

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Thu Trang

**ĐÁNH GIÁ ĐỘNG HỌC TRƯỞNG THÀNH
VÀ KẾT QUẢ PHÔI HỌC CỦA TRỨNG NON
QUA HỆ THỐNG NUÔI CẤY PHÔI THEO DỠI LIÊN TỤC
(TIME LAPSE SYSTEM) TẠI BỆNH VIỆN QUỐC TẾ
SẢN NHI HẢI PHÒNG TỪ 8/2023 - 8/2024**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Thu Trang

**ĐÁNH GIÁ ĐỘNG HỌC TRƯỞNG THÀNH
VÀ KẾT QUẢ PHÔI HỌC CỦA TRỨNG NON
QUA HỆ THỐNG NUÔI CÂY PHÔI THEO DỐI LIÊN TỤC
(TIME LAPSE SYSTEM) TẠI BỆNH VIỆN QUỐC TẾ
SẢN NHI HẢI PHÒNG TỪ 8/2023 - 8/2024**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 84 20 114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

TS. Nguyễn Văn Hạnh

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'T. Hạnh', written over the printed name of the supervisor.

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi, được thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của TS. Nguyễn Văn Hạnh. Các số liệu, kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về các nghiên cứu của mình.

Tác giả luận văn**Nguyễn Thị Thu Trang**

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Văn Hạnh, người thầy đã tận tình hướng dẫn, hết lòng chỉ bảo và giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo và quý đồng nghiệp Trung tâm Hỗ trợ sinh sản – Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng đã tạo điều kiện, hỗ trợ tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ths. Đặng Trường Sơn và Ths. Đào Phương đã hỗ trợ tôi rất nhiều trong quá trình xây dựng mô hình nghiên cứu, thu thập số liệu và đóng góp ý kiến để tôi có thể hoàn thiện luận văn này.


Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, khoa Công nghệ sinh học và quý thầy cô giảng dạy các bộ môn đã nhiệt tình giảng dạy, truyền đạt kiến thức, giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới gia đình, người thân và bạn bè đã luôn quan tâm, khích lệ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn này.

Xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày 11 tháng 11 năm 2024

Tác giả luận văn



Nguyễn Thị Thu Trang

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG	viii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	ix
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1 CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA SỰ SINH TRỨNG	3
1.1.1 Sự hình thành và phát triển của nang trứng [1]	3
1.1.2 Sự hình thành và trưởng thành của trứng	4
1.1.2.1 Sự trưởng thành nhân	5
1.1.2.2 Sự trưởng thành tế bào chất	6
1.1.2.3 Cơ chế điều hòa sự trưởng thành trứng	6
1.1.3 Kích thích buồng trứng trong hỗ trợ sinh sản	7
1.2 NUÔI TRỨNG NON TRƯỞNG THÀNH TRONG ỚNG NGHIỆM..	8
1.2.1 Khái niệm nuôi trưởng thành trứng non trong ống nghiệm thụ động (Rescue – IVM)	8
1.2.2 Cơ chế trứng non trưởng thành trong ống nghiệm	8
1.2.3 Quy trình nuôi trứng non trưởng thành trong ống nghiệm	9
1.2.3.1 Điều kiện nuôi cấy	9
1.2.3.2 Thụ tinh cho trứng non trưởng thành trong ống nghiệm	10
1.2.3.3 Thời điểm ICSI	10
1.2.4 Tình hình nuôi trứng non trưởng thành trong ống nghiệm thụ động	
1.2.5 Theo dõi động học trưởng thành của trứng non qua hệ thống nuôi cấy phôi liên tục (Time lapse system)	11
1.2.5.1 Động học trưởng thành của trứng non	11
1.2.5.2 Hệ thống tủ nuôi cấy Time lapse	11
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	13
2.1 ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	13
2.1.1 Tiêu chuẩn lựa chọn	13
2.1.2 Tiêu chuẩn loại trừ	13
2.2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	13
2.2.1 Phương pháp thu thập trứng non	13
2.2.2 Theo dõi sự trưởng thành của trứng non qua hệ thống TLS	14

2.2.3	Phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương trứng và nuôi cấy phôi	15
2.2.4	Phương pháp đánh giá sự phát triển của phôi	15
2.2.4.1	Kiểm tra sự thụ tinh của trứng non.....	15
2.2.4.2	Đánh giá sự phát triển của phôi.....	16
2.2.5	Phương pháp phân tích số liệu	18
2.2.5.1	Phương pháp thu thập số liệu	18
2.2.5.2	Phương pháp xử lý số liệu.....	19
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN		21
3.1 KẾT QUẢ PHÔI HỌC CỦA TRỨNG NON NUÔI TRƯỞNG THÀNH TRONG ỒNG NGHIỆM.....		21
3.1.1	Đặc điểm nền của bệnh nhân.....	21
3.1.2	Kết quả phôi học của trứng non nuôi trưởng thành trong ống nghiệm	22
3.2 ĐÁNH GIÁ CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KẾT QUẢ PHÔI HỌC CỦA TRỨNG NON		26
3.2.1	Kết quả động học trưởng thành của trứng non.....	26
3.2.2	Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phôi học của trứng MI	27
3.2.2.1	Ảnh hưởng của các đặc điểm lâm sàng đến kết quả phôi học của trứng MI.....	27
3.2.2.2	Ảnh hưởng của các khoảng thời gian trưởng thành đến kết quả phôi học của trứng non MI.....	31
3.2.3	Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phôi học của trứng GV	35
3.2.3.1	Ảnh hưởng của các đặc điểm lâm sàng đến kết quả phôi học của trứng GV	35
3.2.3.2	Ảnh hưởng của các khoảng thời gian trưởng thành đến kết quả phôi học của trứng GV	37
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ		42
KẾT LUẬN		42
KIẾN NGHỊ.....		42
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....		43
PHỤ LỤC.....		51

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Ký hiệu	Tiếng Anh	Tiếng Việt
2PN	Two distinct pronuclear	Hai tiền nhân riêng biệt
AMH	Anti-Mullerian Hormone	Chỉ số dự trữ buồng trứng
BMI	Body mass index	Chỉ số khối cơ thể
cAMP	Cyclin adenosine monophosphate	Chất truyền tin thứ phát, dẫn xuất của ATP
CCs	Cumulus cells	Tế bào hạt
COH	Controlled ovarian hyperstimulation	Kích thích buồng trứng có kiểm soát
DTBT		Dự trữ buồng trứng
FSH	Follicle stimulating hormone	Hormone kích thích nang trứng
GV	Germinal vesicle	Trứng ở giai đoạn túi mầm
GV.MI		Khoảng thời gian từ GV đến MI
GV.MII		Khoảng thời gian từ GV đến MII
GVBD	Germinal vesicle breakdown	Phá vỡ túi mầm
hCG	Human Chorionic Gonadotropin	Gonadotropin màng đệm ở người, sản xuất bởi nhau thai trong quá trình mang thai
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection	Tiêm tinh trùng vào bào tương trứng
IVF	<i>In vitro</i> fertilization	Thụ tinh trong ống nghiệm
IVM	<i>In vitro</i> maturation	Trưởng thành trong ống nghiệm
KTBT		Kích thích buồng trứng
LH	Luteinizing hormone	Hormone tuyến yên sinh dục
MI	Metaphase I	Trứng ở giai đoạn kì giữa giảm phân I
MI.MII ^{GV}		Khoảng thời gian từ MI đến

