thi [57]. Do đó, việc tối ưu hóa môi trường CAPA-IVM là cần thiết và một trong các nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến tiềm năng phát triển của phôi đến giai đoạn ngày 5 là các yếu tố tăng trưởng như: EGF [35], IFG-I [55], BDNF [36] granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) [34, 33].

Trong số đó, GM-CSF là yếu tố tăng trưởng đã được chứng minh là giúp cải thiện kết quả tạo phôi cũng như phôi tốt ngày 5 trên người đối với môi trường IVF cổ điển [67]. Ở chuột, phức hợp tế bào noãn (COCs - Cumulus-oocyte complexes) biểu hiện mRNA cho tiểu đơn vị  $\alpha$  của thụ thể GM-CSF, được báo cáo là tạo điều kiện thuận lợi cho việc hấp thu glucose và do đó thúc đẩy khả năng tồn tại và tăng sinh trong một số dòng tế bào nhất định từ đó giúp cải thiện kết quả phôi ngày 5 [60]. Tuy nhiên, hiện chưa có nghiên cứu nào đánh giá hiệu quả và tính an toàn của việc bổ sung GM-CSF vào môi trường nuôi cấy trưởng thành noãn trong kỹ thuật CAPA-IVM trên người.

Bệnh viện Mỹ Đức đã thực hiện thành công CAPA-IVM từ năm 2016. Chúng tôi đã thực hiện thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có nhóm chứng so sánh CAPA-IVM và TTON và ghi nhận không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ trẻ sinh sống giữa 2 kỹ thuật này [57]. Trong nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng này, chúng tôi chỉ thực hiện chuyên phôi ngày 3. Việc nuôi phôi đến ngày 5 sẽ giúp hoàn thiện hệ thống nuôi cấy phôi bằng kỹ thuật CAPA-IVM từ đó giúp cải thiện tỷ lệ thành công của kỹ thuật này.

Với mong muốn tăng tỷ lệ tạo phôi nang của kỹ thuật CAPA-IVM, chúng tôi thực hiện nghiên cứu bổ sung GM-CSF vào môi trường nuôi cấy trưởng thành noãn với giả thuyết rằng việc bổ sung GM-CSF vào môi trường nuôi cấy IVM ở người sẽ làm tăng tỷ lệ tạo phôi nang tương đương với tỷ lệ từ kỹ thuật thụ tinh ống nghiệm, giúp cho kỹ thuật CAPA-IVM trở thành một lựa chọn lâm sàng khả thi cho những bệnh nhân thực hiện hỗ trợ sinh sản. Mục tiêu của nghiên cứu này là so sánh tỷ lệ tạo phôi nang của nhóm bệnh nhân điều trị CAPA-IVM có noãn được nuôi cấy trưởng thành trong môi trường có bổ sung GM-CSF với nhóm không bổ sung GM-CSF.

Dựa trên những phát hiện này, nghiên cứu thử nghiệm này nhằm mục đích đánh giá hiệu quả của việc bổ sung GM-CSF vào môi trường nuôi cấy trong kỹ thuật CAPA-IVM với giả thuyết rằng việc bổ sung GM-CSF vào môi trường nuôi cấy IVM ở người sẽ làm tăng tỉ lệ tạo phôi nang tương đương với tỉ lệ từ kỹ thuật IVF, giúp cho kỹ thuật CAPA-IVM trở thành một lựa chọn lâm sàng khả thi cho những bệnh nhân thực hiện hỗ trợ sinh sản. Nghiên cứu được thực hiện với câu hỏi nghiên cứu: “Việc bổ sung GM-CSF vào môi trường CAPA-IVM có giúp cải thiện kết quả tạo phôi ngày 5 trên nhóm bệnh nhân PCOS hay không?”

## **NỘI DUNG NGHIÊN CỨU**

**NỘI DUNG 1:** So sánh các kết cục phôi học (tỉ lệ noãn trưởng thành, tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi nang) của môi trường CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF vào môi trường CAPA-IVM so với nhóm không bổ sung GM-CSF.

**NỘI DUNG 2:** So sánh động học phát triển phôi của môi trường CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF vào môi trường CAPA-IVM so với nhóm không bổ sung GM-CSF.

**NỘI DUNG 3:** So sánh các kết cục lâm sàng (tỉ lệ thử thai dương tính, tỉ lệ thai lâm sàng, tỉ lệ sảy thai, tỉ lệ thai diễn tiến và tỉ lệ làm tổ) của môi trường CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF vào môi trường CAPA-IVM so với nhóm không bổ sung GM-CSF.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN CỦA KỸ THUẬT TRƯỞNG THÀNH NOÃN TRONG ống NGHIỆM

Kỹ thuật trưởng thành noãn trong ống nghiệm - IVM được báo cáo lần đầu bởi Pincus và cộng sự trong những năm 1930, trong đó thỏ là loài được thử nghiệm đầu tiên và được báo cáo năm 1935, sử dụng môi trường đơn giản là dung dịch muối đậm Ringer bổ sung hormone từ tuyến yên bò. Các sự kiện như vỡ túi mầm hay hình thành thể cực thứ nhất của noãn MII được mô tả trong in vivo và được tái hiện trong in vitro, dù không bổ sung hormone, gọi là sự trưởng thành tự phát hay tự trưởng thành. Noãn người cũng được khảo sát tương tự bởi nhóm tác giả này và cho thụ tinh nhưng bằng chứng chưa rõ ràng về sự khả năng hóa tinh trùng [42].

Năm 1955, Chang lên tiếng ủng hộ quan điểm của Pincus và đưa ra bằng chứng về khả năng trưởng thành in vitro của noãn thỏ không phụ thuộc hormone khi nuôi cấy 9-11 giờ. Một phát hiện nữa rất thú vị liên quan đến sự trì hoãn giảm phân trong IVM, được nêu lên bởi Chang đó là bổ sung dịch nang noãn có thể làm cho quá trình trưởng thành của noãn bị trì hoãn, có thể do có các nhân tố ức chế trong dịch nang noãn thỏ [12].

Bước ngoặt quan trọng chứng minh tiềm năng của IVM được công bố bởi nhóm nghiên cứu của Edwards và cộng sự năm 1965 [23]. Mặc dù là một chuyên gia về các phác đồ kích thích buồng trứng nhưng ông vẫn quan tâm tác động của gonadotropin ngoại sinh đến các giai đoạn trưởng thành của noãn và bắt đầu thực hiện các nghiên cứu đánh giá sự giảm phân của noãn người in vitro. Quá trình nghiên cứu của ông chia thành hai giai đoạn quan trọng, giai đoạn những năm đầu của thập niên 1960 là áp dụng kỹ thuật IVM trên noãn người và một số động vật khác, trong khi những năm sau đó nhằm thụ tinh những noãn sau nuôi cấy [11]. Lúc này, kết quả thu được khá hạn chế, có thể do quá trình nuôi cấy noãn ngắn và chưa phù hợp với từng loài. Trong những năm tiếp theo, kỹ thuật kích thích phóng noãn đạt được tiến bộ, gợi ra suy nghĩ của ông về thời gian IVM cho người cần được kéo dài và ông xác định được thời gian nuôi trưởng thành noãn non cần thiết trên người là 36 giờ. Nhóm nghiên cứu của Edwards công nhận khả năng nuôi trưởng thành noãn người trong môi trường Hank, bổ sung 15% huyết thanh bê (FCS) được công bố vào năm 1965 [22-24].

Những năm đầu thập niên 1970, Sreenan cùng một số nhà khoa học ở Ireland đã xác định được sự thay đổi của noãn cừu và gia súc qua các mốc thời gian. Thời gian trưởng thành của noãn nuôi cấy in vitro khoảng 24 giờ [56].

Trong thập niên từ 1970 – 1980, có rất nhiều nghiên cứu được tiến hành để nuôi trưởng thành noãn in vitro, trong đó khẳng định quá trình trưởng thành của noãn cần có sự tham gia của các tế bào cumulus. Kích thước nang noãn, kích thước noãn bào và các cơ chế phân tử khác cũng có liên quan đến sự tiếp tục phân bào giảm phân của noãn trong điều kiện nuôi cấy in vitro, sự tổng hợp protein và biểu hiện gene cũng có liên quan đến sự tiết các hormon nội tiết FSH và hCG. Cuối thập niên này, lần đầu tiên các nhà khoa học đã đưa ra quy trình IVM thống nhất. Quy trình được bắt đầu bằng việc thu nhận noãn cùng các tế bào cumulus còn nguyên, sau đó nuôi cấy bằng môi trường thương mại (TCM – 199) có bổ sung huyết thanh bò cái động dục. Noãn được nuôi trong điều kiện 38,5°C, 5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm tuyệt đối để tránh tình trạng mất nước [2].

Cũng trong những năm đó, quan điểm về sự trưởng thành tế bào chất của noãn cũng được mô tả với nhiều ý nghĩa. Chẳng hạn, sự trưởng thành tế bào chất được định nghĩa là sự thay đổi siêu cấu trúc của noãn, bao gồm sự di chuyển của bào quan trong suốt quá trình trưởng thành nhân. Hay còn có quan điểm cho rằng sự trưởng thành tế bào chất có liên quan đến khả năng trưởng thành hoàn toàn, giúp noãn tăng trưởng và có đầy đủ chức năng. Hầu hết các quan điểm cho rằng sự trưởng thành tế bào chất có liên quan đến khả năng phát triển của noãn về sau. Hay gần đây, chúng còn được gọi là sự khả năng hóa noãn, được mô tả bao gồm tình trạng hóa sinh và phân tử cho phép noãn trưởng thành có thể thụ tinh và phát triển thành phôi bình thường. Edwards cũng nhận thức sâu sắc khái niệm này dù khi đó các thuật ngữ này chưa xuất hiện. Ông bắt đầu tìm hiểu về sự tích lũy mRNA trong noãn và tác động lên sự phát triển phôi thai về sau. Theo đó, sự tổng hợp RNA và dị sắc chất trong suốt giai đoạn tiền phóng noãn là quan trọng [2].

Năm 1983, Minato và cộng sự, Eppig và cộng sự (Mỹ) nhận thấy noãn chuột IVM có khả năng thụ tinh. Cũng trong năm đó, Len và cộng sự cho rằng nhiệt độ 39°C là nhiệt độ tối ưu để noãn bò trưởng thành in vitro. Hanada và cộng sự đã cho ra đời con bê đầu tiên bằng kỹ thuật IVF – thụ tinh trong ống nghiệm từ noãn được nuôi cấy trưởng thành in vitro vào năm 1986. Hai năm sau, Lu và cộng sự (1988) cho ra đời cặp bò song sinh đầu tiên bằng toàn bộ quy trình trong ống nghiệm: IVM, IVF và nuôi phôi in vitro giai đoạn đầu (In Vitro Culture – IVC) [21].

Trong khi kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) ra đời sau IVM nhưng bé IVF đã xuất hiện sớm hơn và tạo ảnh hưởng lớn trong lĩnh vực này (12). Phải mất gần 20 năm sau đó, em bé IVM đầu tiên mới chào đời, sử dụng môi trường nuôi cấy TCM 199 bổ sung 50% dịch nang noãn người [25].

Mặc dù IVM có nhiều lợi thế hơn so với IVF, nhưng kết quả lâm sàng ban đầu cũng như tỷ lệ trẻ sinh sống dưới 30% (14). Vì vậy, ở các giai đoạn sau này người ta hướng đến phát triển một noãn bào đủ tiềm lực cho các giai đoạn phát triển sau này. Năm 2017, Sanchez và cs. đã áp dụng mô hình CAPA trên người và kết quả giúp nâng cao kết quả trưởng thành noãn [26]. Tuy nhiên, kết quả chưa đến kết quả tỉ lệ thai, tỉ lệ trẻ sinh sống.

Từ năm 2006 đến nay, Việt Nam cũng đã áp dụng thành công kỹ thuật này trên người và trở thành một trong những quốc gia đi đầu về số chu kỳ điều trị cũng như tỉ lệ thành công. Tuy nhiên, trên thế giới số lượng nghiên cứu để tối ưu hóa quy trình nâng cao hiệu quả trên người còn hạn chế.

## 1.2. Mô hình trưởng thành noãn trong ống nghiệm hiện nay

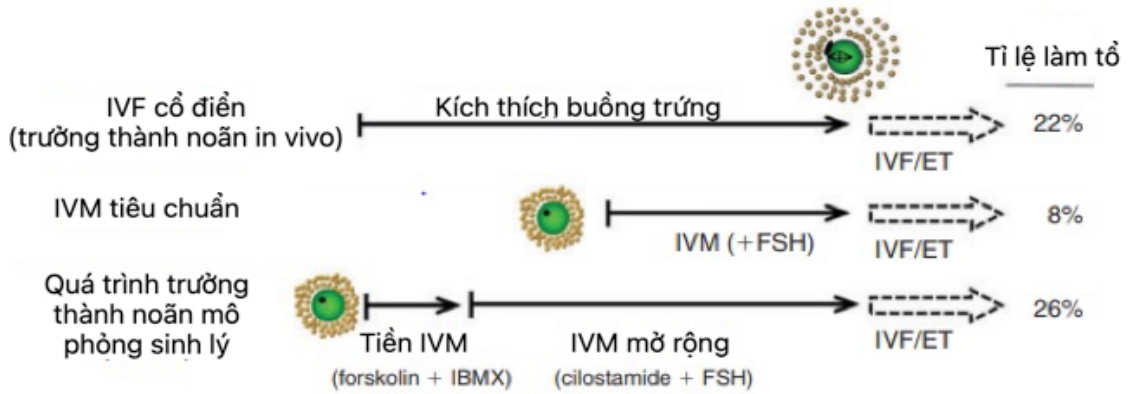
Hiện nay, dựa trên các lý thuyết đã được chứng minh trước đây, người ta thiết lập nên các hướng xây dựng mô hình IVM mới để cải thiện hiệu quả noãn sau nuôi cấy với 4 mô hình chính: (i) tác động vào sinh lý phát triển của noãn theo con đường SMAD2/3 (SMAD family member 2/3) và EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor); (ii) tác động vào con đường cAMP và cGMP (cyclic Guanosine Monophosphate); (iii) cảm ứng con đường tín hiệu ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2); 4) kiểm soát sự liên kết hay hình thành các cầu nối giữa noãn và cumulus [28].

Mô hình xây dựng dựa trên yếu tố tăng trưởng trong sinh lý trưởng thành noãn dựa vào sinh lý phát triển nang noãn, nhiều tác giả xây dựng nên mô hình sử dụng yếu tố ngoại sinh bổ trợ vào nhằm làm tăng hiệu quả IVM. Trong nghiên cứu Hussein và cộng sự (2006) đã sử dụng hai yếu tố là GDF9/BMP15 (Growth Differentiation Factor 9/ Bone Morphogenetic Protein 15) đã làm cải thiện chất lượng phôi của bò, tỷ lệ phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang tăng 20% [3]. Yeo và cộng sự (2008) sử dụng GDF9 tái tổ hợp cho thấy tỷ lệ chuột con sinh sống sau IVM tăng mà không ảnh hưởng đến hình thái và dị tật [58]. Tuy nhiên, mô hình này còn phần hạn chế do các chất GDF9/BMP15 tái tổ hợp có hiệu quả tương tác yếu hơn yếu tố nội sinh [28]. Trong một loạt các nghiên cứu sau này, người ta đang chú ý đến CNP, nó được xem là chất có trong sinh lý cơ thể, cơ chế tác dụng cũng đã ngày càng rõ ràng [62, 27, 61].

### 1.3.1. Mô hình trưởng thành noãn trong ống nghiệm dựa trên sinh lý trưởng thành của noãn in vivo

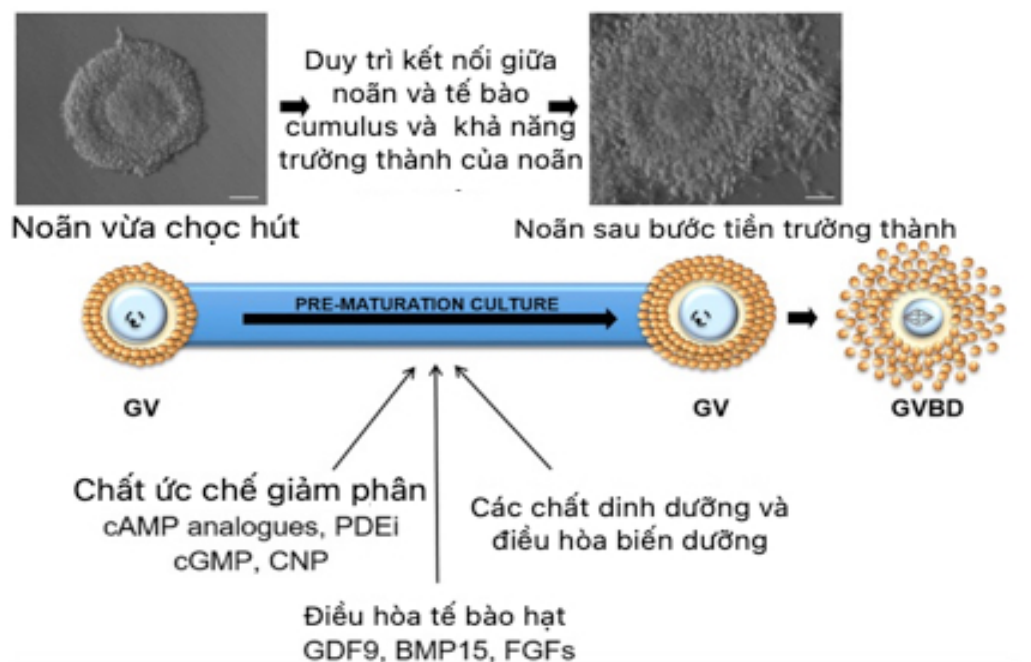
Dựa trên sự hiểu biết về những chất trung gian trong điều hòa trưởng thành noãn trong cơ thể, đặc biệt là cAMP/cGMP/PDE (Phosphodiesterase) và cảm ứng trưởng thành thông qua tín hiệu EGFR, ERK1/2 (Epidermal Growth Factor Receptor,

Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 và 2). Các nhà nghiên cứu đã thiết lập nên mô hình mô phỏng theo sinh lý tự nhiên của của cơ thể (SPOM - Simulated physiological oocyte maturation - SPOM). SPOM là sự tích hợp giai đoạn tiền IVM (short pre-IVM phase) và trưởng thành noãn IVM (extended IVM phase) [4].



Hình 1.1. Mô hình SPOM [4]

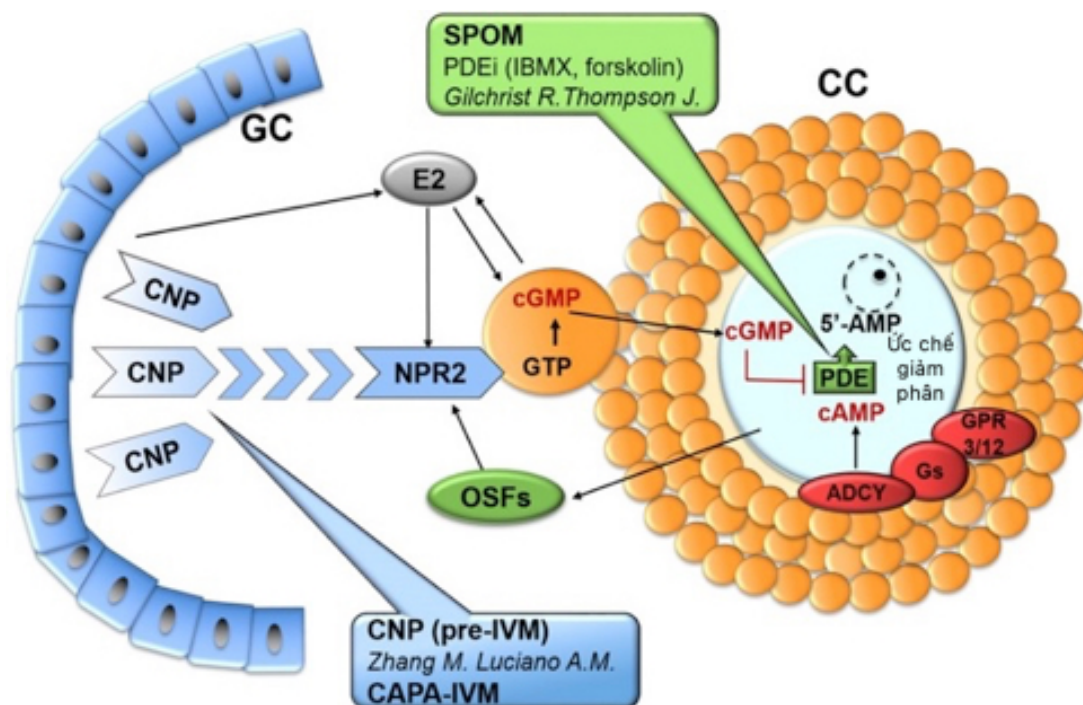
Điểm đặc biệt của mô hình SPOM là ở giai đoạn tiền IVM, các noãn sẽ được giữ tích hợp trong môi trường làm tăng cAMP, mà điển hình trong nghiên cứu Albuz và cộng sự (2010) sử dụng IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) làm cho cAMP tăng gấp 4.100 lần [4]. Phương pháp này giúp ngăn sự tái khởi động giảm phân tự nhiên, giúp các noãn thu nhận được đồng bộ hóa ở một giai đoạn giảm phân để hiệu quả IVM cao nhất. Hiện nay, người ta còn sử dụng một số chất khác như Org9935, cilostamide, milrinone, IBMX và CNP [31].



Hình 1.2. Ứng dụng các chất trì hoãn giảm phân [46]



Tuy nhiên, người ta hướng đến sử dụng CNP vì nó gần với in vivo, cơ chế tác động tương đối an toàn hơn so với các chất tổng hợp như IBMX [61]. Trong một nghiên cứu, tỉ lệ phôi tốt tăng khi môi trường nuôi cấy tiền IVM có bổ sung CNP, FSH, GDF9 [46].



Hình 1.3. Tác động các chất trì hoãn noãn giảm phân [46]

### 1.3.2. Môi trường CAPA-IVM

Môi trường CAPA-IVM được xây dựng dựa trên phác đồ Sanchez và cs. (2017) [48]. Sử dụng hai chất đặc trưng là đối với môi trường CAPA thì sử dụng CNP, còn đối với IVM sau nuôi cấy CAPA là amphiregulin. Trong nghiên cứu này, GM-CSF được bổ sung vào môi trường trong giai đoạn nuôi cấy trưởng thành noãn.

#### 1.3.2.1. Amphiregulin

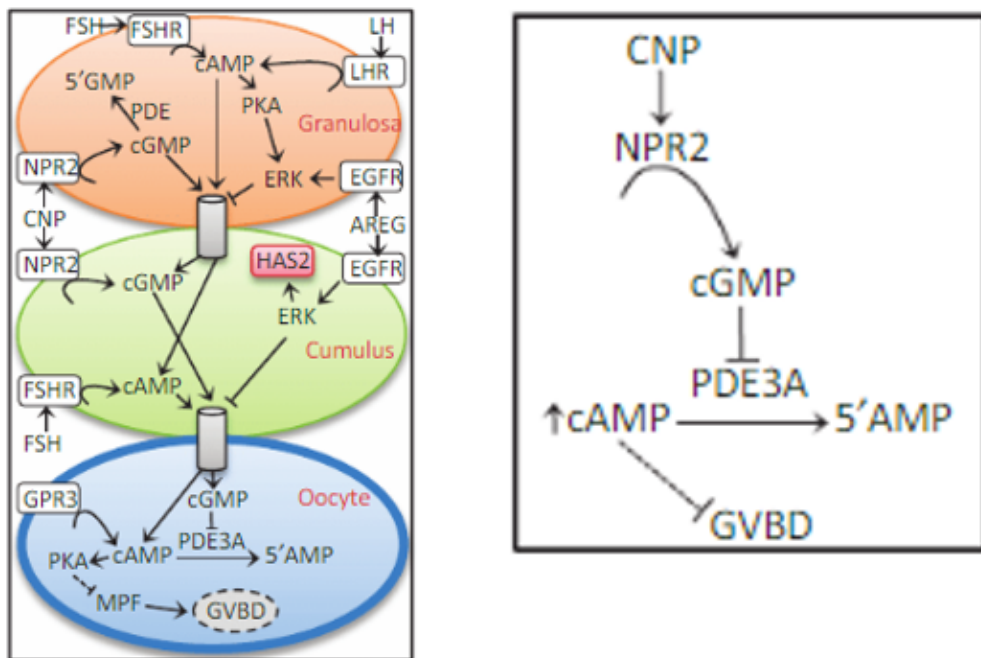
Amphiregulin là yếu tố tăng trưởng biểu bì. EGF là một trong những tín hiệu quan trọng trong sự tương tác giữa noãn và các tế bào nang khác [50]. Việc phát hiện ra tương tác này được Buccione và cs (1990) tìm ra trong quá trình khảo sát tác động FSH vào sinh lý phát triển nang noãn [10]. Đến năm 2002, Su và cộng sự đã chứng minh EGF có khả năng kích hoạt tín hiệu trung gian nội bào ERK1/2. Sau đó, một loạt các nghiên cứu đã cho thấy tác dụng kích hoạt của GDF9/BMP15 vào SMAD2/3 trong giãn nở tế bào cumulus, hỗ trợ trưởng thành noãn [3, 21, 59]. Bên cạnh đó, tác dụng của EGF, GDF9/BMP15 không chỉ ảnh hưởng hai con đường trên mà nó còn ảnh hưởng đến yếu tố SMAD2/3 [50]. Thành viên của họ EGF bao gồm 3 loại

amphiregulin, epiregulin và beta-cellulin. Vì vậy, việc sử dụng amphiregulin tương đối an toàn và hiệu quả trong in vitro [40].

### 1.3.2.2. C-type natriuretic peptide

Khả năng phát triển cũng như chất lượng tạo phôi của noãn trong quá trình IVM bị suy giảm, một trong những lý do đó là do sự trưởng thành nhân và tế bào chất không đồng bộ. Để khắc phục khó khăn đó và cải thiện hiệu quả IVM, một chiến lược tạm hoãn quá trình giảm phân của noãn trong cùng một giai đoạn giảm phân để chúng có thời gian trưởng thành và đồng bộ hóa. CNP là một chất ức chế giảm phân tồn tại trong nang [54].

Nó đã được chứng minh ức chế guanylyl cyclase trên tế bào granulosa/cumulus, làm giảm thụ thể NPR2 (Natriuretic Peptide Receptor B) có tác dụng trong ức chế giảm phân ở một giai đoạn trong noãn của nhiều loài. Sự gắn kết CNP với NPR2 làm tăng mức độ biểu cGMP [62]. cGMP khuếch tán vào noãn thông qua các liên kết tế bào và ức chế hoạt động của PDE3A (phosphodiesterase 3A), dẫn đến việc ngăn chặn sự suy giảm nồng độ của cAMP. cAMP nâng cao thúc đẩy quá trình phosphoryl hóa kinase 1 phụ thuộc CDK1 (cyclin) và làm bất hoạt yếu tố thúc đẩy trưởng thành (MPF - M-phase Promoting Factor) Trong nghiên cứu của Zhang và cộng sự (2015), CNP hữu ích trong việc hoãn quá trình giảm phân, tăng khả năng phát triển noãn, tỷ lệ phôi phân cắt, phôi nang [62]. Đồng thời, CNP được cho là chất giúp truyền tín hiệu giữa noãn và cumulus tốt hơn so với PDE3 [65].

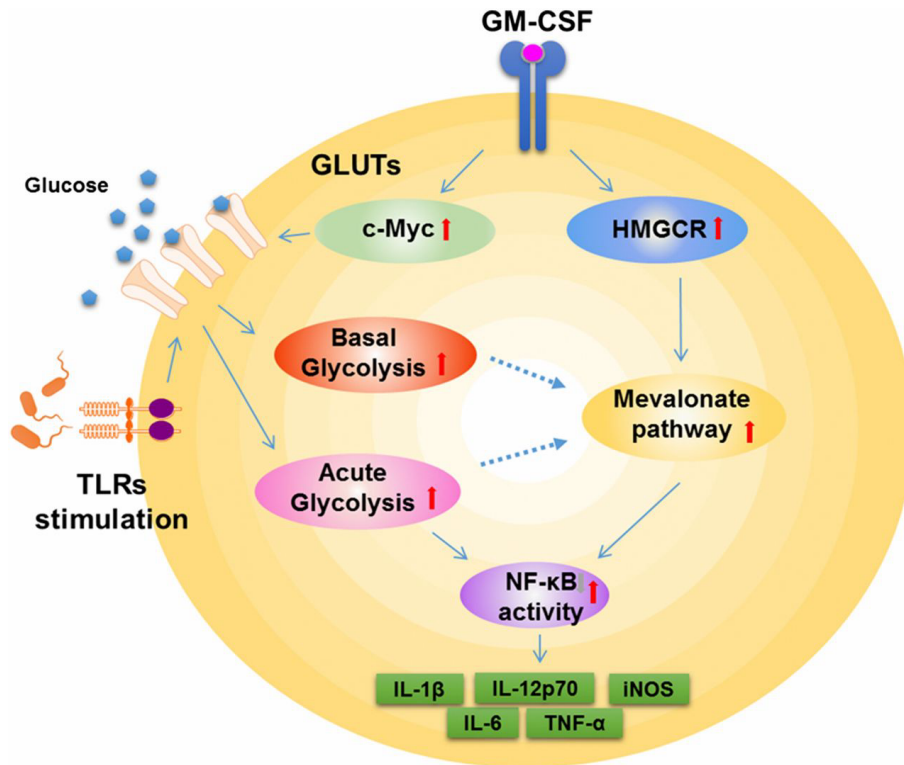


Hình 1.4. Cơ chế tác dụng CNP trong ức chế giảm phân [27]

### 1.3.2.3. *Granulocyte macrophage colony stimulating factor*

Granulocyte macrophage colony stimulating factor là một glycoprotein có trọng lượng phân tử từ 18 đến 30 kDa tùy theo loài [29]. Thụ thể của nó bao gồm hai tiểu đơn vị  $\alpha$  đặc hiệu cytokine và hai tiểu đơn vị  $\beta$  truyền tín hiệu [6]. Sau khi liên kết, phức hợp thụ thể GM-CSF có khả năng kích thích tăng sinh, trưởng thành và khả năng tồn tại của các tế bào tạo máu và không tạo máu [47, 60]. Sự tương tác của GM-CSF với thụ thể của nó kích thích nhiều con đường dẫn truyền tín hiệu, bao gồm con đường Jak/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription), con đường protein kinase hoạt hóa Ras/Raf/mitogen, phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase)/con đường PKB (protein kinase B), và con đường PKC (protein kinase C) [18]. GM-CSF thúc đẩy sự hấp thu glucose thông qua con đường PI 3-kinase/ PKB thông qua sự chuyển vị của chất vận chuyển glucose 1 (GLUT 1 - Glucose Transporter 1) [60]. GM-CSF cảm ứng con đường PKB/Akt dẫn đến hoạt động sống sót của tế bào trực tiếp và bất hoạt các yếu tố đơn bào BAD, caspase 9 và forkhead [17]. Ngoài ra, Akt thúc đẩy sự tồn tại của tế bào một cách gián tiếp bằng cách điều chỉnh một số quá trình liên quan đến chuyển hóa glucose [17].

Cả GM-CSF và thụ thể của nó đều hiện diện cao trong dòng tế bào tạo máu, cũng như trong các loại tế bào khác bao gồm nguyên bào sợi, tế bào hình hạt, nguyên bào nuôi, nội mô và tân sinh [38, 8, 7]. Trong các mô sinh sản, GM-CSF đã được phát hiện ở tinh hoàn, nhau thai, tử cung, ống dẫn trứng và buồng trứng [32, 63, 45, 9]. GM-CSF được biểu hiện trong tử cung bởi các tế bào biểu mô tuyến và tế bào biểu mô tuyến và sau đó được tiết vào lòng tử cung, nơi kích hoạt bạch cầu trung tính và đại thực bào trong chu kỳ động dục và thời kỳ đầu mang thai [45, 9]. Thụ thể GM-CSF đã được phát hiện từ tế bào trứng đã thụ tinh qua giai đoạn phôi nang ở cả chuột và người [53]. Sự biểu hiện chọn lọc của GM-CSF trong tế bào gai, hạt và tế bào đệm trùng với sự phát triển đỉnh cao của nang noãn, phóng noãn và hoàng thể hóa [64]. Ở chuột, phức hợp tế bào noãn COCs biểu hiện mRNA cho tiểu đơn vị  $\alpha$  của thụ thể GM-CSF, được báo cáo là tạo điều kiện thuận lợi cho việc hấp thu glucose và do đó thúc đẩy khả năng tồn tại và tăng sinh trong một số dòng tế bào nhất định [20]. Những thay đổi về nồng độ estrogen và progesterone điều chỉnh việc sản xuất GM-CSF, điều này cho thấy một chức năng điều hòa tiềm năng trong chu kỳ động dục [45]. Do đó, sự biểu hiện của GM-CSF trong buồng trứng và tử cung chuột và cơ chế điều hòa steroid của nó cho thấy vai trò tự tiết và nội tiết trong sinh lý buồng trứng và sự phát triển của phôi.



Hình 1.5. Cơ chế tác dụng GM-CSF giúp tăng cường hấp thụ Glucose [39]

### 1.3. TÍNH MỚI CỦA ĐỀ TÀI

Để hiệu quả thụ tinh, khả năng phát triển của phôi và thai là cao nhất thì sự trưởng thành giữa tế bào chất và nhân của noãn cần đồng bộ [30]. Hiện nay, việc ứng dụng mô hình CAPA-IVM tạo điều kiện cho noãn sinh tổng hợp giúp chất lượng noãn tốt hơn thì chưa được ứng dụng nghiên cứu sâu trên người. Đặc biệt sử dụng GM-CSF trong môi trường nuôi cấy trưởng thành noãn.

Trên mô hình chuột việc bổ sung GM-CSF vào môi trường nuôi cấy cho thấy làm tăng tỷ lệ làm tổ 62% và tỷ lệ trẻ sinh sống 25% so với phương pháp IVM cổ điển sau khi thực hiện chuyển phôi trữ. Đối với nghiên cứu trên người, GM-CSF trước đây đã được sử dụng trong môi trường chuyển phôi giúp làm tăng tỷ lệ làm tổ của phôi đối với phương pháp IVF cổ điển [31]. Mặc dù vậy, cho đến hiện nay, chưa có bất kì nghiên cứu nào về mô hình CAPA-IVM với ứng dụng GM-CSF trong môi trường trưởng thành noãn. Vì vậy, điểm mới trong đề tài là không chỉ đánh giá hiệu quả trong nâng cao tỉ lệ tạo phôi nang, động học phát triển của phôi mà còn đánh giá các kết cục lâm sàng của CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF và không bổ sung GM-CSF ở nhóm bệnh nhân buồng trứng đa nang.

## **CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. THIẾT KẾ NGHIÊN CỨU**

Thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có nhóm chứng

### **2.2. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU**

#### **2.2.1. Dân số mục tiêu**

BN PCOS điều trị TTON, bằng phương pháp CAPA-IVM

#### **2.2.2. Dân số nghiên cứu**

BN PCOS điều trị TTON, bằng phương pháp CAPA-IVM tại Đơn vị HTSS, Bệnh viện Mỹ Đức, thành phố Hồ Chí Minh

#### **2.2.3. Dân số chọn mẫu**

BN PCOS điều trị TTON, bằng phương pháp CAPA-IVM tại Đơn vị HTSS, Bệnh viện Mỹ Đức, thành phố Hồ Chí Minh trong thời gian nghiên cứu.

- Tiêu chuẩn nhận:
  - Tuổi vợ  $\leq 38$
  - Bệnh nhân mắc hội chứng PCOS theo tiêu chuẩn Rotterdam [16]
  - Số chu kì điều trị  $\leq 2$
  - Bệnh nhân có chỉ định IVM
  - Không có bất thường tử cung
- Tiêu chuẩn loại
  - Các chu kỳ xin - cho noãn
  - Chỉ định sinh thiết phôi
  - Bất thường tử cung, lạc NMTC

### 2.3. CỖ MẪU

Với mục tiêu so sánh tỉ lệ tạo phôi nang (ngày 5/6) giữa môi trường CAPA-IVM có và không có bổ sung GM-CSF, với giả thuyết  $H_0$  là tỉ lệ tạo phôi nang không khác biệt giữa 2 nhóm và giả thuyết  $H_a$  là có sự khác biệt về tỉ lệ tạo phôi nang giữa 2 nhóm (kiểm định 2 đuôi), cỡ mẫu nghiên cứu được ước tính theo công thức so sánh 2 giá trị trung bình:

$$n_A = \kappa n_B \text{ and } n_B = \left(1 + \frac{1}{\kappa}\right) \left(\sigma \frac{z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta}}{\mu_A - \mu_B}\right)^2$$

Trong đó:

- $\mu_1 = 49\%$  và  $\mu_2 = 58\%$  lần lượt là tỉ lệ phôi phát triển đến ngày 5/6 trung bình ở nhóm chứng và nhóm can thiệp (có bổ sung GM-CSF)
- Độ lệch chuẩn  $\sigma = 20\%$
- $\alpha = 0,05$  do đó  $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$
- $\beta = 0,2$  do đó  $Z_{1-\beta} = 0,84$
- $\kappa = 1$
- Cỡ mẫu cần thiết cho nghiên cứu là 80 bệnh nhân (40 mỗi nhóm)

### 2.4. CÁCH CHỌN MẪU

Chọn mẫu ngẫu nhiên. BN được phân bố ngẫu nhiên sử dụng phương pháp phân bố ngẫu nhiên theo khối, sử dụng phần mềm phân bố ngẫu nhiên (kích thước khối 4, 6). BN được ngẫu nhiên phân bố vào một trong 2 môi trường sau:

- CAPA – IVM không bổ sung GM-CSF: nhóm chứng
- CAPA – IVM có bổ sung GM-CSF: nhóm can thiệp

### 2.5. ĐỊA ĐIỂM VÀ THỜI GIAN NGHIÊN CỨU

- Địa điểm nghiên cứu: Đơn vị HTSS, Bệnh viện Mỹ Đức, thành phố Hồ Chí Minh.
- Thời gian nghiên cứu: 3/2021 – 12/2021

### 2.6. PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH

#### 2.6.1. Quy trình tiến hành nghiên cứu

**NỘI DUNG 1:** So sánh các kết cục phôi học (tỉ lệ noãn trưởng thành, tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi nang) của môi trường CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF vào môi trường CAPA-IVM so với nhóm không bổ sung GM-CSF.

**Bước 1: Chuẩn bị bệnh nhân và chọn hút noãn**

**Môi FSH:** Bệnh nhân sau khi có kinh (tự nhiên hay sau dùng thuốc nội tiết), được sử dụng Gonadotrophin 150IU/ngày trong từ 2 ngày (bắt đầu từ ngày 2-4 của chu kỳ kinh).

**Tư vấn cho BN về nghiên cứu và lấy đồng thuận tham gia nghiên cứu bằng văn bản:** BN được phát tờ thông tin về nghiên cứu vào thời điểm BN bắt đầu môi FSH (từ ngày 2- 4 của chu kỳ kinh). BN sẽ được nghiên cứu viên tư vấn về nghiên cứu, được đặt câu hỏi và giải đáp về các điều chưa rõ. Nếu BN đồng ý tham gia vào nghiên cứu thì ký cam kết vào văn bản.

**Phân bố ngẫu nhiên:** Sau khi đã có bản đồng thuận tham gia nghiên cứu, BN được phân bố ngẫu nhiên sử dụng phương pháp phân bố ngẫu nhiên theo khối, sử dụng phần mềm phân bố ngẫu nhiên (kích thước khối 4, 6). Người thực hiện phân bố ngẫu nhiên độc lập với nhóm thực hiện nghiên cứu. BN được ngẫu nhiên phân bố vào một trong 2 môi trường sau: CAPA-IVM không có GM-CSF (nhóm chứng) và CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF (nhóm can thiệp)

**Chuẩn bị trước ngày chọc hút noãn:** Vào trước ngày chọc hút lấy noãn non, nhân viên labo thực hiện chuẩn bị môi trường (sử dụng cho chọc hút lấy noãn và nuôi cấy trưởng thành noãn non) và các dụng cụ cần thiết cho một trường hợp CAPA-IVM. Môi trường bao gồm: 1) môi trường chọc hút (Retrieval), 2) môi trường tìm noãn (Searching) 3) môi trường nuôi cấy noãn IVM.

**Chọc hút noãn:** được tiến hành 42-46 giờ sau mũi tiêm Gonadotrophin cuối. Quá trình chọc hút noãn được tiến hành qua ngã âm đạo, bệnh nhân được gây mê hoặc gây tê tại chỗ. Những ống dịch nang chứa noãn chọc hút được chuyển qua phòng labo tìm, phân loại và cấy. Khi dịch nang chọc hút chứa trong các ống nghiệm từ phòng chọc hút và chuyển sang labo, nhân viên labo thực hiện ngay thu nhận phức hợp noãn – tế bào hạt và đánh giá khối COC. Noãn sẽ được rửa qua môi trường nuôi cấy ở hộp rửa xong sẽ chuyển sang hộp nuôi cấy.

### ***Bước 2: Nuôi cấy trưởng thành noãn***

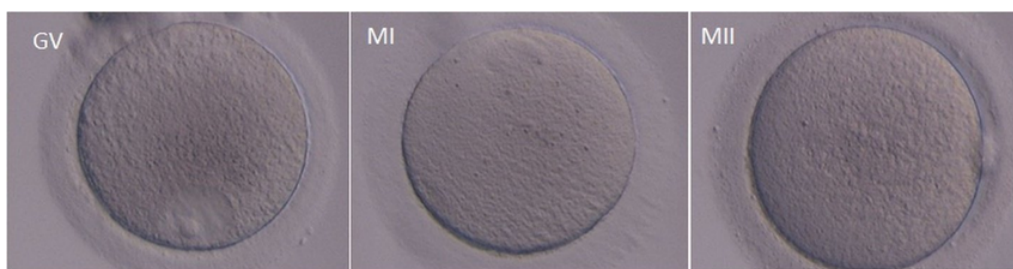
**Đối với nhóm chứng:** noãn sẽ được cấy vào hộp cấy CAPA 24 giờ. Sau đó, noãn sẽ được chuyển sang nuôi cấy IVM-CAPA 30 giờ.

**Đối với nhóm can thiệp:** noãn sẽ được cấy vào hộp cấy CAPA 24 giờ. Sau đó, noãn sẽ được chuyển sang nuôi cấy IVM-CAPA có bổ sung GM-CSF trong 30 giờ.

**Nuôi cấy noãn:** thao tác được thực hiện trong buồng thao tác có thể kiểm soát được nhiệt độ, độ ẩm và pH. Sau đó, đặt đĩa cấy chứa môi trường nuôi cấy đã có COC vào tủ cấy BT37 6%CO<sub>2</sub>, 20%O<sub>2</sub>, 37oC.

**Đánh giá noãn trưởng thành:** Các noãn non sau khi nuôi trưởng thành, được tách tế bào hạt để kiểm tra trưởng thành. Noãn sẽ được phân loại theo đồng thuận

ESHRE (2015). Vì vậy, noãn có thể có nhiều giai đoạn như GV, MI, MII. Nhưng chỉ chọn noãn ở giai đoạn MII để thực hiện ICSI và chỉ những noãn này mới được tính vào tỉ lệ trưởng thành.



Hình 2.1. Các giai đoạn phân loại trong sự trưởng thành noãn theo ESHRE (IVFMD)

### ***Bước 3: Chuẩn bị tinh trùng và noãn cho ICIS***

**Chuẩn bị tinh trùng:** vào ngày noãn trưởng thành, người chồng được lấy tinh trùng. Sau khoảng thời gian 30 phút ly giải, mẫu tinh trùng được tiến hành lọc rửa bằng phương pháp gradient nồng độ theo “SOP chuẩn bị tinh trùng” của IVFMD. Một qui trình chuẩn bị tinh trùng thường bao gồm 4 bước:

- Đánh giá chất lượng tinh trùng để chọn phác đồ lọc rửa tối ưu.
- Lọc để thu nhận tinh trùng có khả năng di động tốt, loại bỏ tinh dịch và các thành phần khác
- Rửa tinh trùng sau khi lọc
- Đánh giá chất lượng tinh trùng (mật độ và độ di động) sau chuẩn bị

**Chuẩn bị noãn:** dùng mouth pipette có gắn pipette Pasteur vô trùng hút toàn bộ cụm noãn cho vào giọt môi trường Hyaluronidase (LifeGlobal, Canada) là môi trường thủy phân các tế bào cumulus bao xung quanh noãn. Lưu ý thời gian tiếp xúc trong môi trường này không quá một phút. Hút nhả liên tục cho đến khi các tế bào cumulus rời ra khỏi tế bào noãn, nhanh chóng chuyển tất cả noãn sang giọt môi trường mới để chuẩn bị load cho ICSI.