MI.MII ^{MI}		MII của trứng GV Khoảng thời gian từ MI đến MII của trứng MI
MII	Metaphase II	Trứng trưởng thành (ở kì giữa giảm phân II)
MII.ICSI		Khoảng thời gian từ khi trứng trưởng thành đến khi tiêm tinh trùng vào bào tương trứng
MPF	Maturation promoting factor	Protein nội sinh liên quan đến kiểm soát các giai đoạn trong quá trình phân bào
OCC	Oocyte – cumulus complex	Phức hợp trứng – tế bào hạt
PDE3A	Phosphodiesterase 3A	Enzym thủy phân cAMP
PESA	Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration	Lấy tinh trùng từ mào tinh bằng xuyên kim qua da
PGCs	Primordial Germ Cells	Tế bào mầm sinh dục nguyên thủy
PGT	Preimplantation Genetic Testing	Xét nghiệm di truyền tiền làm tổ
PVP	Polyvinylpyrrolidone	Môi trường làm chậm tinh trùng
Rescue - IVM	Rescue – <i>In vitro</i> maturation	Thực hiện tiêm tinh trùng vào trứng đối với trứng non trưởng thành trong ống nghiệm
S – OAT	Severe - Oligoastherneratozoospermia	Tinh trùng ít, yếu, dị dạng mức độ nặng
TESE	Testicular Sperm Aspiration	Phẫu thuật tinh hoàn lấy tinh trùng
TLS	Time – lapse system	Hệ thống nuôi cấy phôi theo dõi liên tục
TTTON		Thụ tinh trong ống nghiệm

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Thời điểm đánh giá phôi và các giai đoạn phát triển tương ứng....	16
Bảng 2.2. Đánh giá chất lượng phôi ngày 2.....	16
Bảng 2.3. Đánh giá chất lượng phôi ngày 3.....	17
Bảng 2.4. Đánh giá chất lượng phôi nang.....	17
Bảng 3.1. Đặc điểm nền của bệnh nhân.....	22
Bảng 3.2. So sánh kết quả phôi học của trứng non MI và GV nuôi trưởng thành trong ống nghiệm	23
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của tuổi mẹ đến tỉ lệ trưởng thành và kết quả phôi học của trứng MI.....	28
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của chỉ số AMH (ng/ml) đến tỉ lệ trưởng thành và kết quả phôi học của trứng MI.....	29
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của chỉ số khối cơ thể - BMI (kg/m^2) đến tỉ lệ trưởng thành và kết quả phôi học của trứng MI	30
Bảng 3.6. So sánh tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ tạo phôi nang của trứng MI ở hai nhóm RI – D0 và RI – D1	31
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của thời gian trưởng thành và thời gian ICSI đến tỉ lệ thụ tinh của trứng non MI.	33
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của thời gian trưởng thành và thời gian ICSI đến tỉ lệ tạo phôi nang của trứng non MI.....	34
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của tuổi mẹ đến tỉ lệ trưởng thành và kết quả phôi học của trứng GV.....	35
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của chỉ số AMH (ng/ml) đến tỉ lệ trưởng thành và kết quả phôi học của trứng GV	36
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của chỉ số BMI (kg/m^2) đến tỉ lệ trưởng thành và kết quả phôi học của trứng GV	37
Bảng 3.12. Ảnh hưởng của các khoảng thời gian trưởng thành đến tỉ lệ thụ tinh của trứng non GV.....	38
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của các khoảng thời gian trưởng thành đến tỉ lệ tạo phôi nang của trứng non GV	39

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Sự phát triển của nang trứng trong buồng trứng [2]	3
Hình 1.2. Các giai đoạn phát triển của trứng	5
Hình 1.3. Cơ chế điều quá trình trưởng thành của tế bào trứng [9].....	7
Hình 1.4. Sự trưởng thành của trứng dưới tác động của LH [15].....	9
Hình 1.5. Hệ thống tủ nuôi cấy theo dõi liên tục (Time lapse System)	12
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu.....	20
Hình 3.1. Các giai đoạn phát triển của phôi từ trứng non.....	21
Hình 3.2. So sánh tỉ lệ trưởng thành của trứng MI và GV nuôi cấy <i>in vitro</i> ..	23
Hình 3.3. So sánh tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi của trứng non MI và GV	25
Hình 3.4. Các khoảng thời gian trưởng thành của trứng non khi theo dõi bằng TLS.....	26
Hình 3.5. So sánh tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ tạo phôi nang của trứng MI ở hai nhóm ICSI. D0 và ICSI.D1	32

MỞ ĐẦU

Theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới 2023, cứ 6 người trưởng thành có 01 người vô sinh ở một thời điểm nào đó trong đời [1]. Tại Việt Nam, có khoảng 7,7% cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh sản bị vô sinh và tỉ lệ này có xu hướng ngày càng gia tăng, đặc biệt ở nhóm dưới 30 tuổi.

Cùng với sự phát triển của khoa học và công nghệ, các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản đã mang lại hi vọng cho rất nhiều các cặp vợ chồng hiếm muộn. Năm 1978, sự ra đời của Louis Browns – em bé thụ tinh trong ống nghiệm đầu tiên trên thế giới chính đã đánh một dấu mốc quan trọng cho sự phát triển của lĩnh vực hỗ trợ sinh sản [2]. Thụ tinh trong ống nghiệm (*In vitro* fertilization – IVF) là quá trình kết hợp giữa tinh trùng và trứng trong môi trường nhân tạo bên ngoài cơ thể mẹ để tạo thành hợp tử. Năm 1992, Palermo và Van Steirteghem cho ra đời kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương trứng (Intracytoplasmic Sperm Injection - ICSI), cho phép tiêm trực tiếp một tinh trùng vào trứng. Nhờ vậy, thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) trở thành một trong những phương pháp hỗ trợ sinh sản có tỷ lệ thành công cao nhất hiện nay. Bên cạnh đó, thay vì chỉ thu được 1 trứng trong mỗi chu kỳ, sự ra đời của phác đồ kích thích buồng trứng (KTBT) đã trở thành cuộc cách mạng làm thay đổi thực hành lâm sàng, giúp bệnh nhân có nhiều trứng hơn từ đó thu được nhiều phôi hơn, tăng tỉ lệ thành công khi điều trị thụ tinh trong ống nghiệm [3].