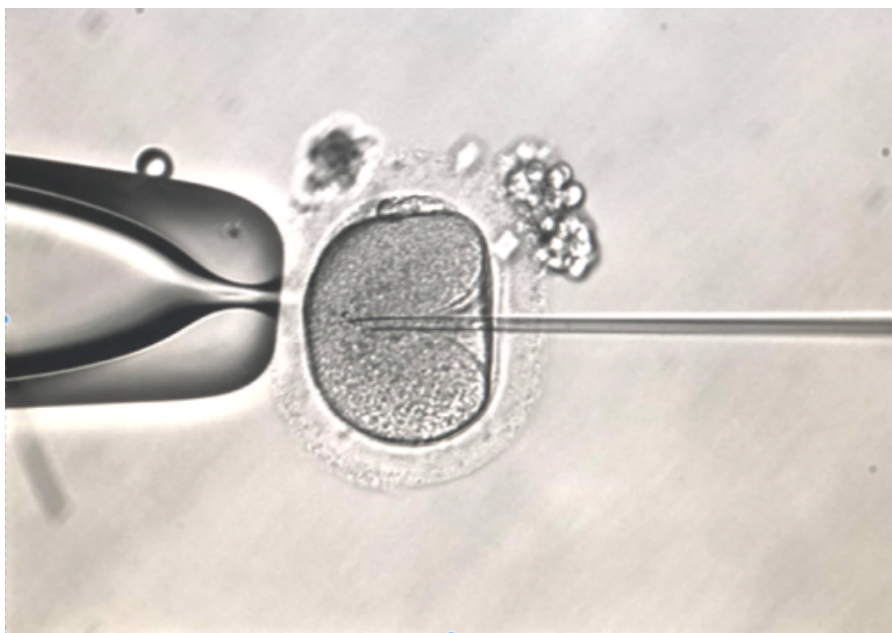
**Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn:** Thực hiện ICSI ở thời điểm từ sau quá trình nuôi IVM, (đối với CAPA IVM là 54 giờ sau chọc hút) theo quy trình tại IVFMD. **Kỹ thuật ICSI bao gồm các bước sau:**

- **Bất động tinh trùng:** bằng cách chạm kim ICSI vào đuôi tinh trùng và tránh làm tổn hại đến đoạn cổ của tinh trùng (mid-piece), đây là phần bắt buộc của kỹ thuật ICSI, thậm chí đối với những trường hợp tinh trùng không di động. Phương pháp bất động tinh trùng rất quan trọng cho việc phóng thích nhanh chóng các nhân tổ tinh trùng để bắt đầu hoạt hóa noãn.



- **Tiêm tinh trùng:** Trước khi tiêm, các kim được đặt ở vị trí vuông góc với vị trí của thể cực thứ nhất. Ví dụ, khi thể cực ở vị trí 12h, kim tiêm phải ở vị trí 3h. Ở vị trí khác, khi thể cực thứ nhất được đặt ở hướng 6h, kim tiêm nên đặt ở vị trí 3h. Trong khi ICSI, việc lắp kim tiêm ở vị trí đúng sẽ đảm bảo không làm tổn thương noãn do thoi vô sắc của noãn thường nằm ở vị trí gần kề với PB thứ nhất.
- **Làm thủng màng bào tương:** Kỹ thuật ICSI đòi hỏi màng bào tương noãn phải được làm thủng ở vị trí tiêm trước khi tinh trùng được chuyển vào trong tế bào chất của noãn.
- **Hút bào tương của noãn vào kim:** Tiền nhân chỉ được hình thành khi tinh trùng nằm trong bào tương noãn sau khi tiêm. Sau khi đưa kim ICSI vào trong noãn, việc hút bào tương noãn trở ra rồi bơm trở lại là một phần không thể thiếu vì nó sẽ chắc chắn rằng tinh trùng được tiêm vào trong noãn và bắt đầu tiếp xúc với bào tương noãn. Động tác này được xem là bước khởi đầu cho hoạt hoá noãn bằng cách tạo dòng chảy Calci nhân tạo. Quá trình hút bào tương noãn vào trong kim tiêm để gây ra vỡ màng một cách cơ học là một thao tác đòi hỏi tính kỹ thuật rất cao.
- **Đặt tinh trùng vào bào tương noãn:** Tinh trùng nên được đặt cố định trong bào tương noãn. Vị trí không đúng của tinh trùng - ví dụ như quá gần màng bào tương - có thể dẫn đến kết quả sau khi tiêm, tinh trùng bị trục xuất ra khoảng PVS do hiện tượng màng tế bào hàn gắn lại. Khi đó, quá trình thụ tinh sẽ không xảy ra. Vậy nên bơm tinh trùng ở đâu trong noãn?
- **Rút kim tiêm ra ngoài:** Sau khi tinh trùng đã ở đúng vị trí trong noãn, kim tiêm cần phải rút từ từ khỏi noãn tại vị trí tiêm. Một lực bơm nhỏ trong kim vẫn luôn được duy trì. Nếu không tiến hành điều này sẽ dẫn đến việc tinh trùng bị hút ngược trở vào kim tiêm và gây tổn thương noãn. Trong quá trình ICSI, khi đưa kim tiêm vào bào tương noãn, noãn sẽ bị thay đổi hình dạng từ hình cầu đến hình đĩa lõm 2 mặt và sau đó một ít bào tương noãn bị hút vào trong kim ICSI để dễ dàng làm vỡ màng plasma của noãn. Đồng thời, có sự trộn lẫn của bào tương noãn với môi trường và PVP trong kim ICSI tạo thành một dịch hòa trộn (bao gồm tinh trùng) để chuyển lại vào noãn. Các chất ngoại bào của noãn có thể làm thay đổi pH nội bào và ảnh hưởng đến quá trình sinh lý trong noãn. Noãn đóng vai trò quan trọng trong ICSI do tinh trùng được tiêm không phải trải qua quá trình hoạt hóa cực đầu để chuẩn bị cho quá trình thụ tinh bình thường. Màng bào tương noãn sau khi

bị tổn thương do động tác đưa kim vào sẽ cần một khoảng thời gian để hàn gắn màng tế bào giúp noãn trở lại hình dạng bình thường.



Hình 2.2. Phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn

(Nguồn IVFMD)

#### ***Bước 4: Nuôi phôi và đánh giá sự phát triển phôi sau ICSI***

**Nuôi cấy sau khi ICSI:** noãn sau ICSI được chuyển vào đĩa cấy, sử dụng môi trường Global® Total LP, nuôi cấy theo nhóm (3 noãn/ giọt) ở điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub> và 5% O<sub>2</sub> trong tủ cấy theo dõi phôi liên tục timelapse.

**Đánh giá sự phát triển của phôi:** Việc đánh giá sự phát triển của phôi được thực hiện tại 2 mốc thời điểm là: 1 ngày sau ICSI và 3 ngày sau ICSI. Việc quan sát hình ảnh 2 nhân nguyên (pronucleus) thường được thực hiện sau 16 – 18 giờ (tính từ thời điểm tiêm tinh trùng vào bào tương noãn). Sự xuất hiện của hình ảnh 2 tiền nhân (pronucleus) là dấu hiệu đầu tiên của sự thụ tinh thành công giữa noãn và tinh trùng. Ghi nhận số noãn thụ tinh, số noãn thoái hóa (màng bào tương không nguyên vẹn, tế bào chất sậm màu và co lại), số noãn không thụ tinh, ghi nhận các bất thường (nếu có). Sau khi hoàn tất, cất đĩa cấy vào tủ cấy. Sau khi đánh giá thụ tinh, phôi được nuôi cấy tiếp tục cho đến ngày thứ 3. Vào ngày 3 (64±2 giờ sau ICSI), ngày 5 (114±2 giờ sau ICSI) và ngày 6 (140±2 giờ sau ICSI), phôi được đánh giá theo các tiêu chí đồng thuận ESHRE [20] (bảng 2.4 và 2.5). Việc phân loại này được thực hiện thông qua đánh giá hình thái phôi dưới kính hiển vi đảo ngược với độ phóng đại lớn.

Bảng 2.1. Tiêu chuẩn đánh giá phôi nang

Đặc điểm	Độ đánh giá	Hình thái phôi
Tốc độ phát triển	Early blastocyst (EB)	Khoang phôi <50% thể tích phôi
	2	Khoang phôi $\geq 50\%$ , ICM và TE nhìn thấy rõ
	3	Khoang phôi chiếm đầy thể tích phôi, ZP dày, kích thước phôi không đối so với noãn ban đầu
	4	Khoang phôi mở rộng, ZP mỏng dần, kích thước phôi lớn hơn so với noãn ban đầu
	5	Phôi đang thoát màng
	6	Phôi đã thoát màng hoàn toàn
ICM	A	Có nhiều tế bào, các tế bào nén chặt
	B	Nhiều tế bào, các tế bào liên kết lỏng lẻo
	C	Có ít hoặc không có tế bào
	D	Thoái hoá hoặc thoái hoá một phần
TE	A	Nhiều tế bào có kích thước bằng nhau, tế bào xếp thành nhiều lớp Tế bào dẹt, kích thước tương đối đồng đều, xếp thành nhiều lớp tạo thành dạng vảy cá
	B	Ít tế bào, các tế bào kích thước lớn nhỏ không đều Tế bào dẹt, kích thước lớn nhỏ khác biệt nhiều
	C	Rất ít hoặc không có tế bào Tế bào dẹt, một vài tế bào dính liền tạo thành 1 dải dài ở 1 bên ( $\geq \frac{1}{4}$ chu vi phôi) hoặc gần hoàn toàn chu vi phôi
	D	Xuất hiện thoái hoá hoặc thoái hoá một phần

Bảng 2.2. Phân loại chất lượng phôi nang

Phân loại	Đặc điểm phôi
Loại I	3AA, 3AB, 3BA 4AA, 4AB, 4BA 5AA, 5AB, 5BA 6AA, 6AB, 6BA

<b>Phân loại</b>	<b>Đặc điểm phôi</b>
Loại II	2AA, 2AB, 2BB, 2BA 3BB, 4BB, 5BB, 6BB
Loại III	Tất cả các trường hợp còn lại, có bất kỳ ICM hoặc TE loại C hoặc D Phôi có không bào Phôi sụp

**NỘI DUNG 2:** So sánh động học phát triển phôi của môi trường CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF vào môi trường CAPA-IVM so với nhóm không bổ sung GM-CSF.

**Đánh giá động học phát triển phôi:** Động học phát triển của phôi được theo dõi bằng tủ cấy có hệ thống quan sát phôi liên tục (timelapse). Các mốc thời gian liên quan đến các sự kiện phát triển của phôi (bảng 2.6) được ghi nhận bằng phần mềm Astec.

Bảng 2.3. Các thông số động học phát triển của phôi

<b>Thông số</b>	<b>Định nghĩa</b>
tPNa	Thời điểm xuất hiện tiền nhân – giờ
tpNF	Thời điểm dung hợp 2 tiền nhân – giờ
t2	Thời điểm xuất hiện 2 tế bào – giờ
t3	Thời điểm xuất hiện 3 tế bào – giờ
t4	Thời điểm xuất hiện 4 tế bào – giờ
t5	Thời điểm xuất hiện 5 tế bào – giờ
t8	Thời điểm xuất hiện 8 tế bào – giờ
tSC	Thời điểm bắt đầu nén – giờ
tM	Thời điểm xuất hiện phôi dâu – giờ
tSB	Thời điểm bắt đầu hình thành phôi nang – giờ
tB	Thời điểm phôi nang nở rộng hoàn toàn – giờ
DC1	Phân chia trực tiếp từ 1 thành 3 tế bào
DC2	Phân chia trực tiếp từ 2 thành 5 tế bào

**NỘI DUNG 3:** So sánh các kết cục lâm sàng (tỉ lệ thử thai dương tính, tỉ lệ thai lâm sàng, tỉ lệ sảy thai, tỉ lệ thai diễn tiến và tỉ lệ làm tổ) của môi trường CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF vào môi trường CAPA-IVM so với nhóm không bổ sung GM-CSF.

**Trữ và rã phôi:** Quy trình trữ lạnh phôi bằng phương pháp thủy tinh hóa bao gồm 4 bước: (1) cho phôi tiếp xúc với môi trường chứa chất bảo vệ đông lạnh (môi trường Cryotech, Japan) để khử nước ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, (2) đặt phôi lên dụng cụ chứa, (3) nhúng trực tiếp dụng cụ đã chứa trứng vào nitơ lỏng, (4) chuyển phôi vào thùng lưu trữ. Quy trình rã đông phôi bằng phương pháp thủy tinh hóa thường bao gồm 3 bước: (1) đưa phôi từ nhiệt độ của nitơ lỏng về nhiệt độ phòng thí nghiệm, (2) loại bỏ chất bảo vệ đông lạnh và bù nước, (3) nuôi cấy phôi khoảng 2 giờ trước khi chuyển vào buồng tử cung.

**Bước 5: Theo dõi kết quả chuyển phôi**

**Thử thai:** được thực hiện bằng cách định lượng nồng độ  $\beta$ -hCG được thực hiện 10 – 14 ngày sau chuyển phôi. Thử thai dương tính khi giá trị  $\beta$ -hCG > 5 mIU/ml.

**Theo dõi thai:** Việc theo dõi thai được tiến hành theo phác đồ thường quy tại Bệnh viện Mỹ Đức. Toàn bộ các dữ liệu của quá trình theo dõi thai được ghi nhận và có thể thu thập thông qua hệ thống phần mềm IVFMD– Smart và Tinasoft.

**2.6.2. Dụng cụ, môi trường và trang thiết bị sử dụng cho nghiên cứu**

Bảng 2.4. Danh mục thiết bị sử dụng cho nghiên cứu

Tên thiết bị	Nhà sản xuất	Xuất xứ
Tủ âm 370c	Eppendorf	Hoa Kỳ
Kính hiển vi quang học	Optika	Italia
Kính hiển vi soi nổi	Optika	Italia
Kính hiển vi đảo ngược phản pha	Olympus	Trung Quốc
Máy ly tâm	Labogene	Đan Mạch
Tủ cấy K-system G185	Origio	Đan Mạch
Tủ cấy timelapse ASTEC	ASTEC	Nhật Bản
Tủ cấy vô trùng Laminar	ESCO	Đức
IVF Workstation	Origio	Đan Mạch

Bảng 2.5. Danh mục dụng cụ sử dụng cho nghiên cứu

Tên dụng cụ	Nhà sản xuất	Xuất xứ
Micro pipette (1 – 10 $\mu$ L; 10 – 100 $\mu$ L, 100 – 1000 $\mu$ L)	Thermo	Phần Lan
Pipette gun	Biohit	Phần Lan

<b>Tên dụng cụ</b>	<b>Nhà sản xuất</b>	<b>Xuất xứ</b>
Pipette nhựa vô trùng (5 mL và 10 mL)	Bioneer	Hàn Quốc
Pipette Pasteur	Volac	Anh
Holding pipette	Origio	Đan Mạch
Injection pipette	Origio	Đan Mạch
Ống ly tâm đáy nhọn (15 mL và 50 mL)	BD	Mỹ
Eppendorf vô trùng (1,5 mL và 2 mL)	Bioneer	Hàn Quốc
Đĩa 35 mm	BD	Mỹ
Đĩa 90 mm	BD	Mỹ
Hộp 4 giếng	BD	Mỹ

Bảng 2.6. Danh mục môi trường tạo phôi và nuôi cấy phôi

<b>Môi trường</b>	<b>Nhà sản xuất</b>	<b>Xuất xứ</b>
Global®Collect	Life Global ®	Mỹ
Global® for Fertilization	Life Global ®	Mỹ
Hyaluronidase	Life Global ®	Mỹ
Global ® Total LP	Life Global ®	Mỹ
AllGrad ® 45%	Life Global ®	Mỹ
AllGrad ® 90%	Life Global ®	Mỹ
AllGrad Wash ®	Life Global ®	Mỹ
PVP (Polyvinylpyrrolidone)	Life Global ®	Mỹ
Lite Oil ®	Life Global ®	Mỹ
MediCult IVM System	Origio	Đan Mạch
Medium CAPA		Bỉ
Albumin Serum Human	SAGE	Đan Mạch
GM-CSF	Partner therapeutics	Mỹ

- Môi trường CAPA: môi trường IVM MediCult IVM System bổ sung 1 mIU / mL FSH tái tổ hợp (rFSH), 5 ng / mL insulin, 10 nM estradiol, 10 mg / mL albumin huyết thanh người, 25 nM CNP và phủ dầu.
- Môi trường IVM: môi trường IVM MediCult IVM System bổ sung 5 ng / mL insulin, 10 nM estradiol, 100 ml / ml amphiregulin tái tổ hợp người và 100 mIU / mL FSH tái tổ hợp (rFSH) và phủ dầu.
- Nhóm can thiệp sẽ được bổ sung GM-CSF trong bước IVM.

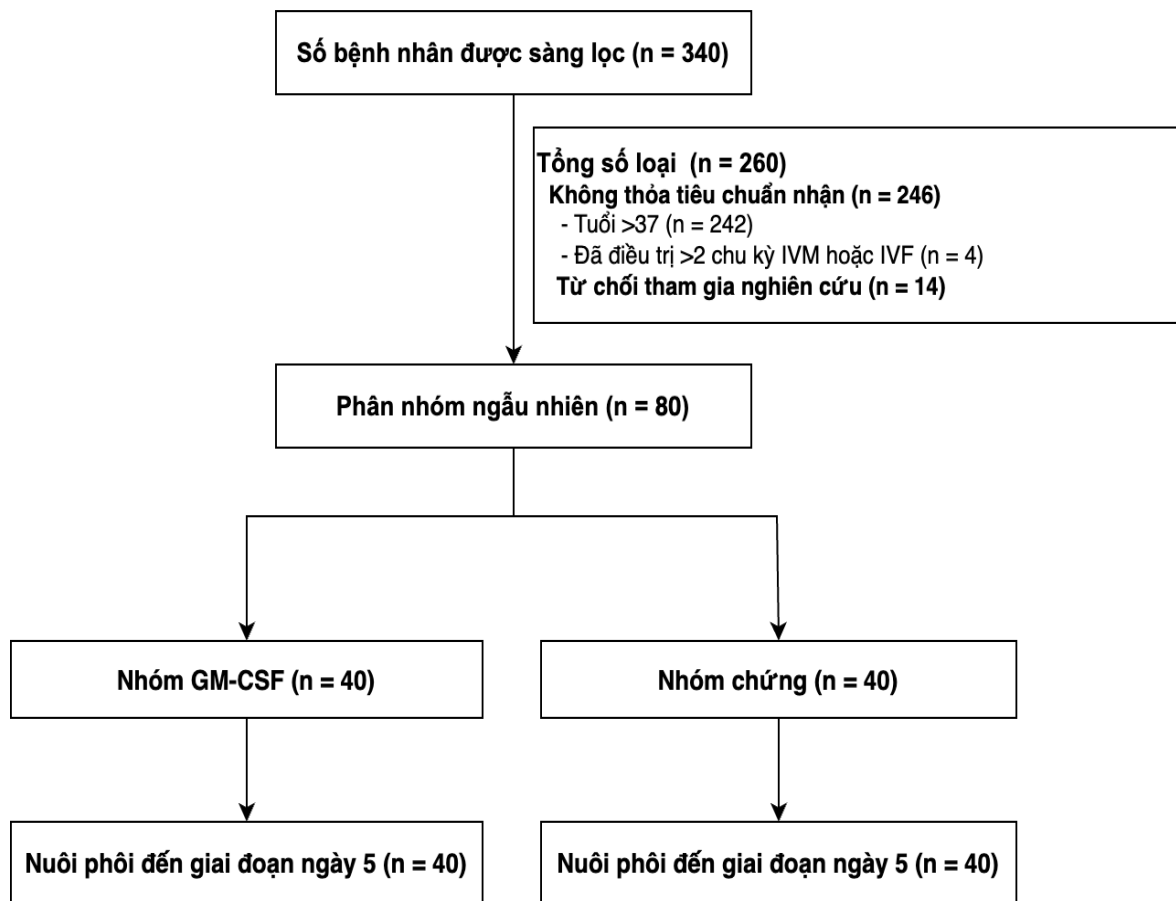
#### **2.6.5. Thu thập, quản lý và phân tích số liệu**

Số liệu được quản lý và phân tích bằng phần mềm thống kê chuyên dụng R (Phiên bản 4.0.1). Để có được kết quả đặc điểm nền của bệnh nhân, chúng tôi thực hiện thống kê mô tả đối với mỗi nhóm bệnh nhân (VD tính trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn đối với những biến liên tục có phân phối chuẩn, hoặc trung vị và tứ phân vị đối với những biến không phân phối chuẩn). Các kết cục là biến nhị phân như tỉ lệ thai lâm sàng, tỉ lệ sảy thai, tỉ lệ thai diễn tiến, tỉ lệ sinh sống và khoảng tin cậy 95% sẽ được ước tính cho mỗi nhóm bằng cách sử dụng kiểm định Fisher exact cho phân phối nhị phân. Các kết cục là biến định lượng như tỉ lệ trưởng thành noãn, tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi, tỉ lệ phôi tốt, tỉ lệ làm tổ sẽ được ước tính cho mỗi nhóm bằng cách sử dụng kiểm định T-test cho kiểm định tham số và Wilcox-test cho kiểm định phi tham số.

### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. ĐẶC ĐIỂM NỀN CỦA BỆNH NHÂN ĐƯỢC THU NHẬN NOÃN CHO NGHIÊN CỨU

Từ tháng 3/2021 đến 12/2021 có tổng cộng 340 được sàng lọc tiêu chuẩn nhận – loại để tham gia nghiên cứu. Trong số đó, có 260 bệnh nhân bị loại do không thoả tiêu chuẩn nhận (246 BN) và không đồng ý tham gia nghiên cứu (14 BN). Trong số 246 BN bị loại do không thoả tiêu chuẩn nhận – loại, có 242 BN bị loại do tuổi >37 và 4 BN bị loại do đã điều trị >2 chu kỳ IVM hoặc IVF trước đó. Cuối cùng, có 80 BN thoả tiêu chuẩn nhận – loại và đồng ý tham gia nghiên cứu. Các BN này được phân bố ngẫu nhiên vào 2 nhóm, nhóm có sử dụng GM-CSF (n=40) và nhóm chứng (n=40). Toàn bộ 40 BN ở trong hai nhóm này đều được thực hiện điều trị và nuôi cấy phôi tới giai đoạn phôi ngày 5.



Hình 3.1. Lưu đồ nhận bệnh và phân nhóm ngẫu nhiên



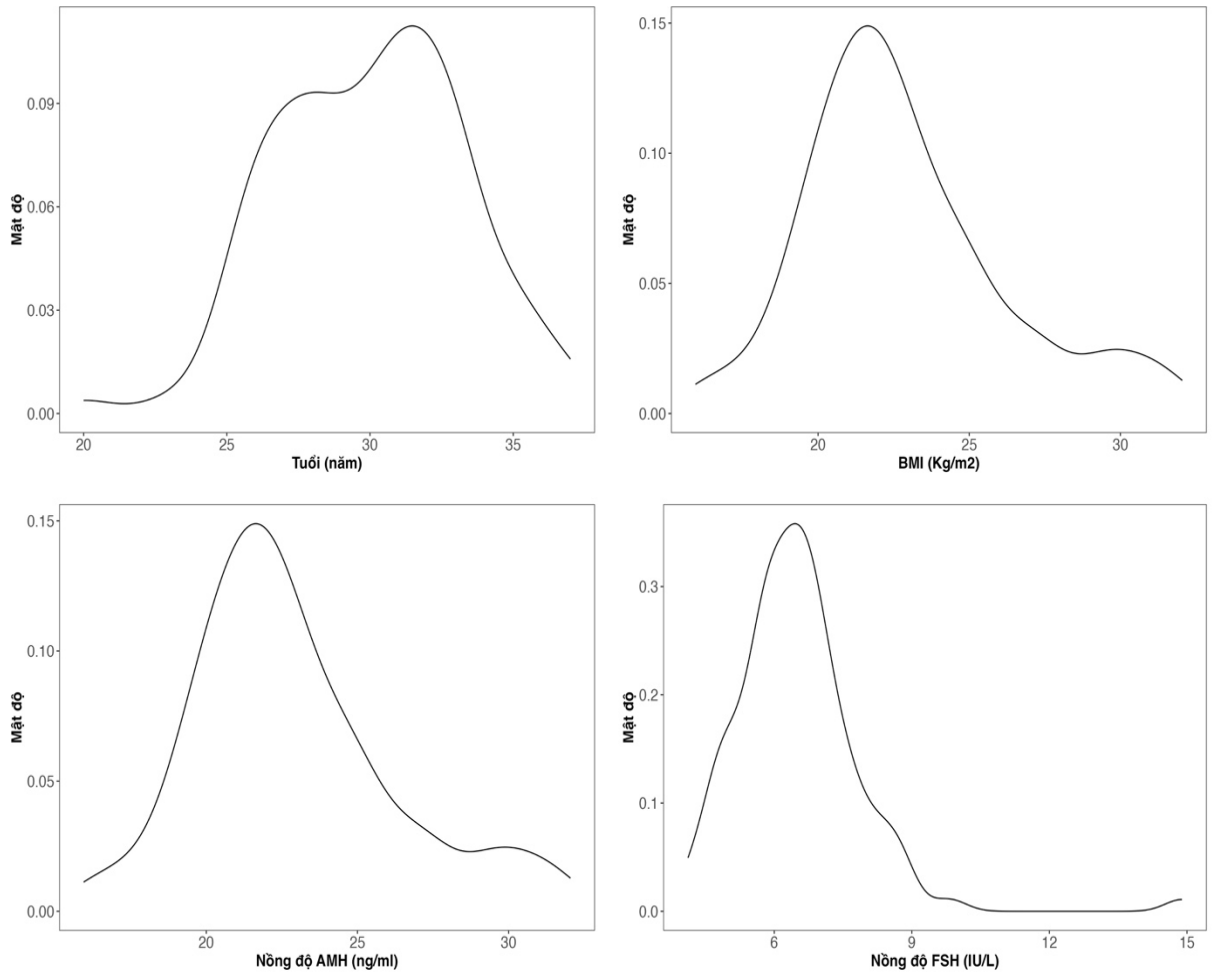
### 3.1.1. Đặc điểm nền của BN tham gia nghiên cứu được trình bày trong Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Đặc điểm nền bệnh nhân

	Nhóm GM-CSF (N = 40)	Nhóm chứng (N = 40)	Giá trị P
<b>Tuổi, năm</b>	29,6±3,7	30,15±2,94	0,483
<b>Chỉ số khối cơ thể, kg/m<sup>2</sup></b>	22,2±3,8	23,11±3,32	0,27
<b>Nồng độ AMH, ng/ml</b>	6,6 [4,8; 9,3]	8,1 [5,6; 10,8]	0,166
<b>Nồng độ FSH, IU/L</b>	6,0 [4,5; 7,3]	5,7 [4,5; 6,7]	0,227
<b>Thời gian vô sinh, năm</b>	2,0 [1,0; 3,3]	2,0 [1,3; 4,0]	0,88
<b>Nguyên nhân vô sinh, n (%)</b>			0,78
Nguyên phát	31 (77,5)	33 (82,5)	
Thứ phát	9 (22,5)	7 (17,5)	
<b>Số chu kỳ TTON, n (%)</b>			0,99
1	38 (95,0)	37 (92,5)	
2	2 (5,0)	3 (7,5)	

AMH: Anti-mullerian hormone, FSH: Follicle-stimulating hormone, SHBG: Sex hormone binding globulin.

Số liệu được trình bày dưới dạng Trung vị [Bách phân vị 1; Bách phân vị 3] hoặc trung bình ± độ lệch chuẩn hoặc số lượng (%).

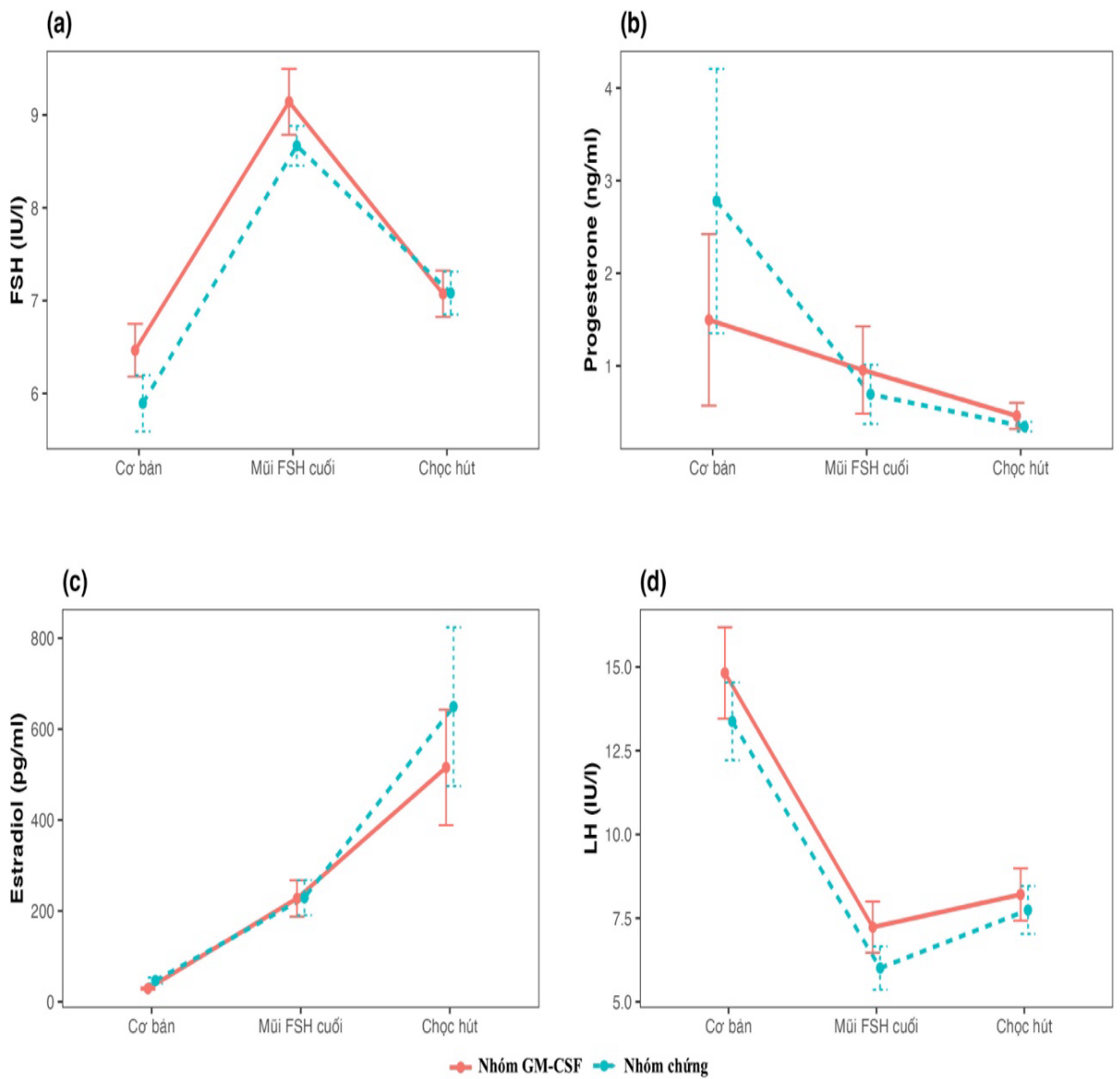


Hình 3.2. Phân bố các đặc điểm chính quyết định thành công của điều trị TTON

Bệnh nhân trong nghiên cứu này có các đặc điểm nền phù hợp cho việc điều trị trưởng thành noãn trong ống nghiệm (IVM), bao gồm độ tuổi trẻ và chỉ số khối cơ thể (BMI) trung bình. Độ tuổi trung bình của bệnh nhân là khoảng 30 tuổi, trong khi chỉ số BMI trung bình là 23 kg/m<sup>2</sup>. Điều này cho thấy rằng đa số bệnh nhân không gặp vấn đề về béo phì, một yếu tố thường gây khó khăn trong các phương pháp hỗ trợ sinh sản. Ngoài ra, dự trữ buồng trứng của bệnh nhân cao, được phản ánh qua nồng độ hormone chống Mullerian (AMH) trung bình là 7 ng/mL. Chỉ số AMH này cao hơn mức trung bình, biểu thị dự trữ trứng tốt, một yếu tố quan trọng trong việc tăng khả năng thành công của chu kỳ điều trị IVM. Đa số bệnh nhân trong nghiên cứu bị hiếm muộn nguyên phát, chiếm khoảng 2/3 tổng số bệnh nhân, và gần như tất cả họ đang trải qua chu kỳ điều trị hỗ trợ sinh sản (HTSS) đầu tiên. Thời gian mong muốn có con trung bình là 2 năm, thể hiện sự khao khát và kiên nhẫn trong quá trình điều trị. Đặc điểm nền của bệnh nhân đóng vai trò quan trọng trong việc đánh giá mức độ phù hợp và dự đoán khả năng thành công của mỗi chu kỳ điều trị IVM và HTSS. Trong nghiên cứu này, các bệnh nhân trẻ tuổi, không béo phì, có dự trữ buồng

trứng tốt, và không gặp tình trạng cường androgen, tạo điều kiện thuận lợi cho việc tiến hành IVM và đưa ra một tiên lượng tích cực. Những đặc điểm này thường được xem là dấu hiệu của khả năng thành công cao, do sự phản ứng tốt của buồng trứng và tỷ lệ thụ tinh thuận lợi. Đặc điểm nền của bệnh nhân trong nghiên cứu này tương đồng với các đặc điểm được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây về hiệu quả của kỹ thuật IVM. Điều này cung cấp tính liên tục và nhất quán trong kết quả, củng cố niềm tin vào sự phù hợp của những đặc điểm nền này trong việc dự đoán kết quả điều trị thành công [57].

Đặc điểm biến thiên nội tiết tố sinh dục của bệnh nhân trong nghiên cứu được trình bày trong Hình 3.2.



Hình 3.3. Biểu đồ nội tiết tố của CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF và nhóm chứng

Nhìn chung, không có sự khác biệt về biến thiên nội tiết FSH, Progesterone, Estradiol và LH của BN ở nhóm GM-CSF và nhóm chứng trong NC này. Nồng độ FSH đầu chu kỳ ở mức thấp, sau đó tăng nhanh và đạt nồng độ tối đa ở thời điểm tiêm mũi tiêm FSH cuối cùng. Sau đó, nồng độ FSH giảm dần tới gần mức nồng độ FSH ở đầu chu kỳ. Nồng độ LH cơ bản ở đầu chu kỳ được duy trì ở mức cao, điều này phù hợp với đặc điểm cơ chế bệnh sinh của BN có hội chứng buồng trứng đa nang. Nồng độ LH sau đó giảm nhanh về mức thấp do tác động của tăng nồng độ FSH ngoại sinh lên cơ chế phản hồi âm trong hoạt động của hệ trục hạ đồi – tuyến yên – buồng trứng. Nồng độ LH sau đó tăng nhẹ trở lại ở ngày chọc hút noãn non. Nồng độ estradiol tăng dần từ đầu chu kỳ đến thời điểm tiêm FSH và đạt nồng độ cao nhất ở ngày chọc hút noãn. Sự tăng nồng độ estradiol này là kết quả của FSH ngoại sinh lên sự phát triển của nang noãn và kích thích tế bào hạt của các nang noãn phát triển này sinh tổng hợp estradiol. Nồng độ progesterone một cách dễ hiểu luôn được duy trì ở mức thấp trong suốt chu kỳ điều trị do không có hoạt động gì đặc biệt liên quan đến sự phóng noãn.

**3.2. NỘI DUNG 1:** So sánh các kết cục phôi học (tỉ lệ noãn trưởng thành, tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi nang) của môi trường CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF vào môi trường CAPA-IVM so với nhóm không bổ sung GM-CSF.

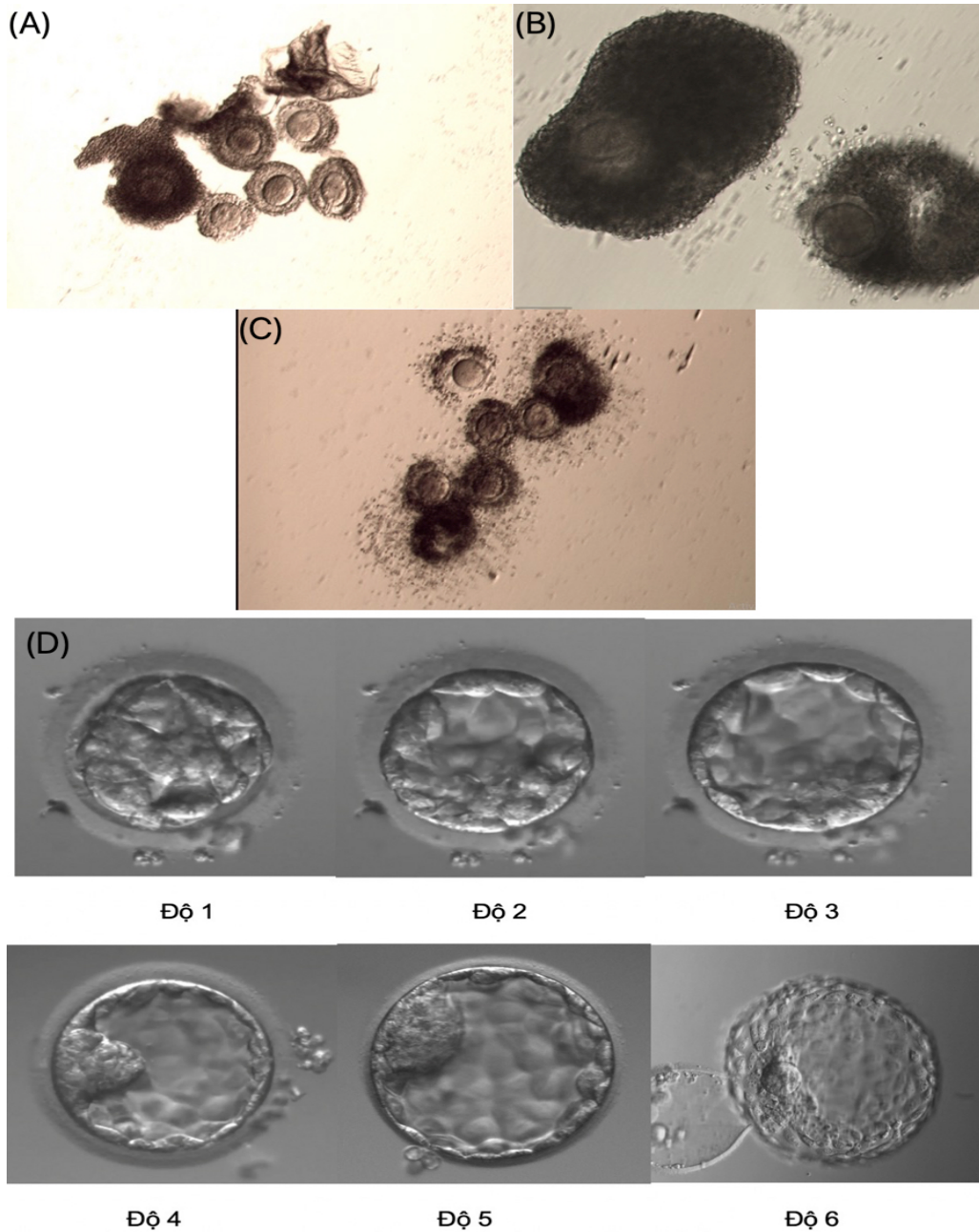
Kết quả điều trị trưởng thành noãn trong ống nghiệm và đặc điểm phôi học sau nuôi cấy phôi được trình bày trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Kết quả điều trị trưởng thành noãn non trong ống nghiệm

	<b>Nhóm GM-CSF (N = 40)</b>	<b>Nhóm chứng (N = 40)</b>	<b>Giá trị P</b>
<b>Số noãn non chọc hút được, n</b>	14 [11; 22]	20 [14; 25]	0,135
<b>Tỷ lệ trưởng thành noãn, (%)</b>	65,9 [57,1; 75,5]	65,5 [51,5; 70,0]	0,307
<b>Số noãn trưởng thành MII, n</b>	10 [7; 15]	13 [8; 16]	0,36
<b>Tỷ lệ thụ tinh, (%)</b>	71,4 [62,5; 84,6]	75,7 [61,4; 85,7]	0,946
<b>Số noãn thụ tinh, n</b>	8 [6; 10]	8 [6; 11]	0,724
<b>Số phôi ngày 3, n</b>	5 [4; 7]	6 [4; 7]	0,399
<b>Tỷ lệ tạo phôi ngày 3 trên số ICSI, (%)</b>	50,0 [41,3; 62,5]	50,0 [36,5; 68,9]	0,813
<b>Tỷ lệ tạo phôi ngày 3 trên số thụ tinh, (%)</b>	71,4 [56,1; 84,4]	74,2 [60,0; 84,9]	0,629
<b>Số phôi ngày 5, n</b>	3 [1; 4]	2 [1; 4]	0,686
<b>Tỷ lệ tạo phôi ngày 5 trên số ICSI, (%)</b>	23,6 [12,2; 36,8]	16,7 [12,0; 31,8]	0,334

	Nhóm GM-CSF (N = 40)	Nhóm chứng (N = 40)	Giá trị P
Tỷ lệ tạo phôi ngày 5 trên số thụ tinh, (%)	33,3 [16,8; 51]	25,0 [15,1; 51]	0,42
Tỷ lệ không có phôi nang, (%)	7 (17,5%)	7 (17,5%)	0,99

Số liệu được trình bày dưới dạng Trung vị [Bách phân vị 1; Bách phân vị 3] hoặc trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn hoặc số lượng (%).



Hình 3.4. Noãn thu nhận được ở 1 chu kỳ CAPA-IVM

(Nguồn: IVFMD)

- A. Noãn thu nhận tại thời điểm chọc hút
- B. Noãn thu nhận sau khi nuôi cấy CAPA-IVM
- C. Noãn thu nhận được sau khi nuôi trưởng thành (IVM), lúc này lớp tế bào hạt nở rộng
- D. Phôi ngày 5 sau khi nuôi cấy CAPA-IVM

Về kết quả chọc hút noãn, số noãn non chọc hút được ở các BN trong nghiên cứu ở nhóm GM-CSF và nhóm chứng lần lượt là 14 và 20 noãn. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ trưởng thành noãn giữa hai nhóm. Tỷ lệ trưởng thành noãn trung bình là 65,9% ở nhóm GM-CSF và 65,4% ở nhóm chứng. Từ đó, số noãn trưởng thành thu nhận được ở hai nhóm lần lượt là 10 và 12,5 noãn. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến kết cục của một chu kỳ điều trị IVM, trong đó, số noãn non chọc hút được và số noãn trưởng thành sau nuôi cấy IVM là hai yếu tố đầu tiên và quan trọng nhất vì hai thông số này quyết định tỉ lệ thụ tinh, số phôi nuôi cấy được và tiềm năng phát triển tiếp của phôi sau này. Hiện nay vẫn chưa có một ngưỡng thống nhất chung trên toàn thế giới về tỉ lệ trưởng thành noãn tối thiểu cần có ở một chu kỳ IVM giống như các chu kỳ IVF khác. Tuy nhiên, ở các chu kỳ IVM, với các phác đồ khác nhau, thời gian nuôi trưởng thành khác nhau và môi trường nuôi trưởng thành khác nhau, tỉ lệ trưởng thành noãn dao động từ 40% đến 80% với thời gian nuôi trưởng thành kéo dài từ 24-52 giờ.

Về kết quả nuôi cấy phôi, số liệu từ nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt liên quan đến tỷ lệ tạo phôi nang tính theo số chu kỳ ICSI và số noãn thụ tinh (lần lượt 23,6% so với 16,7%,  $p = 0,334$ ; 33,3% so với 25%,  $p = 0,42$ ). Chưa có nghiên cứu đánh giá hiệu quả nuôi cấy phôi nang ở bệnh nhân điều trị IVM, hay CAPA – IVM cũng như vai trò của bổ sung GM-CSF trong kỹ thuật IVM.

Tuy nhiên, các nghiên cứu bổ sung GM-CSF trong TTON trên người và mô hình động vật đều ghi nhận nhiều ảnh hưởng tích cực của GM-CSF lên kết cục phôi và thai. Nghiên cứu của Sjöblom và cs. (1999) ghi nhận việc bổ sung GM-CSF vào môi trường nuôi cấy phôi TTON giúp tăng tỷ lệ tạo phôi nang từ 30% lên 76% (57). Nghiên cứu này cũng ghi nhận năng lực của phôi nang cũng được cải thiện sau bổ sung GM-CSF, thể hiện qua khả năng thoát màng và bám vào khối chất nền ngoại bào của đĩa nuôi cấy. Ngoài ra, số lượng phôi bào của khối tế bào bên trong (ICM) của phôi sau bổ sung GM-CSF cũng tăng hơn 35% so với phôi nuôi cấy từ môi trường không bổ sung GM-CSF.