Với các phác đồ kích thích buồng trứng có kiểm soát (Controlled ovarian hyperstimulation - COH) được sử dụng hiện nay, chỉ có 70 – 80% số trứng thu được sau chọc hút là trứng trưởng thành [4] và đủ điều kiện để thực hiện tiêm tinh trùng vào bào tương trứng. Số trứng còn lại là trứng non bao gồm 2 loại là MI (trứng ở giai đoạn metaphase I) và GV (trứng ở giai đoạn có túi mầm) sẽ được tiếp tục nuôi cấy *in vitro* và thực hiện ICSI khi trứng trưởng thành. Phương pháp này được gọi là Resue - IVM - nuôi trứng non trưởng thành trong ống nghiệm và thực hiện ICSI với trứng thu được từ các chu kỳ KTBT có kiểm soát.

Theo dõi sự phát triển của trứng non trong ống nghiệm, người ta nhận thấy 89% trứng GV tiếp tục phân bào sau 6 giờ nuôi cấy và 70% trưởng thành trong

vòng 24 giờ nuôi cấy [6, 7]. So sánh hiệu quả sử dụng của trứng non so với trứng trưởng thành cho kết quả trứng MI và GV có tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ phôi phân chia và tỉ lệ phôi nang thấp hơn trứng MII ($p < 0,001$). Mặc dù vậy, Rescue – IVM đã giúp mang đến thêm 1,5 phôi để chuyển cho bệnh nhân có dự trữ buồng trứng (DTBT) thấp và 1,6 phôi ở bệnh nhân có dự trữ buồng trứng bình thường, từ đó cải thiện đáng kể tỉ lệ thành công khi điều trị IVF đặc biệt ở nhóm bệnh nhân có ít trứng [8, 9]. Hơn nữa, hiện nay các nghiên cứu về động học trưởng thành của trứng non tại Việt Nam và trên thế giới vẫn còn khá hạn chế. Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành thực hiện nghiên cứu hồi cứu **“Đánh giá động học trưởng thành và kết quả phôi học của trứng non qua hệ thống nuôi cấy phôi theo dõi liên tục (Time lapse system) tại Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng từ 8/2023 - 8/2024”** với các mục tiêu như sau:

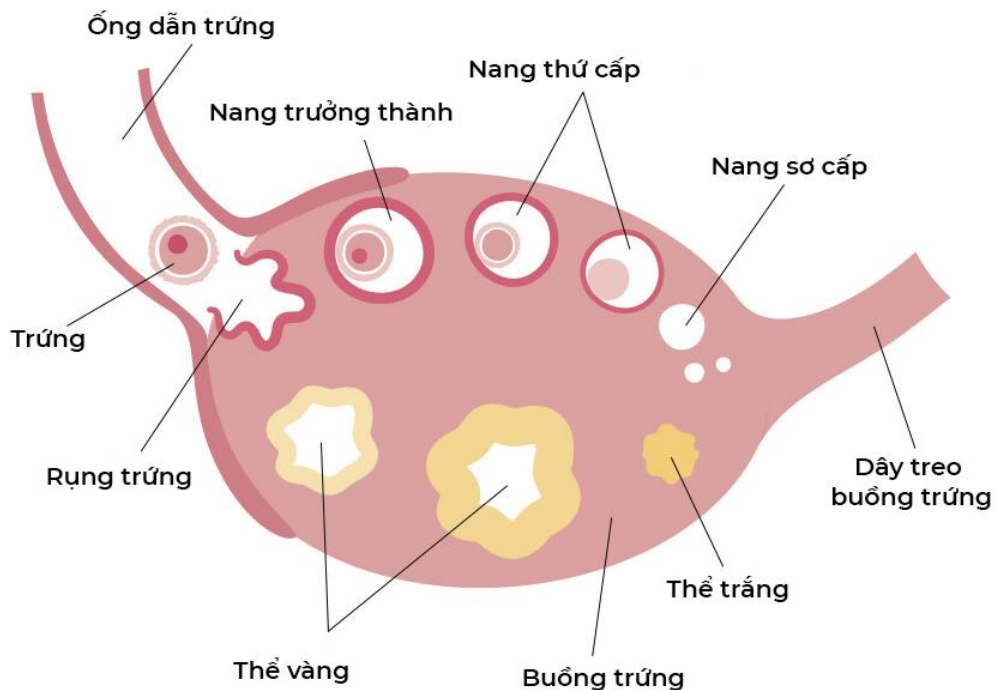
- Mục tiêu 1: Có được thông tin về thời gian trưởng thành của trứng non và kết quả phôi học từ trứng non nuôi cấy in vitro thông qua hệ thống nuôi cấy phôi theo dõi liên tục (Time lapse System).
- Mục tiêu 2: Đánh giá ảnh hưởng của một số đặc điểm lâm sàng và thời gian trưởng thành đến kết quả phôi học của trứng non.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1 CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA SỰ SINH TRỨNG

1.1.1 Sự hình thành và phát triển của nang trứng [1]

Nang trứng là đơn vị cơ bản trong cấu trúc của buồng trứng, bao gồm ba thành phần chính: trứng, tế bào hạt, và tế bào vỏ. Trong quá trình phát triển và trưởng thành, trứng cần tương tác với các tế bào hạt xung quanh (granulosa/cumulus). Các tế bào hạt sản xuất yếu tố tăng trưởng và hormone cung cấp cho trứng, đồng thời cung cấp các nguồn năng lượng (như pyruvate), tiền chất chuyển hóa (như amino acid và nucleotide), và các yếu tố cần thiết khác [1].



Hình 1.1. Sự phát triển của nang trứng trong buồng trứng [2]

Giai đoạn nang nguyên thủy: Từ tuần 4-6 thai kỳ, các tế bào mầm nguyên thủy (PGCs) di chuyển đến gò sinh dục và phân chia để tạo nguyên bào trứng, được bao quanh bởi lớp tế bào hạt dẹt và lớp lá nền. Nguyên bào trứng ở giai đoạn nghỉ kì đầu giảm phân I (GV).

Giai đoạn nang sơ cấp: Nang trứng sơ cấp hình thành với nguyên bào trứng vẫn ở kì đầu giảm phân I. Nang trứng có kích thước khoảng 25 μm và tế bào hạt chuyển từ dạng dẹt sang hình khối.

Giai đoạn nang thứ cấp: Nang trứng sơ cấp phát triển thành nang thứ cấp, với sự gia tăng của tế bào hạt và hình thành các lớp tế bào hạt bao quanh trứng. Trứng vẫn ở giai đoạn GV do nồng độ cAMP cao.

Giai đoạn nang trứng tiền hóc: Nang trứng hình thành hóc và có sự biểu hiện của thụ thể FSH trên tế bào hạt, điều này giúp chọn lọc và phát triển nang thứ cấp thành nang vượt trội (nang de Graff).

Giai đoạn nang de Graff, phóng trứng và tạo hoàng thể: Vào giữa chu kỳ kinh, nồng độ FSH giảm và estradiol tăng, kích thích tuyến yên tiết LH. Đỉnh LH kích thích sự trưởng thành của trứng, giãn nở tế bào cumulus, và hoàn thiện quá trình giảm phân, dẫn đến sự rụng trứng. Trứng sau rụng và chuẩn bị cho thụ tinh sẽ đạt giai đoạn MII.