Nguyên lý trưởng thành noãn trong kỹ thuật CAPA-IVM đến từ giả thuyết về sự đồng bộ giữa việc trưởng thành nhân và trưởng thành tế bào chất từ đó giúp cải

thiện tỉ lệ trưởng thành, tỉ lệ thụ tinh, cũng như các tỉ lệ liên quan đến sự phát triển của phôi. Trong đó, quá trình trưởng thành nhân là quá trình nhân phát triển từ giai đoạn túi mầm (GV – germinal vesicle) sang giai đoạn ở trung kỳ giảm phân II. Trưởng thành nhân bao gồm các hiện tượng: (i) vỡ túi mầm (GVBD - Germinal Vesicle Breakdown), (ii) nhiễm sắc thể cô đặc, (iii) sự hình thành thể thoi ở trung kỳ giảm phân I (MI), (iv) sự phân ly nhiễm sắc thể đồng dạng với sự xuất hiện thể cực thứ nhất và, (v) sự ngừng lại ở giai đoạn trung kỳ giảm phân II [1]. Màng nhân bắt đầu cuộn lại, lõi nhân biến mất và sau đó màng nhân vỡ ra từng mảnh và biến mất nhanh chóng. Thời gian trưởng thành nhân *in vitro* và *in vivo* gần như tương tự nhau khoảng 24 giờ. Trưởng thành nhân liên quan đến những thay đổi trong khuôn mẫu tổng hợp protein. Noãn trưởng thành được mô tả bởi sự thay đổi hình thái của nhiễm sắc thể trong quá trình phân bào giảm nhiễm. Trước khi trưởng thành, noãn ở giai đoạn GV. Dưới tác động của FSH và LH, noãn bước vào quá trình giảm phân, khởi đầu là sự phá vỡ GVBD. Ở giai đoạn trung kỳ giảm phân I, nhiễm sắc thể đóng xoắn cực đại, tâm động xuất hiện, các vi ống bắt giữ các nhiễm sắc thể. Sau đó, các nhiễm sắc thể tương đồng phân tách và di chuyển về hai cực của tế bào. Quá trình giảm phân II xảy ra không có sự sao chép nhiễm sắc thể tương đồng và dừng lại ở trung kỳ giảm phân II. Biểu hiện của quá trình trưởng thành nhân là sự xuất hiện thể cực thứ nhất (PB1 – pola body 1) [28, 27]. Các nghiên cứu chỉ ra rằng nồng độ cAMP (cyclic adenosine monophosphate) đóng vai trò quan trọng trong việc tái khởi động lại giảm phân. Nồng độ cAMP sẽ thay đổi nồng độ trong quá trình trưởng thành. Đỉnh LH vào giữa chu kỳ sẽ gây giảm nồng độ cAMP trong noãn bào. Sự phóng noãn sẽ đồng thời gây giảm nồng độ cAMP và tái khởi động giảm phân. Sự duy trì của noãn ở trạng thái ngừng giảm phân là do sự ức chế PDE3 (phosphodiesterase type 3), enzyme chịu trách nhiệm phân giải cAMP, giúp duy trì nồng độ cAMP cao trong noãn bào [62]. Các tế bào sinh dưỡng quanh noãn cũng có tác động đến quá trình hoàn thành giảm phân của noãn. Tách noãn ra khỏi các tế bào hạt quanh noãn có thể làm giảm phân được tiếp tục [44]. Các tế bào hạt quanh noãn khi gắn chặt với noãn, chuyển đến noãn yếu tố duy trì ức chế giảm phân (cAMP). Khi yếu tố ức chế không còn, noãn tiếp tục giảm phân đi đến giai đoạn MII. Các tế bào hạt quanh noãn khi gắn chặt với noãn, chuyển đến noãn yếu tố duy trì ức chế giảm phân (cAMP). Khi yếu tố ức chế không còn, noãn tiếp tục giảm phân đi đến giai đoạn MII [28]. Đối với trưởng thành tế bào chất thì quá trình này bao gồm cả sự thay đổi cấu trúc trong noãn từ giai đoạn GV sang MII và khả năng phát triển của noãn khi giảm phân. Sự trưởng thành tế bào chất là yếu tố gián tiếp quyết định khả năng phát triển của noãn để có thể xảy ra hiện tượng thụ tinh bình thường, phân chia và phát triển tới phôi nang. Các thông số hình thái để

đánh giá sự trưởng thành tế bào chất bao gồm sự giãn nở của tế bào hạt, xuất hiện thể cực thứ nhất và gia tăng khoảng không quanh noãn [28, 27]. Một số sự kiện quan trọng trong trưởng thành tế bào chất đã được nghiên cứu và ghi nhận bao gồm sự hình thành của các hạt vỏ từ các phức hợp Golgi và sự di chuyển của các thể này đến rìa vỏ của noãn, ngay dưới màng bào tương noãn nhằm ngăn ngừa hiện tượng đa thụ tinh. Ngoài ra người ta còn ghi nhận có sự tái sắp xếp lại lưới nội chất trong quá trình trưởng thành noãn: từ những thành phần thuộc lưới nội chất nằm sắp xếp có tổ chức trong toàn bộ noãn chưa trưởng thành trở thành những cụm lưới nội chất có đường kính từ 2-3 $\mu$ m phân bố ở vùng vỏ noãn bào, ngay cả vùng lân cận thoi vô sắc. Sự tái phân bố hệ thống lưới nội chất và thụ thể inositol triphosphate cho phép noãn có khả năng giải phóng ion  $Ca^{2+}$  đáp ứng với kích thích của tinh trùng thụ tinh nhằm hoạt hoá noãn. Nồng độ glutathione tăng ngăn ngừa sự tháo nén của tinh trùng tạo điều kiện cho sự hình thành tiền nhân của tinh trùng bên trong noãn thụ tinh. Ngoài ra, sự gắn kết nhiều gốc adenyl vào cơ quan sao chép của mẹ là cơ chế quan trọng trong điều hòa khả năng sao chép tạm thời, hoạt hóa sự giải mã protein của phôi. Sự điều hòa chuyển hóa năng lượng cũng là một chỉ điểm khác của quá trình trưởng thành bào tương noãn và có vai trò quan trọng trong sự phát triển phôi sau này [26]. Trong quá trình trưởng thành noãn, ty thể sẽ thay đổi về số lượng, chức năng và vị trí để có thể đáp ứng với nhu cầu năng lượng của noãn. Số lượng ty thể ở người dao động từ 30.000 đến 1.000.000. Nghiên cứu trên chuột cho thấy ở giai đoạn GV, ty thể phân tán khắp bào tương, tập trung một lượng trung bình ở quanh túi mầm. Khi đến GVBD, khoảng 40% ti thể tập trung quanh khu vực hình thành thoi vô sắc. Người ta còn ghi nhận trong quá trình trưởng thành, ty thể sẽ tập trung cạnh lưới nội chất để đáp ứng nhu cầu năng lượng cần cho cơ chế hình thành thoi vô sắc, đây được cho có thể là yếu tố quan trọng sự phát triển sớm của phôi. Vì vậy, trong cơ thể đã có cơ chế giúp nhân và tế bào chất trưởng thành đồng bộ. Việc hỗ trợ trưởng thành hoàn toàn cả về nhân và tế bào chất sẽ giúp cho tiềm năng phát triển sau này của noãn và hợp tử sau này tốt hơn. Từ đó, sẽ giúp nâng cao hiệu quả IVM khi nuôi cấy in vitro [28, 27].

Các cơ chế cơ bản liên quan đến việc GM-CSF ảnh hưởng đến sự trưởng thành và cải thiện chất lượng noãn vẫn chưa được hiểu đầy đủ. Các nghiên cứu tới hiện tại ghi nhận GM-CSF có thể góp phần vào sự trưởng thành noãn bằng cách thúc đẩy sự đồng bộ của quá trình trưởng thành nhân và tế bào chất. Sự đồng bộ này rất quan trọng để khởi tạo sự trưởng thành của noãn và có khả năng cải thiện tiềm năng phát triển. Ngoài ra, GM-CSF còn thúc đẩy sự giãn nở rộng của tế bào cummulus; nhờ vậy, có thể cải thiện chất lượng noãn bào. Việc sử dụng GM-CSF được nhìn nhận sẽ cải thiện tỷ lệ thành công của các kỹ thuật điều trị HTSS. Tuy nhiên, kết quả từ RCT



này của chúng tôi lại ghi nhận xu hướng ngược lại. Điều này là khá đáng tiếc do vì một trong những yếu tố then chốt đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển, áp dụng thành công cũng như các tiềm năng áp dụng trong tương lai của CAPA - IVM là sự cải tiến của hệ thống môi trường nuôi cấy. Chất lượng và thành phần của môi trường nuôi cấy được sử dụng trong IVM ảnh hưởng lớn đến sự phát triển noãn bào và dĩ nhiên tỷ lệ thành công chung. Bằng cách tối ưu hóa môi trường nuôi cấy, sự trưởng thành của noãn, tỷ lệ thụ tinh và tiềm lực phát triển của phôi đã được cải thiện. Hơn nữa, sự cải thiện của môi trường nuôi cấy IVM cũng có liên quan đến việc bảo vệ chức năng của ty thể và giảm các stress oxy hóa. Sự phát triển của môi trường nuôi cấy IVM đã góp phần cải tiến và tiên bộ kỹ thuật IVM, dẫn đến tăng tỷ lệ thành công và cải thiện kết quả cho bệnh nhân thực hiện thủ thuật IVM.

Kết quả từ nghiên cứu của chúng tôi cung cấp các thông tin liên quan đến quyết định dựa trên chứng cứ về hiệu quả thực sự của bổ sung GM-CSF lên kết cục chọc hút noãn non, nuôi cấy trưởng thành và nuôi cấy phôi ở phụ nữ có PCOS, điều trị CAPA-IVM. Như vậy, để cải thiện môi trường CAPA-IVM, cần thêm nhiều nghiên cứu về các yếu tố khác ví dụ như: các phức hợp dinh dưỡng, bổ sung nội tiết tố, lipid/lipoprotein, các chất chống oxy hoá, các yếu tố tăng trưởng khác. Hoặc có thể nghiên cứu cải thiện hệ thống nuôi cấy 3 chiều nhằm mô tả chính xác hơn cấu trúc phức tạp của nang noãn.

**3.3. NỘI DUNG 2:** So sánh động học phát triển phôi của môi trường CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF vào môi trường CAPA-IVM so với nhóm không bổ sung GM-CSF. Nghiên cứu của chúng tôi cũng cung cấp các thông số liên quan đến động học phát triển của phôi (Bảng 3.3)

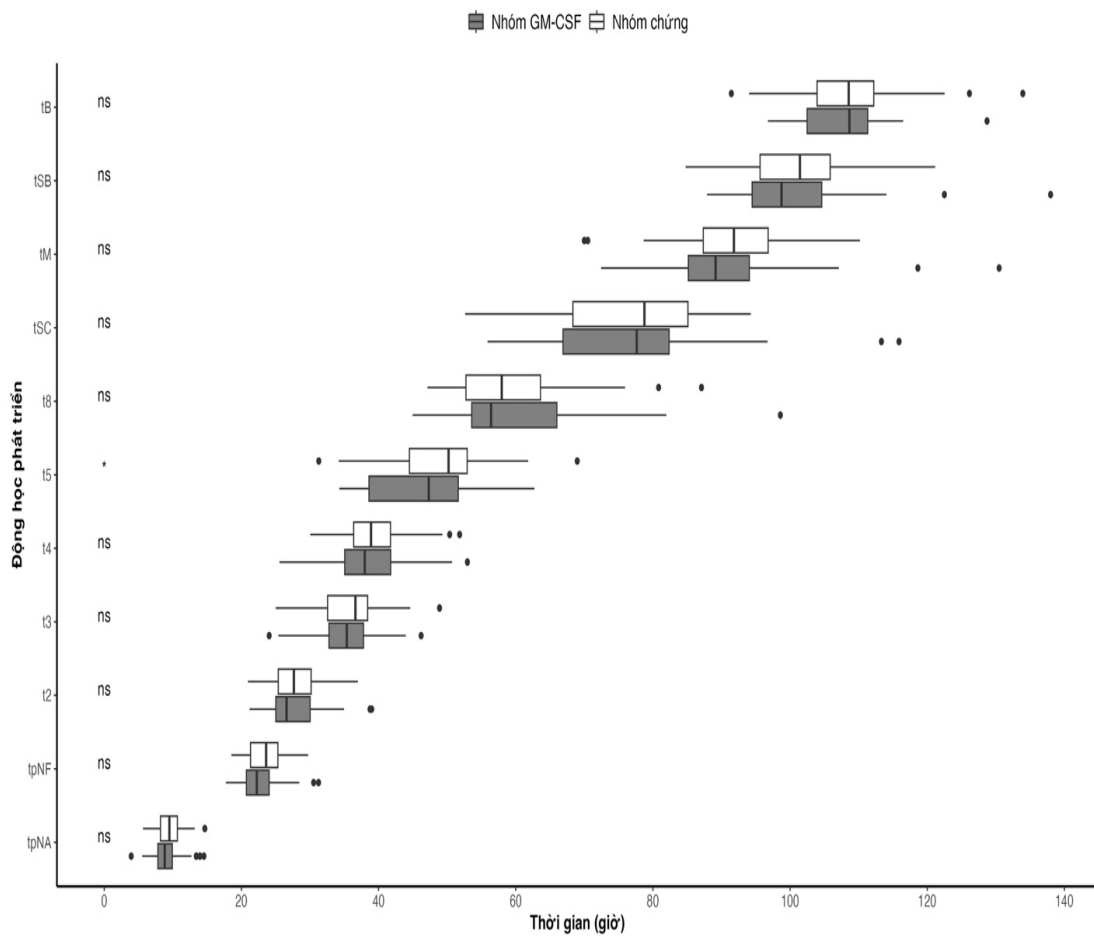
Bảng 3.3. Kết quả động học phát triển của phôi

	Nhóm GM-CSF (N=72)	Nhóm chứng (N=86)	Giá trị P
tPNa, giờ	9,0±2,0	9,5±2,0	0,154
tpNF, giờ	22,6±2,9	23,4±2,7	0,112
t2, giờ	27,6±3,9	28,0±3,8	0,604
t3, giờ	35,1±4,5	35,8±4,6	0,365
t4, giờ	38,7±5,0	39,2±4,7	0,527
t5, giờ	46,2±7,8	49,1±6,9	0,016
t8, giờ	60,3±10,8	59,0±8,5	0,489
tSC, giờ	76,4±12,0	76,8±10,7	0,821
tM, giờ	90,4±9,1	91,8±7,6	0,31
tSB, giờ	100,4±8,4	101,6±7,9	0,366

	Nhóm GM-CSF (N=72)	Nhóm chứng (N=86)	Giá trị P
tB, giờ	107,9±6,4	108,6±7,9	0,677
Phân chia trực tiếp, n (%)			0,95
DC1	7 (58,3)	5 (55,6)	
DC2	5 (41,7)	4 (44,4)	

Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn hoặc số lượng (%).

Kết quả phân tích động học phát triển phôi cho thấy một số khác biệt giữa hai nhóm. Mặc dù không có sự khác biệt đáng kể về thời gian phát triển đến giai đoạn 2, 3, 4 và 8 tế bào, cũng như morula, early blastocyst và blastocyst, thời gian phát triển đến giai đoạn 5 tế bào ngắn hơn 2,9 giờ ở nhóm GM-CSF so với nhóm chứng ( $p=0.016$ ). Điều này cho thấy GM-CSF có thể thúc đẩy quá trình phân chia tế bào trong giai đoạn đầu phát triển phôi, nhưng không ảnh hưởng đến tốc độ phát triển tổng thể của phôi.



Hình 3.5. Động học phát triển của phôi

Sự khác biệt về thời gian phát triển đến giai đoạn 5 tế bào giữa hai nhóm có thể được giải thích bởi một số cơ chế tiềm năng của GM-CSF. Thứ nhất, GM-CSF có thể thúc đẩy sự biệt hóa của tế bào gốc phôi thành các dòng tế bào khác nhau, bao gồm cả tế bào trophectoderm (TE) và inner cell mass (ICM). TE chịu trách nhiệm cho sự bám dính và xâm nhập của phôi vào nội mạc tử cung, trong khi ICM phát triển thành các mô và cơ quan của thai nhi. Sự biệt hóa sớm của TE có thể giúp phôi bám dính và làm tổ nhanh hơn, dẫn đến thời gian phát triển đến giai đoạn 5 tế bào ngắn hơn.

Thứ hai, GM-CSF có thể kích thích sự sản xuất các yếu tố tăng trưởng và cytokine khác trong phôi, chẳng hạn như insulin-like growth factor (IGF) và epidermal growth factor (EGF), có thể thúc đẩy sự phân chia và tăng trưởng của tế bào phôi. Các yếu tố tăng trưởng này cũng có thể bảo vệ phôi khỏi stress oxy hóa và các yếu tố gây hại khác, góp phần vào sự phát triển khỏe mạnh của phôi. Trong đó, IGF-1 đã được chứng minh là có vai trò quan trọng trong việc điều hòa sự tăng trưởng và phát triển của phôi, trong khi EGF có thể kích thích sự tăng sinh và biệt hóa của tế bào phôi [41].

Thứ ba, GM-CSF có thể ảnh hưởng đến sự trao đổi chất của phôi. GM-CSF đã được chứng minh là làm tăng sự hấp thu glucose và các chất dinh dưỡng khác vào phôi, cung cấp năng lượng cần thiết cho quá trình phân chia và tăng trưởng tế bào. GM-CSF cũng có thể kích thích sự hoạt động của các enzyme trao đổi chất trong phôi, giúp tối ưu hóa việc sử dụng năng lượng và thúc đẩy sự phát triển. Ví dụ, GM-CSF có thể tăng cường sự hoạt động của pyruvate dehydrogenase (PDH), một enzyme quan trọng trong quá trình chuyển hóa glucose thành năng lượng. Ngoài ra, GM-CSF có thể kích thích sự sản xuất adenosine triphosphate (ATP), nguồn năng lượng chính của tế bào [39].

Bảng 3.4. Kết quả động học phát triển của phôi có chất lượng loại 1 và 2

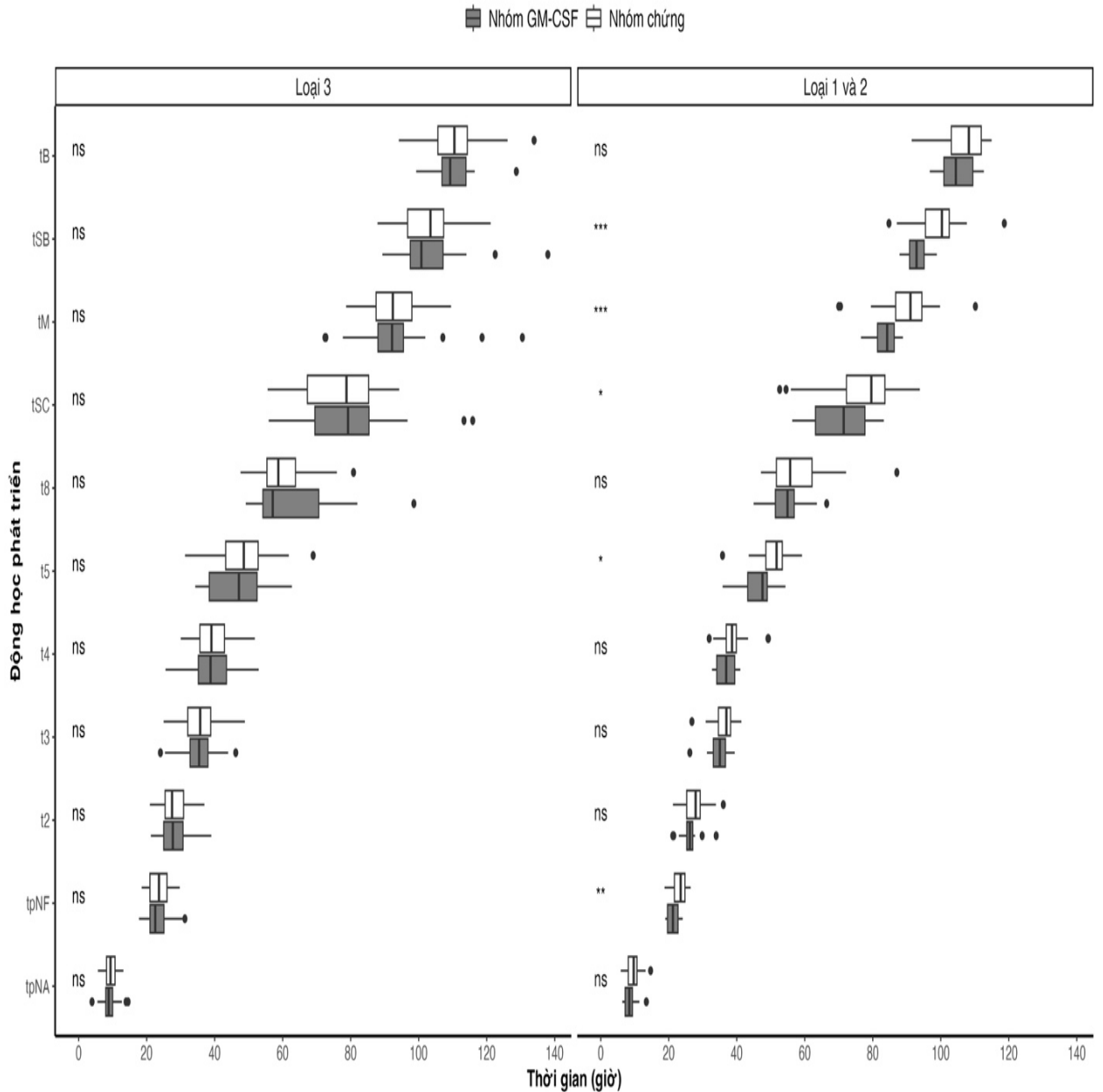
	<b>Nhóm GM-CSF (N=16)</b>	<b>Nhóm chứng (N=32)</b>	<b>Giá trị P</b>
<b>tPNa, giờ</b>	8,7±2,0	9,7±2,1	0,146
<b>tpNF, giờ</b>	21,3±1,8	23,1±2,2	0,004
<b>t2, giờ</b>	26,2±3,1	27,7±3,3	0,158
<b>t3, giờ</b>	34,5±3,3	36,2±3,3	0,116
<b>t4, giờ</b>	36,7±2,9	38,7±3,8	0,051
<b>t5, giờ</b>	46,1±5,5	50,4±4,8	0,012
<b>t8, giờ</b>	54,7±5,6	57,7±9,1	0,209
<b>tSC, giờ</b>	70,0±8,7	76,8±11,0	0,025
<b>tM, giờ</b>	83,4±3,7	90,3±7,8	<0,001
<b>tSB, giờ</b>	93,2±3,2	99,2±6,7	<0,001
<b>tB, giờ</b>	104,7±5,1	106,4±6,4	0,349
<b>Phân chia trực tiếp, n (%)</b>			0,95
DC1	1 (50,0)	2 (100,0)	
DC2	1 (50,0)	0 (0,0)	

Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn hoặc số lượng (%).