Quá trình phát triển từ nang trứng nguyên thủy đến nang trứng trưởng thành mất thời gian dài, với hơn 120 ngày từ nang nguyên thủy đến nang tiền hóc và khoảng 85 ngày từ nang tiền hóc đến nang trưởng thành.

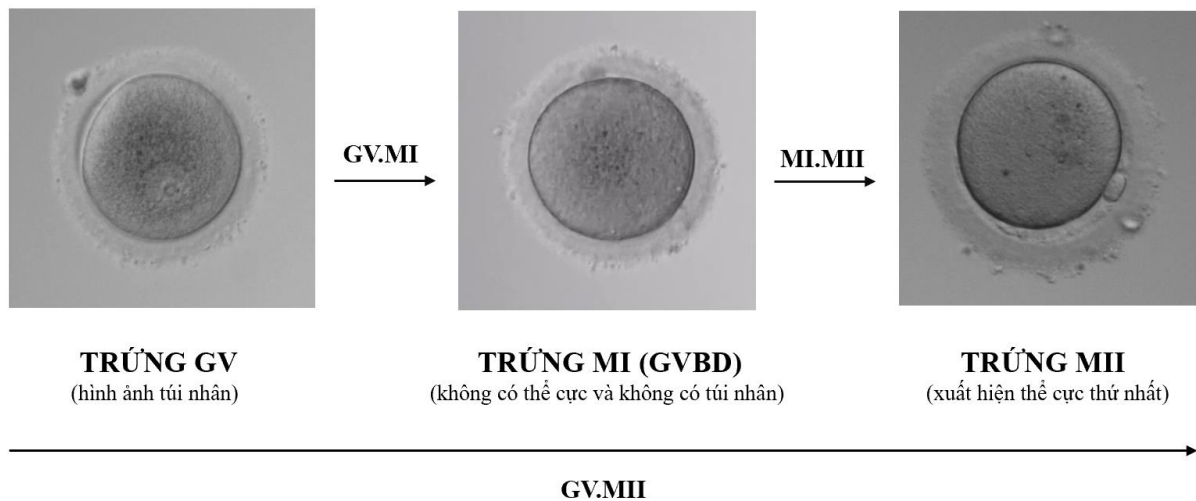
1.1.2 Sự hình thành và trưởng thành của trứng

Quá trình sinh trứng bắt đầu từ rất sớm trong sự phát triển của bào thai và chấm dứt khi mãn kinh. Sự sinh trứng được chia làm 4 giai đoạn: (1) sự hình thành và di chuyển của tế bào mầm sinh dục nguyên thủy vào cơ quan sinh dục; (2) tăng số lượng tế bào bằng nguyên phân;

(3) giảm chất liệu di truyền bằng giảm phân và (4) trưởng thành về cấu trúc và chức năng của trứng[1].

Quá trình giảm phân trong sự sinh trứng ở người có 02 giai đoạn nghỉ. Giai đoạn nghỉ thứ nhất xảy ra khi trứng sơ cấp bước vào pha diplotene của kì trước giảm phân I. Lúc này các nhiễm sắc thể của tế bào đang được bao quanh bởi một cấu trúc gọi là germinal vesicle (trứng GV) [1].

Cho đến khi được sinh ra, buồng trứng của phụ nữ chỉ chứa trứng GV. Trứng GV chỉ vượt qua giai đoạn nghỉ này và tiếp tục phân chia khi có đỉnh LH. Giai đoạn nghỉ thứ hai xảy ra vài giờ sau đỉnh LH, ở kì giữa của giảm phân II tạo thành trứng MII và rụng trứng. Trứng MII chỉ vượt giai đoạn nghỉ khi có sự thụ tinh với tinh trùng [1].



Hình 1.2. Các giai đoạn phát triển của trứng

1.1.2.1 Sự trưởng thành nhân

Khi đến tuổi dậy thì, sự xuất hiện của đỉnh LH trước khi rụng trứng là tín hiệu tái khởi động giảm phân ở trứng GV. Sự trưởng thành nhân của trứng gồm 6 sự kiện chính sau đây [3]:

- (1) Tái khởi động của giảm phân I, bắt đầu bởi sự kiện màng bao của túi nhân vỡ ra, giải phóng các nhiễm sắc thể vào bào tương, gọi là giai đoạn vỡ túi mầm.
- (2) Sự nén lại của nhiễm sắc chất.
- (3) Hình thành thoi vô sắc.
- (4) Phân ly và kết tập của nhiễm sắc thể.
- (5) Phân tách tế bào một cách không đồng đều, tạo ra một trứng lớn và một thể cực nhỏ.
- (6) Sự dừng lại của trứng ở giai đoạn trung kì giảm phân I.

1.1.2.2 Sự trưởng thành tế bào chất

Các sự kiện của quá trình trưởng thành tế bào chất khó có thể nhận biết rõ ràng như trưởng thành nhân nhưng lại rất quan trọng. Sự trưởng thành tế bào chất trứng bao gồm 3 sự kiện chính:

- (1) Sự tái sắp xếp vị trí các bào quan [4].
- (2) Sự tổng hợp và điều chỉnh của protein và RNA thông tin [5, 6].
- (3) Sự dự trữ và tái hoạt hoá những phản ứng hoá sinh của các phân tử nhằm cung cấp chất liệu cần thiết cho sự thành công của thụ tinh [1].

Sự trưởng thành nhân và tế bào chất luôn phối hợp chặt chẽ với nhau. Có trường hợp trứng đã trưởng thành nhân nhưng chưa trưởng thành về tế bào chất hoàn toàn dẫn đến thiếu các yếu tố cần thiết cho sự thụ tinh và phát triển của phôi.

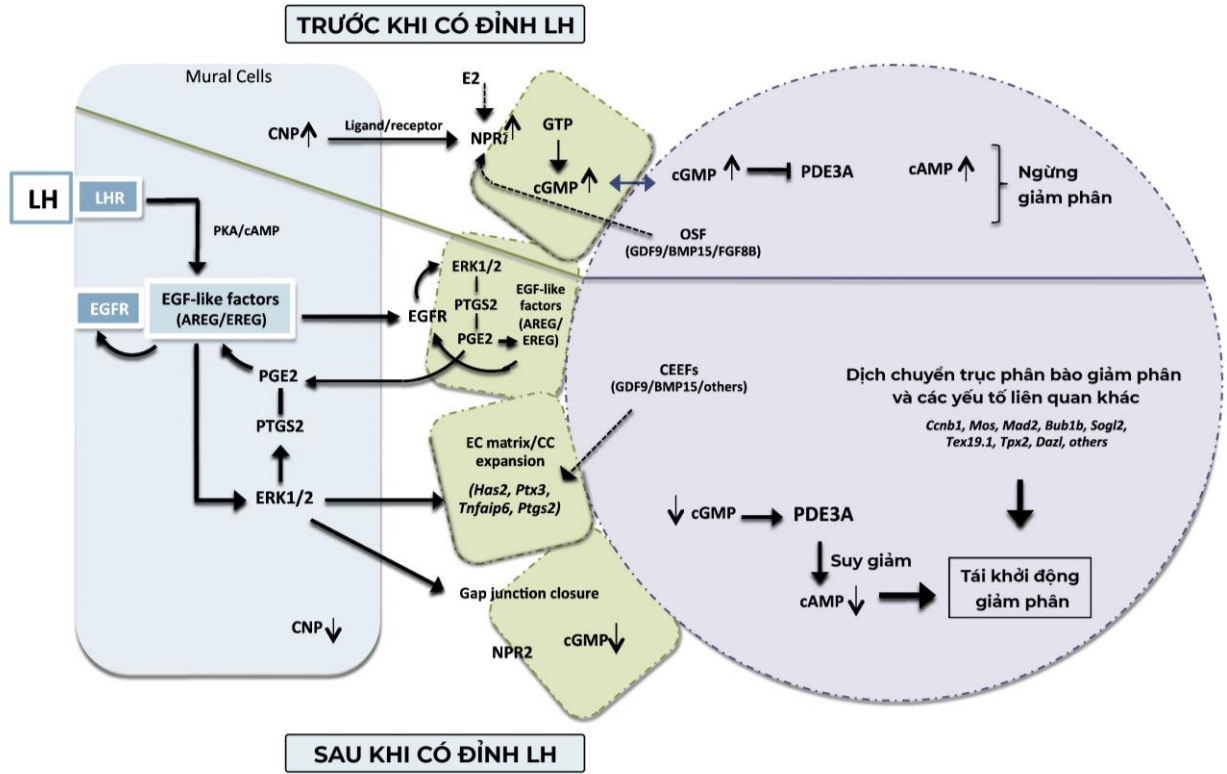
1.1.2.3 Cơ chế điều hòa sự trưởng thành trứng

Vai trò của tế bào cumulus trong sự trưởng thành trứng

Tế bào cumulus (CCs) quanh trứng đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển và trưởng thành của trứng. Chúng thực hiện hai nhiệm vụ chính: truyền tín hiệu giữa môi trường với trứng và tổng hợp glucose để cung cấp cho sự phát triển của trứng. Nếu thiếu sự tương tác này, trứng có thể không phát triển đầy đủ, dẫn đến thiếu hụt các yếu tố thiết yếu cho sự phát triển của phôi ở giai đoạn sớm [7].

Điều hòa kiểm soát quá trình giảm phân

Trong quá trình phát triển của trứng, cyclic - adenosine monophosphate (cAMP) là một phân tử tín hiệu quan trọng cho sự trưởng thành. [8]. Quá trình ngừng giảm phân được duy trì nhờ cAMP từ tế bào granulosa/cumulus, đi vào trứng qua các cầu nối liên bào để ức chế PDE3A, từ đó giữ nồng độ cAMP cao và ngăn cản sự phá vỡ túi mầm (Germinal vesicle break down) [1]



Hình 1.3. Cơ chế điều quá trình trưởng thành của tế bào trứng [9]

Sự xuất hiện đỉnh LH làm giảm mạnh nồng độ cAMP gấp 80 - 200 lần trong các tế bào sinh dưỡng. Sự suy giảm này kích hoạt MPF và tái khởi động quá trình giảm phân [10], trứng bước vào giai đoạn giảm phân II và phóng thích thể cực thứ nhất.

1.1.3 Kích thích buồng trứng trong hỗ trợ sinh sản

Thông thường, vào mỗi chu kỳ kinh nguyệt sẽ chỉ có một nang trứng trong buồng trứng phát triển và phóng noãn. Để tăng cơ hội thành công trong thụ tinh trong ống nghiệm, cần phải có nhiều trứng hơn. Kích thích buồng trứng có kiểm soát (Controlled Ovarian Stimulation - COS) là quá trình sử dụng hormone sinh dục để kích thích sự phát triển của các nang trứng trong buồng trứng, để đạt được số lượng trứng tối ưu nhằm mục đích thực hiện điều trị IVF/ICSI. Quy trình này được theo dõi chặt chẽ bằng siêu âm và xét nghiệm hormone để đảm bảo an toàn và hiệu quả.

Phác đồ KTBT hiện nay thường kéo dài 10-12 ngày, sau đó tiêm mũi trưởng thành trứng khi nang trứng đạt kích thước >13mm [1] và chọc hút trứng sẽ diễn ra sau 36 – 38 giờ kể từ thời điểm tiêm. Trứng thu được sau chọc hút có khoảng 70 – 80% trứng ở trạng thái trưởng thành đủ điều kiện để thụ tinh [11].

1.2 NUÔI TRỨNG NON TRƯỞNG THÀNH TRONG ống NGHIỆM

1.2.1 Khái niệm nuôi trưởng thành trứng non trong ống nghiệm thụ động (Rescue – IVM)

Kỹ thuật nuôi trưởng thành trứng non trong ống nghiệm nói chung (*In vitro* Maturation – IVM) là một kỹ thuật trong đó trứng sau khi chọc hút ở giai đoạn chưa trưởng thành (giai đoạn túi mầm – GV hoặc Metaphase I – MI) sẽ được nuôi cấy cho đến khi hoàn toàn trưởng thành (Metaphase II). Các giai đoạn tiếp sau đó như tạo phôi, nuôi cấy phôi diễn ra giống như chu kỳ IVF thông thường. IVM được phân thành hai loại là IVM chủ động và IVM thụ động dựa trên nguồn gốc của trứng non [12].