Bảng 3.5. Kết quả động học phát triển của phôi có chất lượng loại 3

	<b>Nhóm GM-CSF (N=56)</b>	<b>Nhóm chứng (N=54)</b>	<b>Giá trị P</b>
<b>tPNa, giờ</b>	9,1±2,0	9,3±1,9	0,503
<b>tpNF, giờ</b>	23,0±3,0	23,5±3,0	0,411
<b>t2, giờ</b>	28,0±4,1	28,2±4,1	0,88
<b>t3, giờ</b>	35,3±4,8	35,5±5,2	0,782
<b>t4, giờ</b>	39,3±5,3	39,5±5,2	0,865
<b>t5, giờ</b>	46,2±8,4	48,3±7,8	0,192
<b>t8, giờ</b>	62,7±11,7	59,8±8,1	0,225
<b>tSC, giờ</b>	78,3±12,2	76,8±10,6	0,502
<b>tM, giờ</b>	92,5±9,3	92,7±7,4	0,901
<b>tSB, giờ</b>	102,5±8,3	103,0±8,2	0,772
<b>tB, giờ</b>	110,1±6,3	111,0±8,9	0,717
<b>Phân chia trực tiếp, n (%)</b>			0,637
DC1	6 (60,0)	3 (42,9)	
DC2	4 (40,0)	4 (57,1)	

Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn hoặc số lượng (%).



Hình 3.6. Kết quả động học phát triển của phôi phân tích theo chất lượng phôi

Kết quả phân tích dưới nhóm phôi loại 3 cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về động học phát triển giữa nhóm có bổ sung GM-CSF so với nhóm chứng (bảng 3.4). Tuy nhiên ở nhóm phôi loại 1 và 2 thì tại các mốc thời gian t5, tSC, tM và tSB ngắn hơn có ý nghĩa thống kê giữa nhóm có bổ sung GM-CSF so với nhóm chứng (bảng 3.5). Điều này, lại một lần nữa gợi ý rằng GM-CSF có khả năng kích hoạt quá trình trao đổi chất của các phôi tiềm năng giúp phôi phát triển nhanh hơn.

Mặc dù sự khác biệt về thời gian phát triển đến giai đoạn 5 tế bào giữa hai nhóm không nhất thiết dẫn đến sự khác biệt về chất lượng phôi hoặc kết quả lâm sàng, nó có thể cung cấp một số thông tin hữu ích. Thứ nhất, sự khác biệt này có thể phản ánh

sự khác biệt về tiềm năng phát triển của phôi. Các phôi phát triển nhanh hơn có thể có khả năng làm tổ và phát triển thành thai nhi cao hơn. Tuy nhiên, điều này cần được xác nhận bằng các nghiên cứu tiếp theo. Thứ hai, sự khác biệt này có thể được sử dụng để tối ưu hóa quy trình nuôi cấy phôi. Ví dụ, nếu các phôi được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung GM-CSF phát triển nhanh hơn, có thể điều chỉnh thời gian chuyển phôi vào tử cung để tăng khả năng làm tổ thành công. Thứ ba, sự khác biệt này có thể cung cấp thông tin về cơ chế hoạt động của GM-CSF. Như đã đề cập ở trên, GM-CSF có thể ảnh hưởng đến sự biệt hóa, tăng trưởng và trao đổi chất của phôi. Việc nghiên cứu sự khác biệt về động học phát triển phôi giữa hai nhóm có thể giúp chúng ta hiểu rõ hơn về các cơ chế này. Tóm lại, mặc dù nghiên cứu này không tìm thấy sự khác biệt đáng kể về kết quả phôi học giữa hai nhóm, phân tích động học phát triển phôi cho thấy một số khác biệt thú vị. Sự khác biệt này có thể cung cấp thông tin hữu ích về tiềm năng phát triển của phôi, tối ưu hóa quy trình nuôi cấy phôi và cơ chế hoạt động của GM-CSF.

**3.4. NỘI DUNG 3:** So sánh các kết cục lâm sàng (tỉ lệ thử thai dương tính, tỉ lệ thai lâm sàng, tỉ lệ sảy thai, tỉ lệ thai diễn tiến và tỉ lệ làm tổ) của môi trường CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF vào môi trường CAPA-IVM so với nhóm không bổ sung GM-CSF.

Các kết cục liên quan đến chuyển phôi được trình bày trong Bảng 3.4

Bảng 3.6. Kết quả sự phát triển của phôi và kết quả thai

	<b>Nhóm GM-CSF (N = 40)</b>	<b>Nhóm chứng (N = 40)</b>	<b>AD (KTC 95%)</b>	<b>RR (KTC 95%)</b>	<b>Giá trị P</b>
<b>Số lượng phôi chuyển, n (%)</b>					0,95
1	3 (7,5)	4 (10,0)	-	-	
2	35 (87,5)	35 (87,5)	-	-	
<b>Tỉ lệ thử thai dương tính, n (%)</b>	24 (60,0)	17 (42,5)	15,2 (-6,6; 41,6)	1,4 (0,9; 2,2)	0,17
<b>Tỉ lệ làm tổ, n(%)</b>	42,1±39,1	26,9±38,0	13,1 (-2,3; 32,7)	-	0,09
<b>Tỉ lệ thai lâm sàng, n (%)</b>	24 (60,0)	15 (37,5)	22,5 (-1,3; 46,3)	1,6 (1; 2,6)	0,06
<b>Tỉ lệ sảy thai (trước 12 tuần), n (%)</b>	4 (10,0)	1 (2,5)	7,5 (-5,5; 20,5)	4 (0,5; 34,2)	0,39
<b>Thai ngoài tử cung, n (%)</b>	1 (2,5)	0 (0,0)	-	-	0,63

	<b>Nhóm GM-CSF (N = 40)</b>	<b>Nhóm chứng (N = 40)</b>	<b>AD (KTC 95%)</b>	<b>RR (KTC 95%)</b>	<b>Giá trị P</b>
<b>Thai diễn tiến, n (%)</b>	19 (47,5)	14 (35,0)	12,5 (-11,4; 36,4)	1,4 (0,8; 2,3)	0,43
<b>Sẩy thai (trong khoảng 12-24 tuần), n (%)</b>	0 (0,0)	1 (2,5)	-	-	0,99
<b>Sinh non, n (%)**</b>	2 (5,0)	4 (10,0)	-5 (-19; 9)	0,5 (0,1; 2,58)	0,68
<28 tuần	0 (0,0)	2 (5,0)			-
28 đến <34 tuần	0 (0,0)	0 (0,0)			-
34 đến <37 tuần	2 (5,0)	2 (5,0)			0,99
<b>Tuổi thai lúc sinh (tuần)</b>	37,5±1,0	35,1±4,8	2,4 (-0,6; 5,4)		0,04
<b>Trẻ sinh sống, n (%)</b>	19 (47,5)	13 (32,5)	15 (-8,7; 38,7)	1,5 (0,9; 2,5)	0,37
Đơn thai	11 (57,9)	8 (61,5)			
Sinh đôi	8 (42,1)	5 (38,5)			
<b>Cân nặng, gam</b>					
Sinh đơn	3045,5±4 52,5	2691,9±87 3,4	353,6 (-401,3; 1108,5)		0,78
Sinh đôi	2325,0±4 50,9	1680,0±63 9,1	645 (150,6; 1139,4)		0,01

\* Một bệnh nhân chưa quay trở lại để chuyển phôi trong nhóm GM-CSF. Hai bệnh nhân không có phôi để chuyển (01 ca mỗi nhóm).\*\* Tất cả trẻ sơ sinh non đều sống ở cả hai nhóm. Số liệu được trình bày dưới dạng Trung vị [Bách phân vị 1; Bách phân vị 3] hoặc trung bình ± độ lệch chuẩn hoặc số lượng (%).AD: khác biệt tuyệt đối; RR: khác biệt tương đối; KTC:khoảng tin cậy



Đặc thù số phôi chuyên hiện nay phải tuân theo quy định hạn chế đa thai. Vì vậy, theo khuyến cáo ASRM (2017) [43] thì số phôi chuyển đối với ngày 3 nên là 2 phôi. Vì vậy, phần lớn số phôi được chuyển là 2 trong chu kì chuyển phôi đầu tiên. Tuy nhiên, việc chọn lựa số phôi chuyển còn phụ thuộc vào chất lượng phôi, tình trạng cũng như yêu cầu của bệnh nhân. Nhìn chung số phôi chuyển giữa 2 nhóm không có sự khác biệt thống kê ( $P=0,7$ ). Điều này giúp hạn chế sự khác nhau giữa đặc điểm giữa hai nhóm.

Về kết cục thai sau chuyển phôi, kết quả về tỉ lệ làm tổ, tỉ lệ thai diễn tiến không tăng đáng kể, nhưng tỷ lệ thai lâm sàng thì nhóm GM-CSF cao hơn đáng kể nhóm chứng (60% so với 37,5%,  $P=0,17$ ). Từ kết quả này cho thấy, mặc dù tỉ lệ tạo phôi hữu dụng ở giai đoạn hai tiền nhân giữa hai nhóm GM-CSF và nhóm chứng chênh lệch không nhiều (37,5% với 35,4%,  $P=0,6$ ), nhưng chất lượng phôi tạo ra có sự khác biệt về khả năng phát triển. Đồng thời kết quả tỉ lệ lâm sàng này của nhóm chứng, tương tự như các kết quả trước đây của De Vos và cs (2011), Ho và cs (2018), Shalom-Paz và cs (2011) [52, 19]. Đặc biệt, trong các báo cáo về hiệu quả IVF thường sử dụng trên thế giới, ghi nhận tỉ lệ thai lâm sàng chỉ dao động từ 20-30%.

Nếu thai kì tiếp diễn sau 12 tuần, bệnh nhân được siêu âm lại để xác định tim thai và được gọi là thai diễn tiến. Yếu tố này phản ánh khả năng phát triển của phôi khi thay vì dừng lại ở thời điểm có túi thai nhưng không có sự phát triển của phôi thai, điển hình là tim thai và kết quả đạt được giữa 2 nhóm là 47,5% và 35,0% ( $p=0,43$ ). Đối với tình trạng sảy thai, trường hợp dưới 12 tuần thì nhóm GM-CSF có 4 ca cao hơn nhóm chứng 1 ca (10% với 2,5%,  $P=0,39$ ). Còn trường hợp sảy thai 12-24 tuần thì trong nhóm GM-CSF không xảy ra, trong khi nhóm chứng xảy ra 1 ca. Và không ghi nhận được sự khác biệt giữa các nhóm về cân nặng trẻ sau sinh đối với sinh đơn. Tuy nhiên, ở trường hợp song sinh, GM-CSF trẻ sinh ra có cân nặng cao hơn nhóm chứng ( $P=0,011$ ). Điều này có thể được lý giải do tuổi thai ở nhóm GM-CSF cao hơn nhóm chứng (37,5 tuần so với 35,1 tuần,  $P=0,04$ ). Riêng đối với tỉ lệ trẻ sinh sống mặc dù GM-CSF (47,5%) có xu hướng cao hơn nhóm không bổ sung GM-CSF (32,5%) nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm. Nguyên nhân có thể do cỡ mẫu nghiên cứu này chưa đủ lớn. Cũng như nghiên cứu gần đây, trên quần thể người Việt Nam của Ho và cộng sự (2018) cho thấy hiệu quả điều trị IVF trên đối tượng là bệnh nhân PCOS. Kết quả từ nghiên cứu ghi nhận tỷ lệ trẻ sinh sống là 33,7%; tỉ lệ làm tổ của phôi là 25,6%; tỉ lệ sảy thai trước 12 tuần là 9,1% [30]. Một nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng đa trung tâm, mù đôi thực hiện tại 4 trung tâm TTON tại Bắc Âu trên 1149 chu kỳ điều trị (có bổ sung GM-CSF là 564 và không bổ sung là 585 chu kỳ). Tỷ lệ trẻ sinh sống ở nhóm có bổ sung cao hơn

ở nhóm có bổ sung GM-CSF so với nhóm không bổ sung GM-CSF (28,9% so với 24,1%, OR 1,35, khoảng tin cậy 95% 1,03–1,78) [67]. Một nghiên cứu hồi cứu trên 212 chu kỳ điều trị TTON trên nhóm phụ nữ trên 35 tuổi (117 có bổ sung GM-CSF và 95 không bổ sung GM-CSF) cũng ghi nhận không có khác biệt của việc bổ sung GM-CSF lên chất lượng phôi [66]. Tuy nhiên, tỷ lệ sảy thai sinh hoá ở nhóm có bổ sung thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không bổ sung (20,8% so với 55,6%,  $p < 0,05$ ). Điều này gợi ý về vai trò của GM-CSF trong việc cải thiện tiềm năng làm tổ của phôi nang ở phụ nữ lớn tuổi [66, 67]. Ở một khía cạnh khác, Chen và cs. (2021) ghi nhận sự có mặt của GM-CSF trong môi trường nuôi cấy đơn phôi nang có liên quan đến chất lượng phôi và kết cục thai sau chuyển phôi [13]. Tỷ lệ phôi nang chất lượng tốt cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm phôi có nồng độ GM-CSF cao so với trung bình và thấp (80% so với 53,57% và 49,21%,  $p = 0,01$ ) [30]. Ngược lại, một phân tích gộp công bố trên thư viện Cochrane của Armstrong và cs. (2020) lại ghi nhận chưa có bằng chứng rõ ràng về hiệu quả thực sự của bổ sung GM-CSF trong kỹ thuật TTON trên tỷ lệ trẻ sinh sống (OR 1,19, khoảng tin cậy 95% 0,93 – 1,52, 2 nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng,  $N = 1432$ ,  $I^2 = 69\%$ , chất lượng bằng chứng thấp) [5]. Tóm lại, dù tỷ lệ làm tổ và tỷ lệ thai lâm sàng cao hơn ở nhóm bổ sung GM-CSF cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không bổ sung GM-CSF, không có khác biệt liên quan đến kết cục trẻ sinh sống và các kết cục thai khác giữa hai nhóm này.

Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với một số nghiên cứu trước đây đã báo cáo những cải thiện về kết quả lâm sàng sau khi bổ sung GM-CSF vào môi trường nuôi cấy phôi. Ví dụ, một nghiên cứu của Sjöblom và cộng sự (2002) đã chứng minh rằng GM-CSF ngăn ngừa quá trình chết rụng tế bào của khối tế bào bên trong phôi người, có thể cải thiện khả năng sống của phôi [53]. Một nghiên cứu khác của Kawamura và cộng sự (2009) cho thấy GM-CSF thúc đẩy quá trình làm tổ và phát triển nhau thai bằng cách kích thích sự tăng trưởng và sống sót của tế bào trophoblast [33].

Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác lại không tìm thấy hiệu quả có lợi của GM-CSF đối với kết quả IVF. Ví dụ, một nghiên cứu của Ziebe và cộng sự (2013) đã không tìm thấy sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ mang thai lâm sàng hoặc tỷ lệ sinh sống giữa các phôi được nuôi cấy trong môi trường có hoặc không có GM-CSF. Những khác biệt này có thể là do sự khác biệt về thiết kế nghiên cứu, quần thể bệnh nhân hoặc giao thức nuôi cấy phôi. Sự khác biệt về kết quả có thể là do sự khác biệt về quần thể bệnh nhân, liều lượng GM-CSF được sử dụng, hoặc thời điểm bổ sung GM-CSF vào môi trường nuôi cấy [67].

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

**NỘI DUNG 1:** So sánh các kết cục phôi học (tỉ lệ noãn trưởng thành, tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi nang) của môi trường CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF vào môi trường CAPA-IVM so với nhóm không bổ sung GM-CSF: không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ noãn trưởng thành, tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ tạo phôi nang giữa môi trường CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF so với nhóm không bổ sung GM-CSF (với các tỉ lệ lần lượt là 65,9% so với 65,5%  $P = 0,307$ ; 71,4% so với 75,7%  $P = 0,946$  và 33,3% so với 25,0%  $P = 0,42$ )

**NỘI DUNG 2:** So sánh động học phát triển phôi của môi trường CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF vào môi trường CAPA-IVM so với nhóm không bổ sung GM-CSF: Không có sự khác biệt về động học phát triển phôi ở các giai đoạn tPNa, tpNF, t2, t3, t4, t8, tSC, tM, tSB, tB giữa hai nhóm. Tuy nhiên thời điểm t5 của nhóm GM-CSF ngắn hơn 3 tiếng so với nhóm chứng khác biệt có ý nghĩa thống kê (46,2 giờ so với 49,1 giờ;  $P = 0,016$ )

**NỘI DUNG 3:** So sánh các kết cục lâm sàng (tỉ lệ thử thai dương tính, tỉ lệ thai lâm sàng, tỉ lệ sảy thai, tỉ lệ thai diễn tiến và tỉ lệ làm tổ) của môi trường CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF vào môi trường CAPA-IVM so với nhóm không bổ sung GM-CSF: không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ thử thai dương tính, tỉ lệ thai lâm sàng, tỉ lệ sảy thai, tỉ lệ thai diễn tiến và tỉ lệ làm tổ giữa hai nhóm (60% so với 42,5%  $P = 0,17$ ; 60% so với 37,5%  $P = 0,06$ ; 10% so với 2,5%  $P = 0,39$ ; 47,5% so với 35%  $P = 0,43$ ; 42,1% so với 26,9%  $P = 0,09$ )

**KIẾN NGHỊ**

Thứ nhất, cần lặp lại nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn để có kết luận chính xác về hiệu quả lâm sàng. Thứ hai, nghiên cứu thêm các yếu tố tăng trưởng khác bên cạnh GM-CSF. Thứ ba, đánh giá tác động của GM-CSF lên biểu hiện gen và protein trong phôi, điều này có thể cung cấp thêm thông tin về cơ chế hoạt động của GM-CSF. Cuối cùng, nghiên cứu không theo dõi sự phát triển lâu dài của trẻ sinh ra từ các phôi được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung GM-CSF. Cần có các nghiên cứu dài hạn để đánh giá sự an toàn và hiệu quả của phương pháp này.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ**

**Phạm Dương Toàn, Hồ Ngọc Anh Vũ, Lê Hoàng Anh, Vương Thị Ngọc Lan.** Hiệu quả bổ sung Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) trong môi trường cấy trứng thành noãn trên tỷ lệ tạo phôi nang ở bệnh nhân hiếm muộn điều trị kỹ thuật trứng thành noãn (CAPA-IVM). Y Học TP. Hồ Chí Minh \* Tập 26 \* Số 1 \* 2022.

## DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lan, Vương Thị Ngọc (2002), Sự phát triển nang noãn, sự trưởng thành của noãn và sự phóng noãn.
2. Vương Thị Ngọc Lan, Hồ Mạnh Tường (2011), *Thụ tinh trong ống nghiệm*, NXBGD Việt Nam, 313-341.
3. Hussein, Tamer S., et al. (2011), "Temporal effects of exogenous oocyte-secreted factors on bovine oocyte developmental competence during IVM", *Reproduction, Fertility, and Development*. 23(4), pp. 576-584.
4. Albuz, F. K., et al. (2010), "Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes", *Human Reproduction (Oxford, England)*. 25(12), pp. 2999-3011.
5. Armstrong, Sarah, et al. (2020), "GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) supplementation in culture media for women undergoing assisted reproduction", *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 7, p. CD013497.
6. Bagley, C. J., et al. (1997), "The structural and functional basis of cytokine receptor activation: lessons from the common beta subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors", *Blood*. 89(5), pp. 1471-1482.
7. Baldwin, G. C., et al. (1993), "Identification and characterization of a high-affinity granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor on primary rat oligodendrocytes", *Blood*. 82(11), pp. 3279-3282.
8. Baldwin, G. C., et al. (1989), "Nonhematopoietic tumor cells express functional GM-CSF receptors", *Blood*. 73(4), pp. 1033-1037.
9. Brännström, M., et al. (1994), "Rat ovary produces cytokines during ovulation", *Biology of Reproduction*. 50(1), pp. 88-94.
10. Buccione, R., et al. (1990), "FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte", *Developmental Biology*. 138(1), pp. 16-25.
11. Cha, K. Y., et al. (1991), "Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program", *Fertil Steril*. 55(1), pp. 109-113.
12. Chang, M. C. (2005), "The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the Fallopian tubes", *Journal of Experimental Zoology*. 128(2), pp. 379-405.
13. Chen, Peilin, et al. (2021), "Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor in Single Blastocyst Conditioned Medium as a Biomarker for Predicting Implantation Outcome of Embryo", *Frontiers in Immunology*. 12, p. 679839.
14. Child, T. J., et al. (2001), "In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome", *Fertility and Sterility*. 76(5), pp. 936-942.
15. Child, Tim J., et al. (2002), "A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for women with polycystic ovaries", *Obstetrics and Gynecology*. 100(4), pp. 665-670.
16. Christ, J. P. and Cedars, M. I. (2023), "Current Guidelines for Diagnosing PCOS", *Diagnostics (Basel)*. 13(6).
17. Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E. (1999), "Cellular survival: a play in three Acts", *Genes & Development*. 13(22), pp. 2905-2927.

18. de Groot, R. P., Coffey, P. J., and Koenderman, L. (1998), "Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family", *Cell Signal*. 10(9), pp. 619-28.
19. De Vos, Michel, et al. (2011), "Clinical outcome of non-hCG-primed oocyte in vitro maturation treatment in patients with polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome", *Fertility and Sterility*. 96(4), pp. 860-864.
20. Ding, D. X., et al. (1994), "The alpha subunit of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor signals for glucose transport via a phosphorylation-independent pathway", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(7), pp. 2537-2541.
21. Dragovic, Rebecca A., et al. (2005), "Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion", *Endocrinology*. 146(6), pp. 2798-2806.
22. Edwards, R. G. (1962), "Meiosis in Ovarian Oocytes of Adult Mammals", *Nature*. 196(4853), pp. 446-450.
23. Edwards, R. G. (1965), "Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes", *Nature*. 208(5008), pp. 349-51.
24. Edwards, R. G., Bavister, B. D., and Steptoe, P. C. (1969), "Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro", *Nature*. 221(5181), pp. 632-635.
25. Edwards, Robert Geoffrey, Edwards, Robert Geoffrey, and Steptoe, Patrick Christopher (1980), *A Matter of Life: The Story of a Medical Breakthrough*.
26. Gandolfi, S., et al. (2001), "Three-month comparison of bimatoprost and latanoprost in patients with glaucoma and ocular hypertension", *Advances in Therapy*. 18(3), pp. 110-121.
27. Gilchrist, R. B., et al. (2016), "Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides", *Reproduction (Cambridge, England)*. 152(5), pp. R143-157.
28. Gilchrist, Robert B. (2011), "Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation", *Reproduction, Fertility, and Development*. 23(1), pp. 23-31.
29. Hill, A. D., et al. (1995), "The effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myeloid cells and its clinical applications", *Journal of Leukocyte Biology*. 58(6), pp. 634-642.
30. Ho, V. N. A., et al. (2018), "Live birth rate after human chorionic gonadotropin priming in vitro maturation in women with polycystic ovary syndrome", *J Ovarian Res*. 11(1), p. 70.
31. Huang, Weiping, et al. (2014), "Prematurational culture with 3-isobutyl-1-methylxanthine synchronizes meiotic progression of the germinal vesicle stage and improves nuclear maturation and embryonic development in in vitro-grown bovine oocytes", *The Journal of Reproduction and Development*. 60(1), pp. 9-13.
32. Jasper, M. J., et al. (1996), "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: presence in human follicular fluid, protein secretion and mRNA expression by ovarian cells", *Molecular Human Reproduction*. 2(8), pp. 555-562.
33. Kawamura, K., et al. (2009), "Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival", *Endocrinology*. 150(8), pp. 3774-82.
34. Kawamura, K., et al. (2008), "Completion of Meiosis I of preovulatory oocytes and facilitation of preimplantation embryo development by glial cell line-derived neurotrophic factor", *Dev Biol*. 315(1), pp. 189-202.