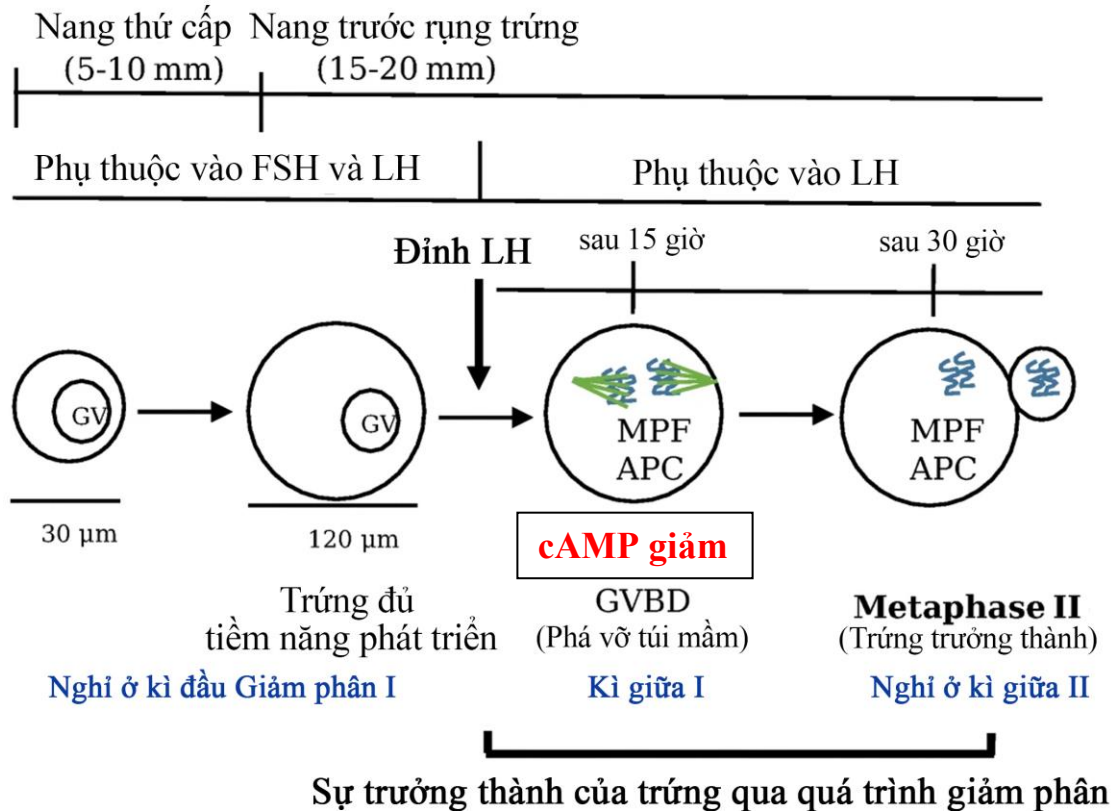
Khác với IVM chủ động không sử dụng hoặc sử dụng rất ít thuốc KTBT, [13], IVM thụ động (Rescue - IVM) là phương pháp nuôi trưởng thành trứng non thu nhận là các chu kỳ KTBT có kiểm soát sau đó thụ tinh nhằm mục đích tăng số lượng phôi có được cho bệnh nhân, đặc biệt với những bệnh nhân có ít trứng [14].

1.2.2 Cơ chế trứng non trưởng thành trong ống nghiệm

Trong buồng trứng, sự phát triển và trưởng thành của trứng chịu ảnh hưởng của tế bào soma và môi trường dịch nang thông qua các con đường truyền tín hiệu nội tiết từ tuyến yên. Khi chọc hút nang trứng ra khỏi buồng trứng, tiến hành loại bỏ các tế bào xung quanh và nuôi trong môi trường phòng thí nghiệm, quá trình giảm phân của trứng sẽ xảy ra một cách tự phát mà không thông qua sự điều hòa của các nội tiết.

Khác với trong buồng trứng sự trưởng thành của trứng xảy ra vì nồng độ cAMP giảm xuống khi xuất hiện đỉnh LH, trong ống nghiệm nồng độ cAMP giảm vì tế bào trứng mất đi sự tương tác với buồng trứng và tế bào hạt xung

quanh. Hơn nữa, sự phá vỡ của các tương tác này khiến cho các chất chuyển hóa quan trọng như nucleotide, chất dinh dưỡng và mRNA đóng vai trò quan trọng trong quá trình trưởng thành tế bào chất của trứng cũng bị mất. Đây là một thách thức đối với nuôi trứng non trưởng thành trong ống nghiệm để tạo ra phôi nang hữu dụng từ trứng non rescue – IVM.



Hình 1.4. Sự trưởng thành của trứng dưới tác động của LH [15]

1.2.3 Quy trình nuôi trứng non trưởng thành trong ống nghiệm

1.2.3.1 Điều kiện nuôi cấy

Rescue – IVM được thực hiện khi bệnh nhân có trứng non thu được sau chọc hút trứng từ các chu kỳ KTBV có kiểm soát. Trứng non sau khi thu nhận sẽ được nuôi cấy trong điều kiện tương tự như với trứng trưởng thành. Môi trường sử dụng để nuôi trứng non là môi trường dùng cho nuôi cấy phôi, không bổ sung các hóa chất hỗ trợ cho quá trình trưởng thành của trứng. Đánh giá sự trưởng thành của trứng non được thực hiện vào 2 thời điểm: thời điểm 1 – 2 giờ (khi

thực hiện ICSI trứng trưởng thành) và thời điểm 22 – 23 sau khi loại bỏ tế bào hạt. Quá trình nuôi cấy trứng non sau khi thụ tinh thực hiện giống như quy trình IVF thông thường.

1.2.3.2 Thụ tinh cho trứng non trưởng thành trong ống nghiệm

Hầu hết các nghiên cứu IVM đều sử dụng ICSI nhằm giảm nguy cơ thất bại thụ tinh hoàn toàn. Hơn nữa, trứng đã bị loại bỏ tế bào hạt xung quanh để tiến hành phân loại nên ICSI là phương pháp phù hợp nhất để thụ tinh. ICSI cũng giúp tăng cơ hội thụ tinh cho trứng non, vì màng trong suốt có thể bị cứng lại do quá trình nuôi trưởng thành, gây cản trở sự xâm nhập của tinh trùng [16, 17].

1.2.3.3 Thời điểm ICSI

Một trong những đặc điểm của IVM là sự trưởng thành của trứng khi nuôi cấy *in vitro* là không đồng bộ [18]. Để cải thiện hiệu quả sử dụng trứng non nuôi cấy IVM thì việc xác định thời điểm ICSI tối ưu sau khi trứng trưởng thành là hết sức cần thiết.

Nếu ICSI quá sớm sau khi trứng MII mới khi tổng xuất thể cực thứ nhất có thể trứng chưa trưởng thành tế bào chất hoàn toàn [18]. Nếu ICSI quá muộn, trứng có thể bị lão hóa do bị kẹt ở giai đoạn MII quá lâu, có khoảng không quanh trứng rộng và thể cực bị phân mảnh [19]. Các trứng già hoá thụ tinh sẽ có tiền nhân lớn với số lượng thể hạt nhân bất thường, dẫn đến tỷ lệ phôi hữu dụng thấp [20].

Nghiên cứu của Ranganath và cộng sự năm 2021 đã xác định được thời gian thông thường để trứng GV trưởng thành lên MII là 18 giờ sau khi loại bỏ tế bào hạt và thời điểm ICSI phù hợp là 5 – 6 giờ sau khi tổng xuất thể cực thứ nhất [21].

1.2.4 Tình hình nuôi trứng non trưởng thành trong ống nghiệm thụ động

Theo dõi sự trưởng thành của trứng non trong ống nghiệm, người ta nhận thấy phần lớn tế bào trứng MI (54%) trưởng thành trong ống nghiệm sau 2,5 giờ ủ, 89% trứng GV tiếp tục phân bào sau 6 giờ nuôi cấy và đạt đến giai đoạn MI sau 18 giờ. [22]. Các loại môi trường thương mại dùng cho nuôi cấy phôi được

chứng minh không làm cải thiện tỉ lệ trưởng thành của trứng non thu được từ các chu kì KTBT có kiểm soát [23].

Nghiên cứu so sánh hiệu quả sử dụng của trứng non MI và GV so với trứng trưởng thành MII cho kết quả trứng non có tỉ lệ thụ tinh, tỷ lệ phôi phân chia và phôi nang thấp hơn so với trứng trưởng thành [24, 22, 11, 21, 25, 26].

Tuy nhiên, rescue – IVM được chứng minh mang đến tỉ lệ nhất định những phôi hữu dụng có thể sử dụng cho bệnh nhân, điều này đặc biệt có ý nghĩa ở nhóm bệnh nhân giảm dự trữ buồng trứng [14]. Do đó, nghiên cứu để cải thiện hiệu quả sử dụng trứng non là vô cùng cần thiết. Hiện nay, so với số lượng lớn nghiên cứu về các hóa chất bổ sung vào môi trường nhằm cải thiện tỉ lệ trưởng thành thì các nghiên cứu về động học của trứng non còn khá hạn chế.

1.2.5 Theo dõi động học trưởng thành của trứng non qua hệ thống nuôi cấy phôi liên tục (Time lapse system)

1.2.5.1 Động học trưởng thành của trứng non

Động học (Morphokinetic) là sự kết hợp giữa “hình thái học” và “sự chuyển động” để mô tả cho những sự thay đổi về hình thái trong quá trình phát triển của phôi/trứng [27]. Đối với phôi, các thông số động học thường được ghi nhận gắn liền với các sự kiện quan trọng như thời điểm xuất hiện tiền nhân, thời điểm 2 tiền nhân biến mất, thời điểm phôi phân chia lần lượt thành các tế bào, thời điểm hình thành phôi nang... Đối với trứng, các thông số động học được ghi nhận là thời điểm vỡ túi mầm (GV.MI), thời điểm xuất hiện thể cực thứ nhất (GV.MII hoặc MI.MII).

1.2.5.2 Hệ thống tủ nuôi cấy Time lapse

Tủ nuôi cấy Time lapse là hệ thống tủ nuôi cấy nhiều buồng nhỏ riêng biệt kết hợp với hệ thống camera tự động chụp liên tục hình ảnh và phần mềm đánh giá sự phát triển của phôi theo hình thái học. Hệ thống này cho phép chuyên viên phôi học theo dõi sự phát triển của phôi một cách chi tiết và liên tục mà không cần đưa phôi ra khỏi tủ, từ đó giảm căng thẳng cho phôi do thay đổi nhiệt độ và nồng độ khí, giảm nguy cơ sự cố do di chuyển.

Hệ thống hoạt động bằng cách sử dụng kính hiển vi đảo ngược kỹ thuật số để quan sát phôi và chụp ảnh định kỳ (mỗi 5-10 phút) bằng camera kỹ thuật số từ đó giúp cung cấp các thông số động học về sự phát triển của phôi/trứng.



Hình 1.5. Hệ thống tủ nuôi cấy theo dõi liên tục (Time lapse System)

Theo dõi sự phát triển của trứng non thông qua hệ thống nuôi cấy phôi liên tục Time – lapse là theo dõi quá trình trưởng thành về nhân của tế bào trứng. Ở mỗi giai đoạn phát triển đều có các dấu hiệu để nhận biết như sau: (1) Từ giai đoạn GV sang MI được nhận biết bằng sự biến mất của túi nhân (Germinal vesicle break down); (2) Từ giai đoạn MI chuyển sang MII nhận biết bằng sự xuất hiện của thể cực thứ nhất (Polar body 1).

Sau khi thực hiện tiêm tinh trùng vào bào tương trứng, trứng non sẽ được tiếp tục nuôi cấy trong tủ nuôi cấy Time – lapse để theo dõi sự thụ tinh và phát triển của phôi.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Bệnh nhân được điều trị bằng phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm và tiêm tinh trùng vào bào tương trứng (ICSI) tại khoa Hỗ trợ sinh sản – Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng từ tháng 8/2023 đến tháng 8/2024 thỏa mãn tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ.

2.1.1 Tiêu chuẩn lựa chọn

- Bệnh nhân có hồ sơ bệnh án đầy đủ thông tin của người bệnh.
- Bệnh nhân được KTBT bằng phác đồ Antagonist.
- Vợ chồng có kết quả karyotype bình thường.
- Trứng thu nhận sau chọc hút phải có ít nhất 01 trứng non
- Bệnh nhân được chỉ định nuôi cấy phôi bằng hệ thống nuôi cấy phôi theo dõi liên tục (Time lapse system) và mỗi trứng non phải được nuôi cấy riêng lẻ trong từng giếng.

2.1.2 Tiêu chuẩn loại trừ

- Tinh trùng thu nhận từ thủ thuật (PESA, TESE) hoặc tinh trùng ít, yếu, dị dạng mức độ nặng (S – OAT)
- Tinh trùng trữ đông; tinh trùng từ ngân hàng.
- Trứng sau khi loại bỏ tế bào hạt ghi nhận có hình thái bất thường [28]
- Tỷ lệ thụ tinh trên trứng trưởng thành < 25% [29].
- Tỷ lệ trứng non thu nhận sau chọc hút > 50% [30].
- Bệnh nhân có bệnh lý nội khoa như tim mạch, tuyến giáp, bệnh chuyển hóa, bất thường về tâm thần vận động.

2.2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1 Phương pháp thu thập trứng non

Với phác đồ KTBT tiêu chuẩn, người phụ nữ sẽ được tiêm thuốc KTBT từ

10 – 12 ngày. Khi siêu âm thấy có nang trứng đạt kích thước >13mm thì có thể tiến hành tiêm mũi trưởng thành trứng. Chọc hút trứng diễn ra sau 36 – 38 giờ tiêm mũi rụng trứng hCG. Các ống nghiệm chứa dịch nang được chuyển từ phòng thủ thuật sang phòng thí nghiệm, chuyên viên phôi học tìm phức hợp trứng - tế bào hạt. Trứng sau khi chọc hút ra khỏi buồng trứng sẽ được ủ trong môi trường FM (Irvine – Hoa Kỳ) từ 2 – 3 giờ, 37 °C, 6% CO₂ và 5% O₂.

Trứng sau khi thu nhận được loại bỏ tế bào hạt bằng hyaluronidase 80 IU/mL (Irvine, Hoa Kỳ) trong tối đa 1 phút và đánh giá sự trưởng thành của trứng ở thời điểm này. Trứng ở các giai đoạn khác nhau được phân loại như sau: (1) trứng MII, tức là đã trưởng thành bên trong cơ thể (nhận diện bằng thể cực thứ nhất); (2) trứng MI không có thể cực và không có túi nhân; (3) trứng GV có hình ảnh túi nhân trong bào tương trứng [7].

2.2.2 Theo dõi sự trưởng thành của trứng non qua hệ thống TLS

Trứng non được nuôi trưởng thành trong môi trường nuôi cấy phôi Geri (Gems – Úc), tủ nuôi cấy Time lapse Geri plus (Genea Biomedex)), điều kiện 37 °C, 6% CO₂ và 5% O₂ và được tách biệt trong từng giếng để thuận tiện theo dõi sự trưởng thành.

Những thay đổi về hình thái của trứng được ghi nhận tương ứng với các giai đoạn (GV → MI → MII) trong vòng 22 - 23 giờ.