35. Khamsi, F., Armstrong, D. T., and Zhang, X. (1996), "Expression of urokinase-type plasminogen activator in human preimplantation embryos", *Mol Hum Reprod.* 2(4), pp. 273-6.
36. Kuwayama, M. (2007), "Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method", *Theriogenology.* 67(1), pp. 73-80.
37. Luciano, Alberto Maria and Sirard, Marc-André (2018), "Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation", *Biology of Reproduction.* 98(2), pp. 162-169.
38. Metcalf, D., et al. (1990), "Low-affinity placenta-derived receptors for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor can deliver a proliferative signal to murine hemopoietic cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 87(12), pp. 4670-4674.
39. Na, Y. R., et al. (2016), "GM-CSF Induces Inflammatory Macrophages by Regulating Glycolysis and Lipid Metabolism", *J Immunol.* 197(10), pp. 4101-4109.
40. Park, Jy-Young, et al. (2004), "EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle", *Science (New York, N.Y.)*. 303(5658), pp. 682-684.
41. Peralta, Oscar A., et al. (2013), "Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) enhances cumulus cell expansion in bovine oocytes", *Reproductive Biology and Endocrinology.* 11(1), p. 55.
42. Pincus, G. and Enzmann, E. V. (1935), "The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. The Activation of Ovarian Eggs", *J Exp Med.* 62(5), pp. 665-75.
43. Practice Committee of the American Society for Reproductive, Medicine and the Practice Committee for the Society for Assisted Reproductive Technologies. Electronic address, Asrm asrm org (2021), "Guidance on the limits to the number of embryos to transfer: a committee opinion", *Fertil Steril.* 116(3), pp. 651-654.
44. Racowsky, C. and Baldwin, K. V. (1989), "In vitro and in vivo studies reveal that hamster oocyte meiotic arrest is maintained only transiently by follicular fluid, but persistently by membrana/cumulus granulosa cell contact", *Developmental Biology.* 134(2), pp. 297-306.
45. Robertson, S. A., Mayrhofer, G., and Seamark, R. F. (1996), "Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse", *Biology of Reproduction.* 54(1), pp. 183-196.
46. Romero, Sergio, et al. (2016), "Immature Oocytes from Unprimed Juvenile Mice Become a Valuable Source for Embryo Production When Using C-Type Natriuretic Peptide as Essential Component of Culture Medium", *Biology of Reproduction.* 95(3), p. 64.
47. Ruef, C. and Coleman, D. L. (1990), "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness", *Reviews of Infectious Diseases.* 12(1), pp. 41-62.
48. Sánchez, F., et al. (2017), "An improved IVM method for cumulus-oocyte complexes from small follicles in polycystic ovary syndrome patients enhances oocyte competence and embryo yield", *Human Reproduction (Oxford, England).* 32(10), pp. 2056-2068.
49. Sánchez, F., et al. (2015), "Human cumulus-enclosed germinal vesicle oocytes from early antral follicles reveal heterogeneous cellular and molecular features associated with in vitro maturation capacity", *Human Reproduction (Oxford, England).* 30(6), pp. 1396-1409.
50. Sasseville, Maxime, et al. (2010), "Growth differentiation factor 9 signaling requires ERK1/2 activity in mouse granulosa and cumulus cells", *Journal of Cell Science.* 123(Pt 18), pp. 3166-3176.



51. Scarpellini, F. and Sbracia, M. (2009), "Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomised controlled trial", *Human Reproduction*. 24(11), pp. 2703-2708.
52. Shalom-Paz, Einat, et al. (2011), "Priming in vitro maturation cycles with gonadotropins: salvage treatment for nonresponding patients", *Fertility and Sterility*. 96(2), pp. 340-343.
53. Sjöblom, Cecilia, Wikland, Matts, and Robertson, Sarah A. (2002), "Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Acts Independently of the Beta Common Subunit of the GM-CSF Receptor to Prevent Inner Cell Mass Apoptosis in Human Embryos<sup>1</sup>", *Biology of Reproduction*. 67(6), pp. 1817-1823.
54. Soto-Heras, Sandra, et al. (2019), "Biphasic in vitro maturation with C-type natriuretic peptide enhances the developmental competence of juvenile-goat oocytes", *PLOS ONE*. 14(8), p. e0221663.
55. Spanos, S., et al. (2000), "Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development", *Biol Reprod*. 63(5), pp. 1413-20.
56. Sreenan, J. (1970), "<i>In vitro</i> maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes", *The Journal of Agricultural Science*. 75(3), pp. 393-396.
57. Vuong, Lan N., et al. (2020), "In-vitro maturation of oocytes versus conventional IVF in women with infertility and a high antral follicle count: a randomized non-inferiority controlled trial", *Human Reproduction*. 35(11), pp. 2537-2547.
58. Yeo, Christine X., et al. (2008), "Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice", *Human Reproduction (Oxford, England)*. 23(1), pp. 67-73.
59. Yoshino, Osamu, et al. (2006), "A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(28), pp. 10678-10683.
60. Zambrano, Angara, et al. (2010), "Cytokine stimulation promotes increased glucose uptake via translocation at the plasma membrane of GLUT1 in HEK293 cells", *Journal of Cellular Biochemistry*. 110(6), pp. 1471-1480.
61. Zhang, Junhong, et al. (2015), "Effect of C-Type Natriuretic Peptide on Maturation and Developmental Competence of Goat Oocytes Matured In Vitro", *PLOS ONE*. 10(7), p. e0132318.
62. Zhang, Meijia, et al. (2010), "Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes", *Science (New York, N.Y.)*. 330(6002), pp. 366-369.
63. Zhao, Y. and Chegini, N. (1994), "Human fallopian tube expresses granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF alpha and beta receptors and contain immunoreactive GM-CSF protein", *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 79(2), pp. 662-665.
64. Zhao, Y., Rong, H., and Chegini, N. (1995), "Expression and selective cellular localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF alpha and beta receptor messenger ribonucleic acid and protein in human ovarian tissue", *Biology of Reproduction*. 53(4), pp. 923-930.
65. Zhenwei, J. and Xianhua, Z. (2019), "Pre-IVM treatment with C-type natriuretic peptide in the presence of cysteamine enhances bovine oocytes antioxidant defense ability and developmental competence in vitro", *Iranian Journal of Veterinary Research*. 20(3), pp. 173-179.
66. Zhou, Wenhui, et al. (2016), "Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor supplementation in culture medium on embryo quality and pregnancy outcome

- of women aged over 35 years", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 33(1), pp. 39-47.
67. Ziebe, Søren, et al. (2013), "A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization", *Fertility and Sterility*. 99(6), pp. 1600-1609.

## PHỤ LỤC

### PHỤ LỤC 1: Chấp thuận của hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học bệnh viện mỹ đức, số 01/21/DD-BVMD, ngày 22/02/2021

BỆNH VIỆN ĐA KHOA MỸ ĐỨC  
HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Số: 01/2021/MD – HDDD

TP. Hồ Chí Minh, ngày 22 tháng 02 năm 2021

V/v Chấp thuận các vấn đề đạo đức  
và khoa học trong NCYSH

#### CHẤP THUẬN (CHO PHÉP) CỦA HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH HỌC

Căn cứ Quyết định số 242/QĐ-K2ĐT ngày 18 tháng 12 năm 2014 của Cục trưởng Cục Khoa học công nghệ và Đào tạo về việc cấp mã số hoạt động cho Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học cấp cơ sở;

Căn cứ Quyết định số 165/2019/QĐ-BVMD ngày 18 tháng 11 năm 2019 của Giám đốc bệnh viện đa khoa Mỹ Đức về việc thành lập Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học;

Trên cơ sở biên bản Hội đồng đạo đức đánh giá khía cạnh đạo đức và khoa học của đề tài nghiên cứu Y sinh học ngày 07 tháng 02 năm 2021 (đính kèm biên bản).

Nay Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Bệnh viện đa khoa Mỹ Đức **chấp thuận (cho phép)** về các khía cạnh đạo đức và khoa học trong nghiên cứu đối với Đề tài/Dự án:

- **Tên đề tài:** Hiệu quả của việc bổ sung GM-CSF trong môi trường CAPA-IVM lên tỷ lệ thành công của bệnh nhân PCOS đi điều trị hiếm muộn bằng kỹ thuật IVM.
- **Mã số:** 01/21/DD-BVMD
- **Chủ nhiệm đề tài:** PGS. TS. BS. Vương Thị Ngọc Lan
- **Đơn vị chủ trì:** Bệnh viện đa khoa Mỹ Đức
- **Thời gian tiến hành nghiên cứu:** 40 tháng (kể từ ngày chấp thuận)

**Ngày chấp thuận (cho phép):** Ngày 22 tháng 02 năm 2021

Lưu ý:

- HDDD tiếp tục giám sát nghiên cứu trong suốt thời gian tiến hành nghiên cứu.
- Danh mục hồ sơ được HDDD thông qua theo danh sách đính kèm.

XÁC NHẬN CỦA CQ CHỦ TRÌ



BS. Trịnh Viết Tín

TM. HỘI ĐỒNG  
CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

GS. TS. BS. Trương Phi Hùng

**PHỤ LỤC 2: Danh sách bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu**

<b>ID</b>	<b>Ho_ten</b>	<b>Can_thiep</b>	<b>Nam_sinh</b>	<b>Can_nang</b>	<b>Chieu_cao</b>	<b>Ngay_thu_thuat</b>
17412040	TTHT	Nhóm chứng	1990	51	157	1/12/21
19416760	NTHL	Nhóm GM-CSF	1991	50	155	7/4/21
19417484	HMTT	Nhóm GM-CSF	1990	51	153	4/12/21
20010360	TTTL	Nhóm GM-CSF	1992	55	158	30/6/21
20073051	QTN	Nhóm GM-CSF	1990	57	153	21/4/21
21005884	AZ-M	Nhóm chứng	1993	52	162	16/5/21
21012259	PTTV	Nhóm chứng	1988	50	152	27/3/21
21019376	HTHT	Nhóm GM-CSF	1986	67	157	11/4/21
21024400	LTTD	Nhóm GM-CSF	1986	54	158	10/5/21
21040515	TTMT	Nhóm chứng	1990	60	160	2/10/21
21061101	NTH	Nhóm GM-CSF	1992	51	150	25/10/21
21400791	VNTN	Nhóm chứng	1993	48	150	22/11/21
21003831	NTL	Nhóm chứng	1993	58	152	15/4/21
17432942	NTTT	Nhóm GM-CSF	1991	50	151	7/4/21
21010277	NTH	Nhóm chứng	1993	48	150	24/3/21
20018485	VPLY	Nhóm GM-CSF	1991	48	150	25/3/21
19041943	VTL	Nhóm chứng	1991	80	158	25/3/21
21004289	ĐTT	Nhóm chứng	1993	58	158	10/11/21

21063329	PTML	Nhóm chứng	1991	60	160	6/11/21
21059465	TTT	Nhóm GM-CSF	1994	50	163	17/10/21
19055515	LTHH	Nhóm chứng	1989	48	150	17/4/21
20016021	NTYN	Nhóm chứng	1988	70	150	5/5/21
21019646	TTHT	Nhóm GM-CSF	1984	57	149	14/4/21
21012287	ĐTYM	Nhóm chứng	1996	56	158	3/4/21
20053179	NTPT	Nhóm chứng	1989	53	152	3/4/21
20055400	NTMT	Nhóm chứng	1995	51	152	31/3/21
21016960	NTBT	Nhóm GM-CSF	1990	53	165	11/4/21
21018131	ĐTTH	Nhóm chứng	1994	74	160	18/4/21
19405375	PTTT	Nhóm chứng	1988			14/4/21
21012840	ĐTHV	Nhóm chứng	1990	51	159	21/4/21
21020207	CTHM	Nhóm chứng	1995	78	162	21/4/21
21018127	TTQ	Nhóm GM-CSF	2001	47	160	25/4/21
20063484	NTÝN	Nhóm GM-CSF	1995	46	159	18/4/21
21017632	HY	Nhóm chứng	1991	52	162	10/4/21
21014165	TTT	Nhóm GM-CSF	1996	52.5	166	10/4/21
20070946	HLBH	Nhóm GM-CSF	1995	58	156	3/10/21
21009819	VTTT	Nhóm chứng	1991	67	158	24/4/21

20057509	BTL	Nhóm GM-CSF	1992	52	162	28/3/21
20053956	PTNN	Nhóm GM-CSF	1994	50	155	29/10/21
21063141	VTNÁ	Nhóm GM-CSF	1996	43	150	6/11/21
21013199	NTH	Nhóm chúng	1993	42	159	7/4/21
21013572	LTXT	Nhóm chúng	1995	43	160	10/4/21
21020195	NTMD	Nhóm GM-CSF	1993	61	157	17/4/21
21019024	NTNC	Nhóm chúng	1985	62	163	11/4/21
20021133	HTTN	Nhóm GM-CSF	1992	80	164	14/4/21
21016560	ĐTX	Nhóm GM-CSF	1991	51	161	31/3/21
21057213	TTT	Nhóm chúng	1995	60	159	22/10/21
21058561	NTKC	Nhóm chúng	1986	48	150	14/10/21
21058362	VTBA	Nhóm chúng	1992	47	152	11/10/21
21064920	LTMT	Nhóm chúng	1988	65	168	4/12/21
21022634	TTT	Nhóm chúng	1989	49	153	24/4/21
21011691	HTTG	Nhóm GM-CSF	1990	48	155	12/6/21
21011277	TTP	Nhóm chúng	1992	65	158	27/11/21
21016777	ÔKL	Nhóm GM-CSF	1990	56	155	25/4/21
20070763	NTTT	Nhóm chúng	1989	58	160	8/5/21
18722936	NHTV	Nhóm GM-CSF	1994	80	165	9/5/21

21024797	NTN	Nhóm chứng	1989	54	162	16/5/21
21027810	VTTM	Nhóm GM-CSF	1988	55	156	16/5/21
17029937	NTTN	Nhóm GM-CSF	1990	60	162	22/5/21
21026842	NMHD	Nhóm GM-CSF	1998	55	149	23/5/21
21027279	TTM	Nhóm chứng	1989	59	153	23/5/21
21028740	TTKX	Nhóm GM-CSF	1994	47.5	163	29/5/21
21028506	NTPY	Nhóm chứng	1986	60	155	30/5/21
21056804	KDQ	Nhóm GM-CSF	1995	45	153	14/10/21
21061620	ĐTPT	Nhóm chứng	1989	59	162	28/10/21
21050093	TTT	Nhóm GM-CSF	1990	66	161	29/10/21
21057079	LPT	Nhóm chứng	1994	54	160	30/10/21
21062625	TNHT	Nhóm chứng	1988	55	155	1/11/21
21063918	BTQ	Nhóm GM-CSF	1990	55	150	8/11/21
19505150	NTLH	Nhóm chứng	1994	60	160	12/11/21
21063139	BTMD	Nhóm GM-CSF	1994	70	150	20/11/21
18422801	TNLC	Nhóm GM-CSF	1990	45	168	25/11/21
21019635	VTTH	Nhóm GM-CSF	1984	50	158	1/12/21
21068406	TTM	Nhóm GM-CSF	1989	59	164	1/12/21
21063139	BTMD	Nhóm GM-CSF	1994	70	150	20/11/21

18422801	TNLC	Nhóm GM-CSF	1990	45	168	25/11/21
21019635	VTTH	Nhóm GM-CSF	1984	50	158	1/12/21
21068406	TTM	Nhóm GM-CSF	1989	59	164	1/12/21
19505150	NTLH	Nhóm chúng	1994	60	160	12/11/21
21028506	NTPY	Nhóm chúng	1986	60	155	30/5/21



# HIỆU QUẢ BỔ SUNG GRANULOCYTE MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR (GM-CSF) TRONG MÔI TRƯỜNG CẤY TRƯỞNG THÀNH NOÃN TRÊN TỈ LỆ TẠO PHÔI NANG Ở BỆNH NHÂN HIẾM MUỘN ĐIỀU TRỊ KỸ THUẬT TRƯỞNG THÀNH NOÃN (CAPA-IVM)

Phạm Dương Toàn<sup>1</sup>, Hồ Ngọc Anh Vũ<sup>1,2</sup>, Lê Hoàng Anh<sup>1,2</sup>, Vương Thị Ngọc Lan<sup>3</sup>

## TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) là một cytokine đa chức năng, giúp phôi phát triển hoàn chỉnh và tăng khả năng làm tổ của phôi. Bổ sung GM-CSF vào môi trường nuôi cấy phôi thụ tinh trong ống nghiệm cổ điển đã được nghiên cứu. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào trên người đánh giá hiệu quả của bổ sung GM-CSF vào môi trường cấy trứng thành noãn trong kỹ thuật trứng thành noãn (CAPA-IVM).

**Mục tiêu:** So sánh tỷ lệ tạo phôi nang của nhóm bệnh nhân điều trị CAPA-IVM có noãn được nuôi cấy trứng thành trong môi trường có bổ sung GM-CSF với nhóm không bổ sung GM-CSF.

**Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có nhóm chứng được thực hiện tại Đơn vị hỗ trợ sinh sản, bệnh viện Mỹ Đức. Bệnh nhân có hội chứng buồng trứng đa nang (PCOS) hoặc kiểu hình buồng trứng đa nang, tuổi dưới 37 được nhận vào nghiên cứu. Bệnh nhân được phân nhóm ngẫu nhiên tại thời điểm trước chọc hút noãn vào nhóm có noãn được nuôi cấy CAPA-IVM có hay không bổ sung GM-CSF.

**Kết quả:** Từ tháng 3 đến tháng 12/2021, có tổng cộng 80 bệnh nhân được nhận vào nghiên cứu, trong đó, có 40 bệnh nhân có noãn được nuôi cấy CAPA-IVM có bổ sung GM-CSF và 40 bệnh nhân có noãn được nuôi cấy CAPA-IVM không có bổ sung GM-CSF. Tỷ lệ tạo phôi nang được ghi nhận không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm (62,5% so với 55,2%,  $p=0,06$ ).

**Kết luận:** Chưa có bằng chứng rõ ràng về hiệu quả của việc bổ sung GM-CSF vào môi trường cấy trứng thành noãn giúp cải thiện tỷ lệ tạo phôi nang ở bệnh nhân hiếm muộn điều trị kỹ thuật CAPA-IVM.

**Từ khóa:** thụ tinh trong ống nghiệm, trứng thành noãn, GM-CSF, CAPA-IVM, phôi

## ABSTRACT

THE EFFECTIVENESS OF GRANULOCYTE MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR (GM-CSF) SUPPLEMENTATION ON THE BLASTULATION RATE IN WOMEN HAVING CAPA-IVM TREATMENT

Pham Duong Toan, Ho Ngoc Anh Vu, Le Hoang Anh, Vuong Thi Ngoc Lan

\* Ho Chi Minh City Journal of Medicine \* Vol. 26 - No 1 - 2022: 16-21

**Background:** Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is expressed in the female genital tract, and as a developmental programming agent, which enhances cell proliferation, embryo progression, blastocyst hatching, and embryo implantation. In conventional in-vitro fertilization, GM-CSF has been studied as a supplement in culture medium with positive effect in outcome, however, no studies are investigating the effect of GM-CSF on the capability to mature and embryology outcomes of the immature oocytes in the pre-mature step of

<sup>1</sup>Trung tâm nghiên cứu HOPE, Bệnh viện Mỹ Đức, TP. Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Đơn vị hỗ trợ sinh sản IVFMD, Bệnh viện Mỹ Đức, TP. Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Bộ môn Phụ Sản, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: BS. Phạm Dương Toàn   ĐT: 0986808979   Email: toan.pd@myduchospital.vn

CAPA-IVM on humans.

**Objective:** To compare the blastulation rate in patients who have immature oocytes cultured in CAPA-IVM medium supplemented with and without GM-CSF.

**Methods:** A randomized control trial was conducted at IVFMD, My Duc Hospital. Patients diagnosed with polycystic ovary syndrome or polycystic ovary morphology, aged <37 years, underwent CAPA-IVM treatment were included in the study. Randomisation was performed just prior to oocyte retrieval into group having oocytes cultured in CAPA medium supplemented with or without GM-CSF.

**Results:** From March to December 2021, a total of 80 patients were recruited to the study, of which, 40 were randomized to GM-CSF group and 40 without GM-CSF group. The blastulation rate was not significant different between two groups (62.5% vs 55.2%,  $p=0.06$ ).

**Conclusion:** There is not enough evidence to support the supplementation of GM-CSF to CAPA-IVM medium to improve the embryology outcomes in women treated with CAPA-IVM.

**Key words:** in-vitro fertilization, in-vitro maturation, GM-CSF, CAPA-IVM, embryos

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Kỹ thuật trưởng thành trứng noãn (*In-vitro* maturation - IVM) được xem là phương pháp điều trị hiếm muộn an toàn và giảm chi phí cho bệnh nhân PCOS<sup>(1)</sup>. Trong kỹ thuật IVM, bệnh nhân không thực hiện kích thích buồng trứng (KTBT) hoặc chỉ sử dụng một lượng tối thiểu FSH, hCG dưới dạng “mồi”, do đó, tránh được các biến chứng của KTBT như quá kích buồng trứng (QKBT), xoắn buồng trứng, xuất huyết buồng trứng... so với các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) có KTBT<sup>(2)</sup>. Hiện nay, đã có hơn 4000 em bé ra đời từ kỹ thuật IVM trên thế giới. Không có báo cáo nào ghi nhận có sự gia tăng tỉ lệ bất thường hay rối loạn phát triển ở các trẻ này<sup>(3)</sup>. Giai đoạn đầu của sự phát triển của kỹ thuật IVM, sự trưởng thành noãn người chỉ vào khoảng 30-50%, thấp hơn nhiều so với các chu kỳ có kích thích buồng trứng và tỉ lệ thai của IVM vẫn còn thấp<sup>(4)</sup>. Việc hiểu về cơ chế trưởng thành của noãn giúp ngày càng hoàn thiện điều kiện nuôi cấy trưởng thành và cải thiện tỉ lệ thành công của IVM. Một trong các lý do làm cho noãn non được nuôi cấy trưởng thành *in-vitro* có tiềm năng phát triển phôi kém hơn TTTON là sự không đồng bộ giữa trưởng thành của hạt nhân và tế bào chất của noãn IVM. Theo Pincus, Chang và Edwards, khi còn trong buồng trứng, noãn ở các giai đoạn trưởng thành khác nhau, sau khi được chọc hút noãn lấy ra ngoài,

noãn sẽ tự khôi phục giảm phân. Để đồng bộ hóa sự trưởng thành của nhân và tế bào chất, môi trường trưởng thành noãn CAPA-IVM có bổ sung CNP đã được áp dụng và ghi nhận có hiệu quả cải thiện tỉ lệ trưởng thành noãn và chất lượng phôi<sup>(5)</sup>.

GM-CSF là một yếu tố tăng trưởng quan trọng, giúp tăng khả năng phát triển và làm tổ của phôi. GM-CSF đã được nghiên cứu trong TTTON trên người để điều trị cho các trường hợp sảy thai liên tiếp<sup>(6)</sup>. Một nghiên cứu gần đây trên động vật đã ghi nhận bổ sung GM-CSF vào môi trường IVM có thể cải thiện tỷ lệ tạo phôi nang của kỹ thuật này. Chưa có nghiên cứu bổ sung GM-CSF vào môi trường nuôi cấy trưởng thành noãn trong kỹ thuật CAPA-IVM. Bệnh viện Mỹ Đức đã thực hiện thành công CAPA-IVM từ năm 2016. Chúng tôi đã thực hiện thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có nhóm chứng so sánh CAPA-IVM và TTTON và ghi nhận không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ trẻ sinh sống giữa 2 kỹ thuật này<sup>(7)</sup>. Tuy nhiên, trong nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng này, chúng tôi chỉ thực hiện chuyển phôi ngày 3. Với mong muốn tăng tỷ lệ tạo phôi nang của kỹ thuật CAPA-IVM, chúng tôi thực hiện nghiên cứu bổ sung GM-CSF vào môi trường nuôi cấy trưởng thành noãn với giả thuyết rằng việc bổ sung GM-CSF vào môi trường nuôi cấy IVM ở người sẽ làm tăng tỷ lệ tạo phôi nang tương đương với

tỷ lệ từ kỹ thuật thụ tinh ống nghiệm, giúp cho kỹ thuật CAPA-IVM trở thành một lựa chọn lâm sàng khả thi cho những bệnh nhân thực hiện hỗ trợ sinh sản. Mục tiêu của nghiên cứu này là so sánh tỷ lệ tạo phôi nang của nhóm bệnh nhân điều trị CAPA-IVM có noãn được nuôi cấy trưởng thành trong môi trường có bổ sung GM-CSF với nhóm không bổ sung GM-CSF.

## **ĐỐI TƯỢNG-PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **Đối tượng nghiên cứu**

Các bệnh nhân được điều trị bằng kỹ thuật trưởng thành noãn non CAPA-IVM. Nghiên cứu được thực hiện tại đơn vị hỗ trợ sinh sản, bệnh viện Mỹ Đức (IVFMD), TP.HCM từ tháng 3/2021 đến tháng 12/2021.

### **Tiêu chuẩn chọn mẫu**

Bệnh nhân được nhận vào nghiên cứu nếu thỏa các tiêu chuẩn chọn mẫu như sau:

### **Tiêu chuẩn nhận**

Bệnh nhân có hội chứng buồng trứng đa nang hoặc kiểu hình buồng trứng đa nang (có tối thiểu 25 nang đường kính từ 2 đến 9mm trên siêu âm).

Tuổi <37.

Được thực hiện kỹ thuật trưởng thành noãn non CAPA-IVM để điều trị hiếm muộn.

### **Tiêu chuẩn loại**

Xin noãn.

Thực hiện chẩn đoán di truyền tiền làm tổ.

### **Phương pháp nghiên cứu**

#### **Thiết kế nghiên cứu**

Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có nhóm chứng.

#### **Cỡ mẫu**

Cỡ mẫu của nghiên cứu được ước tính theo công thức so sánh hai giá trị trung bình. Trong đó, tỉ lệ tạo phôi nang trung bình ở nhóm CAPA-IVM không bổ sung GM-CSF tại IVFMD là 49%. Với giả định việc bổ sung GM-CSF vào môi trường CAPA-IVM sẽ giúp tăng tỉ lệ tạo phôi nang trung bình thêm 9%. Thì cỡ

mẫu cần thiết cho nghiên cứu là 80 bệnh nhân (40 bệnh nhân mỗi nhóm) trong đó sai lầm loại I là 0,05 (hai đuôi), lực cỡ mẫu là 80% và độ lệch chuẩn là 20%.

### **Phân bố ngẫu nhiên**

Bệnh nhân được giải thích về nghiên cứu và ký đồng thuận tham gia nghiên cứu. Bệnh nhân được phân nhóm ngẫu nhiên bằng phương pháp ngẫu nhiên theo khối với tỉ lệ 1:1 vào nhóm có bổ sung GM-CSF hoặc nhóm không bổ sung GM-CSF (Nhóm chứng). Người thực hiện ngẫu nhiên độc lập với nhóm nghiên cứu.

### **Phương pháp tiến hành**

Bệnh nhân được tiêm HP-hMG với liều là 150IU/ngày bắt đầu từ ngày 2 của chu kỳ kinh trong 2 ngày. Chọc hút noãn được tiến hành 42-46 giờ sau khi tiêm mũi HP-hMG cuối cùng.

Sau chọc hút noãn, các phức hợp noãn-tế bào quanh noãn được nuôi cấy tiền trưởng thành trong môi trường CAPA có và không có bổ sung GM-CSF trong 24 giờ. Sau khi nuôi cấy CAPA, noãn sẽ được chuyển vào môi trường IVM có bổ sung GM-CSF (Nhóm GM-CSF) hay không bổ sung GM-CSF (Nhóm chứng).

Đánh giá trưởng thành noãn và tách noãn được tiến hành sau 30 và 32 giờ sau cấy IVM ở cả 2 nhóm. Noãn trưởng thành được thụ tinh bằng kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI). Noãn sau đó sẽ được nuôi trong tủ cấy ở điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>. Kiểm tra thụ tinh được tiến hành 16-18h sau ICSI. Phôi được nuôi cấy đến ngày 5/6 trong môi trường (Life Global®, Canada). Mỗi giọt môi trường nuôi cấy phôi có thể tích 30 µL, chứa 1 noãn. Vào ngày 3 và 5 hay 6, phôi được đánh giá hình thái và phân loại theo đồng thuận Istanbul<sup>(6)</sup>. Các phôi đủ tiêu chuẩn sẽ được trữ lạnh lại theo phương pháp thủy tinh hoá sử dụng môi trường Cryotec®, Nhật Bản.

### **Kết cục của nghiên cứu**

Kết cục chính: tỷ lệ tạo phôi nang.

Kết cục phụ: tỷ lệ trưởng thành noãn, tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ tạo phôi ngày 3.

**Quản lý và xử lý số liệu**

Đặc điểm bệnh nhân được phân tích mô tả trong đó biến liên tục sẽ được trình bày dưới dạng trung bình và độ lệch chuẩn hoặc trung vị và khoảng tứ phân vị, biến định tính được trình bày dưới dạng số tuyệt đối và phần trăm.

Các kết quả phôi học được so sánh giữa hai nhóm bằng kiểm định phi tham số. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm R (Phiên bản 3.3.3).

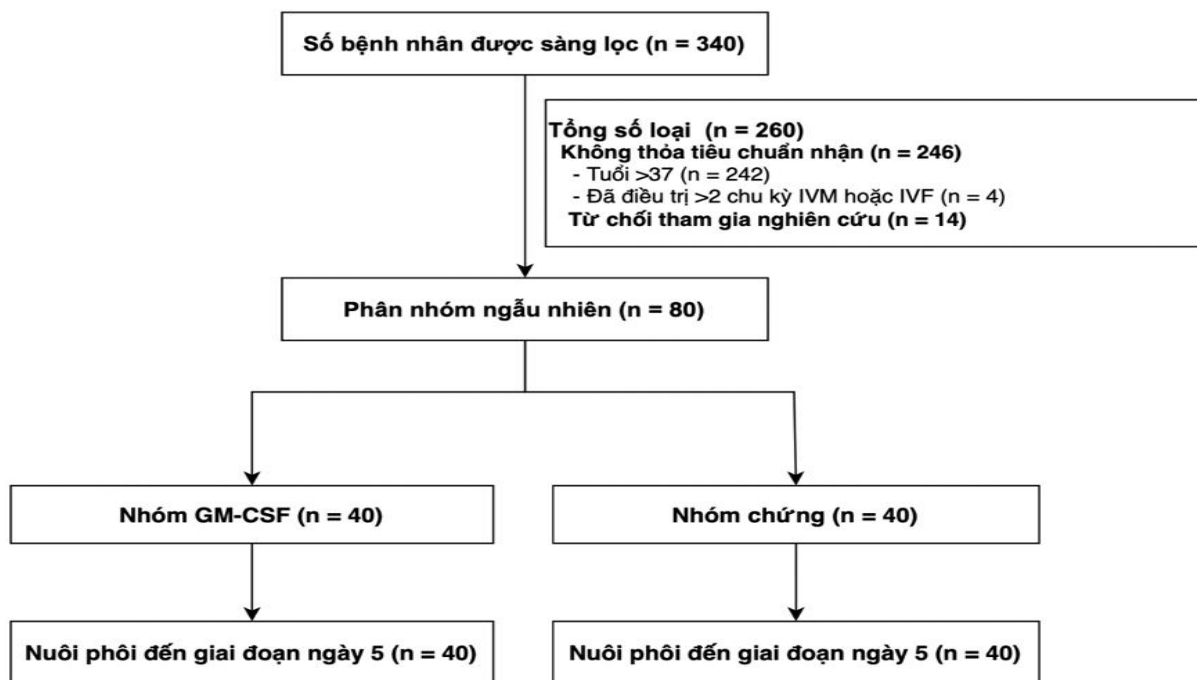
Giá trị  $p < 0,05$  được xem là có ý nghĩa thống kê.

**Y đức**

Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Bệnh viện Đa khoa Mỹ Đức, số 01/2021/MD-HĐĐĐ, ngày 22 tháng 02 năm 2021.

**KẾT QUẢ**

Từ tháng 3 đến tháng 12/2021, có 80 bệnh nhân thỏa tiêu chuẩn nhận – loại, đồng ý tham gia nghiên cứu được nhận vào nghiên cứu. Phân bố bệnh nhân trong nghiên cứu được trình bày trong Hình 1.



Hình 1. Lưu đồ nhận bệnh và phân nhóm ngẫu nhiên

Không có sự khác biệt về đặc điểm nền và đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân ở hai nhóm. Đặc điểm của bệnh nhân được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm nền và đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân

Đặc điểm	Nhóm GM-CSF (N=40)	Nhóm chứng (N=40)	Giá trị P
Tuổi, năm	29,62±3,68	30,15±2,94	0,483
Chỉ số khối cơ thể, kg/m <sup>2</sup>	22,22±3,75	23,11±3,32	0,27
Nồng độ AMH, ng/ml	6,63 [4,78;9,25]	8,06 [5,56;10,80]	0,166
Nồng độ FSH, IU/L	6,03 [4,50;7,32]	5,68 [4,49;6,73]	0,227

Đặc điểm	Nhóm GM-CSF (N=40)	Nhóm chứng (N=40)	Giá trị P
Nồng độ SHBG, nmol/L	40,88 [25,31;67,90]	36,72 [25,58;59,82]	0,82
Testosterone, nmol/L	1,30 [0,99;1,50]	1,05 [0,70;1,54]	0,415
Thời gian vô sinh, năm	2,00 [1,00;3,25]	2,00 [1,25;4,00]	0,88
Nguyên nhân vô sinh, n (%)			0,78
Nguyên phát	31 (77,50%)	33 (82,50%)	
Thứ phát	9 (22,50%)	7 (17,50%)	
Số chu kỳ TTON, n, (%)			0,99
1	38 (95,00%)	37 (92,50%)	
2	2 (5,00%)	3 (7,50%)	

AMH: Anti-mullerian hormone, FSH: Follicle-stimulating hormone, SHBG: Sex hormone binding globulin

Kết quả phôi học của noãn thu được từ 2 nhóm được trình bày trong *Bảng 2*.

**Bảng 2.** Kết quả phôi học giữa hai nhóm môi trường nuôi cấy

	Nhóm GM-CSF (N = 40)	Nhóm chứng (N = 40)	Giá trị P
Số noãn chọc hút	14,00 [11,00-22,00]	20,00 [13,50-25,00]	0,135
Số noãn được làm ICSI	10,00 [7,00-15,00]	12,50 [7,75-16,00]	0,36
Tỷ lệ trưởng thành noãn (MII), (%)	65,94 [57,14-75,48]	65,45 [51,50-70,00]	0,307
Tỷ lệ thụ tinh, (%)	71,43 [62,48-84,59]	75,74 [61,35-85,71]	0,946
Tỷ lệ tạo phôi ngày 3 trên số ICSI, (%)	50,00 [41,25-62,50]	50,00 [36,46-68,87]	0,813
Tỷ lệ tạo phôi ngày 3 trên số thụ tinh, (%)	71,43 [56,08-84,38]	74,17 [60,00-84,89]	0,629
Tỷ lệ tạo phôi nang trên số ICSI, (%)	23,61 [12,23-36,79]	16,72 [12,01-31,77]	0,334
Tỷ lệ tạo phôi nang trên số thụ tinh, (%)	33,33 [16,76-50,96]	25,00 [15,11-50,96]	0,42
Tỷ lệ không có phôi nang, (%)	7 (17,50%)	7 (17,50%)	0,99

## BÀN LUẬN

Đây là nghiên cứu đầu tiên trên người đánh giá vai trò của GM-CSF trong môi trường tiền trưởng thành noãn CAPA-IVM. Với nguyên lý cơ bản là tác động của GM-CSF lên các tế bào cummulus có thể dẫn đến việc hấp thụ glucose cao hơn, hỗ trợ tăng sinh tế bào hoặc tăng cường khả năng sống sót của tế bào cummulus, tăng cường giãn nở của khối tế bào cummulus quanh noãn. Từ đó, cải thiện tỷ lệ trưởng thành của noãn và phát triển của phôi sau nuôi cấy IVM.

### Kết quả nghiên cứu

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành so sánh môi trường tiền trưởng thành noãn CAPA-IVM có bổ sung và không bổ sung GM-CSF. Kết quả của nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt liên quan đến tỷ lệ tạo phôi nang tính theo số chu kỳ ICSI và số noãn thụ tinh (lần lượt 23,61% so với 16,72%,  $p=0,334$ ; 33,33% so với 25%,  $p=0,42$ ). Chưa có nghiên cứu bổ sung GM-CSF trong kỹ thuật IVM. Tuy nhiên, các nghiên cứu bổ sung GM-CSF trong TTON trên người và mô hình động vật đều ghi nhận nhiều ảnh

hưởng tích cực của GM-CSF lên kết cục phôi và thai. Nghiên cứu của Sjöblom C (1999) ghi nhận việc bổ sung GM-CSF vào môi trường nuôi cấy phôi TTON giúp tăng tỷ lệ tạo phôi nang từ 30% lên 76%<sup>(9)</sup>. Nghiên cứu này cũng ghi nhận năng lực của phôi nang cũng được cải thiện sau bổ sung GM-CSF, thể hiện qua khả năng thoát màng và bám vào khối chất nền ngoại bào của đĩa nuôi cấy. Ngoài ra, số lượng phôi bào của khối tế bào bên trong (ICM) của phôi sau bổ sung GM-CSF cũng tăng hơn 35% so với phôi nuôi cấy từ môi trường không bổ sung GM-CSF. Một nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng đa trung tâm, mù đôi thực hiện tại 4 trung tâm TTON tại Bắc Âu trên 1149 chu kỳ điều trị (có bổ sung GM-CSF là 564 và không bổ sung là 585 chu kỳ). Tỷ lệ trẻ sinh sống ở nhóm có bổ sung cao hơn ở nhóm có bổ sung GM-CSF so với nhóm không bổ sung GM-CSF (28,9% so với 24,1%, OR 1,35, khoảng tin cậy 95% 1,03–1,78). Một nghiên cứu hồi cứu trên 212 chu kỳ điều trị TTON trên nhóm phụ nữ trên 35 tuổi (117 có bổ sung GM-CSF và 95 không bổ sung GM-CSF) cũng ghi nhận không có khác biệt của việc bổ sung GM-CSF lên chất lượng phôi. Tuy nhiên, tỷ lệ sẩy thai sinh hoá ở nhóm có bổ sung thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không bổ sung (20,8% so với 55,6%,  $p < 0,05$ ). Điều này gợi ý về vai trò của GM-CSF trong việc cải thiện tiềm năng làm tổ của phôi nang ở phụ nữ lớn tuổi<sup>(10,11)</sup>. Ở một khía cạnh khác, Chen P (2021) ghi nhận sự có mặt của GM-CSF trong môi trường nuôi cấy đơn phôi nang có liên quan đến chất lượng phôi và kết cục thai sau chuyển phôi. Tỷ lệ phôi nang chất lượng tốt cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm phôi có nồng độ GM-CSF cao so với trung bình và thấp (80% so với 53,57% và 49,21%,  $p=0,01$ )<sup>(12)</sup>.

Ngược lại, một phân tích gộp công bố trên thư viện Cochrane của Armstrong S (2020) lại ghi nhận chưa có bằng chứng rõ ràng về hiệu quả thực sự của bổ sung GM-CSF trong kỹ thuật TTON trên tỷ lệ trẻ sinh sống (OR 1,19, khoảng tin cậy 95% 0,93 – 1,52, 2 nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng, N=1432,  $I^2=69%$ , chất lượng bằng

chứng thấp)<sup>(13)</sup>.

Trong nghiên cứu này, bổ sung GM-CSF vào môi trường cấy trứng thành noãn của kỹ thuật CAPA-IVM không cho thấy có khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ tạo phôi nang so với nhóm chứng. Tuy nhiên, kết quả có xu hướng cao hơn ở nhóm có bổ sung GM-CSF. Đây có thể là bằng chứng bước đầu về hiệu quả của GM-CSF trong kỹ thuật CAPA-IVM, tạo cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo.

**Điểm mạnh và hạn chế của nghiên cứu**

Điểm mạnh của nghiên cứu này là thiết kế nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có nhóm chứng giúp xác định mối liên hệ giữa can thiệp p và kết cục . Nghiên cứu đầu tiên thực hiện bổ sung GM-CSF trong môi trường nuôi cấy trứng thành noãn CAPA-IVM. Tuy nhiên, hạn chế của nghiên cứu là cỡ mẫu chưa đủ để xác nhận sự khác biệt về tỷ lệ tạo phôi nang giữa 2 nhóm nghiên cứu và kết cục không phải là tỷ lệ trẻ sinh sống.

**KẾT LUẬN**

Chưa có đủ bằng chứng rõ ràng về hiệu quả của việc bổ sung GM-CSF vào môi trường cấy trứng thành noãn giúp cải thiện tỷ lệ tạo phôi nang trong kỹ thuật CAPA-IVM.

**Lời cảm ơn**

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số FWO.106-YS.2017.02.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL (2021). In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 76(5):936–942.
2. Child TJ, Phillips SJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL (2002). A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for women with polycystic ovaries. *Obstetrics & Gynecology*, 100(4):665–670.
3. Luciano AM, Sirard M-A (2018). Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation. *Biology of Reproduction*, 98(2):162–169.

4. Sánchez F, Romero S, De Vos M, Verheyen G, Smits J (2015). Human cumulus-enclosed germinal vesicle oocytes from early antral follicles reveal heterogeneous cellular and molecular features associated with in vitro maturation capacity. *Human Reproduction*, 30(6):1396–1409.
5. Sánchez F, Lolicato F, Romero S, De Vos M, Van Ranst H, Verheyen G, Anckaert E, Smits JEJ (2017). An improved IVM method for cumulus-oocyte complexes from small follicles in polycystic ovary syndrome patients enhances oocyte competence and embryo yield. *Human Reproduction*, 32(10):2056–2068.
6. Scarpellini F, Sbracia M (2009). Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomised controlled trial. *Human Reproduction*, 24(11):2703–2708.
7. Vuong LN, Ho VNA, Ho TM, Dang VQ, Phung TH, Giang NH, Le AH, Pham TD, Wang R, Smits J, Gilchrist RB, Norman RJ, Mol BW (2020). In-vitro maturation of oocytes versus conventional IVF in women with infertility and a high antral follicle count: a randomized non-inferiority controlled trial. *Human Reproduction*, 35(11):2537–2547.
8. Alpha Scientists in Reproductive Medicine, ESHRE Special Interest Group Embryology (2011). Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reproductive Biomedicine Online*, 22(6):632–646.
9. Sjöblom C, Wikland M, Robertson SA (1999). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. *Human Reproduction*, 14(12):3069–3076.
10. Zhou W, Chu D, Sha W, Fu L, Li Y (2016). Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor supplementation in culture medium on embryo quality and pregnancy outcome of women aged over 35 years. *The Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(1):39–47.
11. Ziebe S, Loft A, Povlsen BB, Erb K, Agerholm I, Aasted M, Gabrielsen A, Hnida Cm Zobel DP, Munding B, Bendz SH, Robertson SA (2013). A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 99(6):1600–1609.
12. Chen P, Huang C, Sun Q, Zhong H, Xiong F, Liu S, Yao Z, Liu Z, Wan C, Zeng Y, Diao L (2021). Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor in Single Blastocyst Conditioned Medium as a Biomarker for Predicting Implantation Outcome of Embryo. *Frontiers in Immunology*, 12:679839.
13. Armstrong S, MacKenzie J, Woodward B, Pacey A, Farquhar C (2020). GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) supplementation in culture media for women undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 16;7:CD013497.

Ngày nhận bài báo: 16/12/2021  
 Ngày nhận phản biện nhận xét bài báo: 10/02/2022  
 Ngày bài báo được đăng: 15/03/2022