Qua TLS, các khoảng thời gian được xác định trong nghiên cứu bao gồm:

- Thời gian GV.MI: được tính từ sau khi loại bỏ tế bào hạt đến khi quan sát thấy túi mầm biến mất.
- Thời gian MI.MII: được tính từ sau khi loại bỏ tế bào hạt (đối với trứng MI - MI.MII^{MI}) và khi túi mầm biến mất (đối với trứng GV - MI.MII^{GV}) đến khi xuất hiện thể cực thứ nhất (PB1).
- Thời gian GV.MII: được tính từ sau khi loại bỏ tế bào hạt đến khi xuất hiện thể cực thứ nhất (PB1) hay có thể tính bằng tổng thời gian GV.MI và MI.MII^{GV}.
- Thời gian MII.ICSI : được tính bằng thời gian từ khi xuất thể cực thứ nhất đến

khi trứng được tiêm tinh trùng vào bào tương trứng.

2.2.3 Phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương trứng và nuôi cấy phôi

Tiêm tinh trùng vào bào tương trứng là phương pháp tiêm trực tiếp một tinh trùng có hình thái bình thường vào trong bào tương của trứng để thụ tinh.

Quy trình được thực hiện theo các bước như sau :

- Bước 1 : Chuẩn bị đĩa ICSI

Đĩa ICSI được chuẩn bị 5 giọt môi trường G – MOPs (Vitrolife, Thụy Điển) mỗi giọt 5 μ l và một dải PVP (Irvine, Hoa Kỳ) được pha loãng với môi trường theo tỉ lệ 1 :1, dùng để làm chậm sự di chuyển của tinh trùng.

- Bước 2 : Chuẩn bị bộ vi thao tác và kính hiển vi

Cài đặt bộ kim dùng để tiêm tinh trùng vào trứng bao gồm 01 kim ICSI (đường kính trong 4 – 5 μ m, đường kính ngoài 8 – 10 μ m) và 01 kim giữ trứng (đường kính trong 15 – 32 μ m, đường kính ngoài 95 – 120 μ m).

- Bước 3 : Chuyển trứng từ đĩa nuôi cấy vào đĩa ICSI
- Bước 4 : Bất động tinh trùng

Tiến hành lựa chọn 01 tinh trùng có hình dạng bình thường, bất động bằng cách dùng kim ICSI đề lên phần chính của đuôi, làm xoắn đuôi tinh trùng. Sau khi bất động, hút tinh trùng vào kim từ phần đuôi trước

- Bước 5 : Tiêm tinh trùng vào trứng

Dùng kim giữ trứng hút nhẹ để xoay và giữ trứng sao cho vị trí thể cực thứ nhất nằm ở vị trí 12 giờ hoặc 6 giờ. Kim ICSI chọc thủng màng bào tương ở vị trí 3 giờ để đưa tinh trùng vào trong.

Sau khi ICSI, trứng được nuôi cấy liên tục trong môi trường Geri (Gems – Úc) để theo dõi sự thụ tinh và phát triển của phôi.

2.2.4 Phương pháp đánh giá sự phát triển của phôi

2.2.4.1 Kiểm tra sự thụ tinh của trứng non

Trứng được kiểm tra thụ tinh sau khi ICSI 17 \pm 1 giờ thông qua TLS. Trứng

thụ tinh bình thường khi quan sát thấy sự xuất hiện của 2 tiền nhân (2PN).

2.2.4.2 *Đánh giá sự phát triển của phôi*

Bảng 2.1. Thời điểm đánh giá phôi và các giai đoạn phát triển tương ứng

Đánh giá phôi ngày 2	44 ± 1 (giờ sau ICSI)	4 tế bào
Đánh giá phôi ngày 3	68 ± 1 (giờ sau ICSI)	8 tế bào
Đánh giá phôi ngày 5	116 ± 1 (giờ sau ICSI)	Phôi nang (blastocyst)
Đánh giá phôi ngày 6	140 ± 1 (giờ sau ICSI)	

Đánh giá phôi phân chia

Đối với phôi ở giai đoạn phân chia, có ba thông số cơ bản được quan tâm là số lượng phôi bào, độ đồng đều về kích thước giữa các phôi bào và tỉ lệ phân mảnh bào tương so với thể tích phôi [31, 28]

Bảng 2.2. Đánh giá chất lượng phôi ngày 2

	Số lượng phôi bào	Độ phân mảnh bào tương (%)
Loại I	3 – 5	0 – 10
Loại II	3 – 5	15 – 20
	2 hoặc > 5	0 – 10
Loại III	≥ 3	≥ 25
	< 3	

Bảng 2.3. Đánh giá chất lượng phôi ngày 3

	Số lượng phôi bào	Độ phân mảnh bào tương (%)
Loại I	7 – 9	0 – 10
Loại II	7 – 9	15 – 20
	6 hoặc > 9	0 – 10
Loại III	5	0 – 30
	> 5	25 – 30

Đánh giá phôi nang

Tương tự như phôi phân chia, cũng có 3 thông số để dùng để đánh giá chất lượng phôi nang bao gồm : độ nở khoang phôi, khối tế bào nội phôi (Inner cell mass – ICM) và lớp tế bào lá nuôi (Trophectoderm – TE) dựa theo hệ thống đánh giá của Gardner [31] và được thống nhất trong đồng thuận Alpha 2011 [28].

Bảng 2.4. Đánh giá chất lượng phôi nang

	Độ nở khoang phôi	ICM	TE
Loại I	3 – 6	A	B
		B	A
Loại II	3 – 6	B	B
		A	C
		C	A
Loại III	3 – 6	B	C
		C	B
		C	C

Trong đó :

Độ nở rộng khoang phôi :

- Độ 1: Khoang <50% thể tích phôi bào
- Độ 2: Phôi nang sớm, khoang >50%
- Độ 3: Phôi nang, khoang phôi chiếm đầy thể tích phôi
- Độ 4: Phôi nở rộng, ZP mỏng dần
- Độ 5: Phôi đang thoát màng
- Độ 6: Phôi thoát màng hoàn toàn

Khối tế bào nội phôi (Inner cell mass – ICM)

- Loại A: Nhiều tế bào với kích thước đều và liên kết chặt chẽ
- Loại B: Nhiều tế bào, các tế bào liên kết lỏng lẻo
- Loại C: Rất ít các tế bào lớn

Lớp tế bào lá nuôi (Trophectoderm – TE)

- Loại A: Nhiều tế bào tạo thành một lớp tế bào gắn kết
- Loại B: Ít tế bào, tạo thành 1 lớp lỏng lẻo
- Loại C: Rất ít các tế bào lớn, các tế bào không liên kết

2.2.5 Phương pháp phân tích số liệu

2.2.5.1 Phương pháp thu thập số liệu

Các thời gian GV.MI, GV.MII, MI.MII^{GV}, MI.MII^{MI} và MII.ICSI, kết quả thụ tinh, chất lượng phôi từ trứng non được thu thập thông qua hình ảnh từ hệ thống TLS.

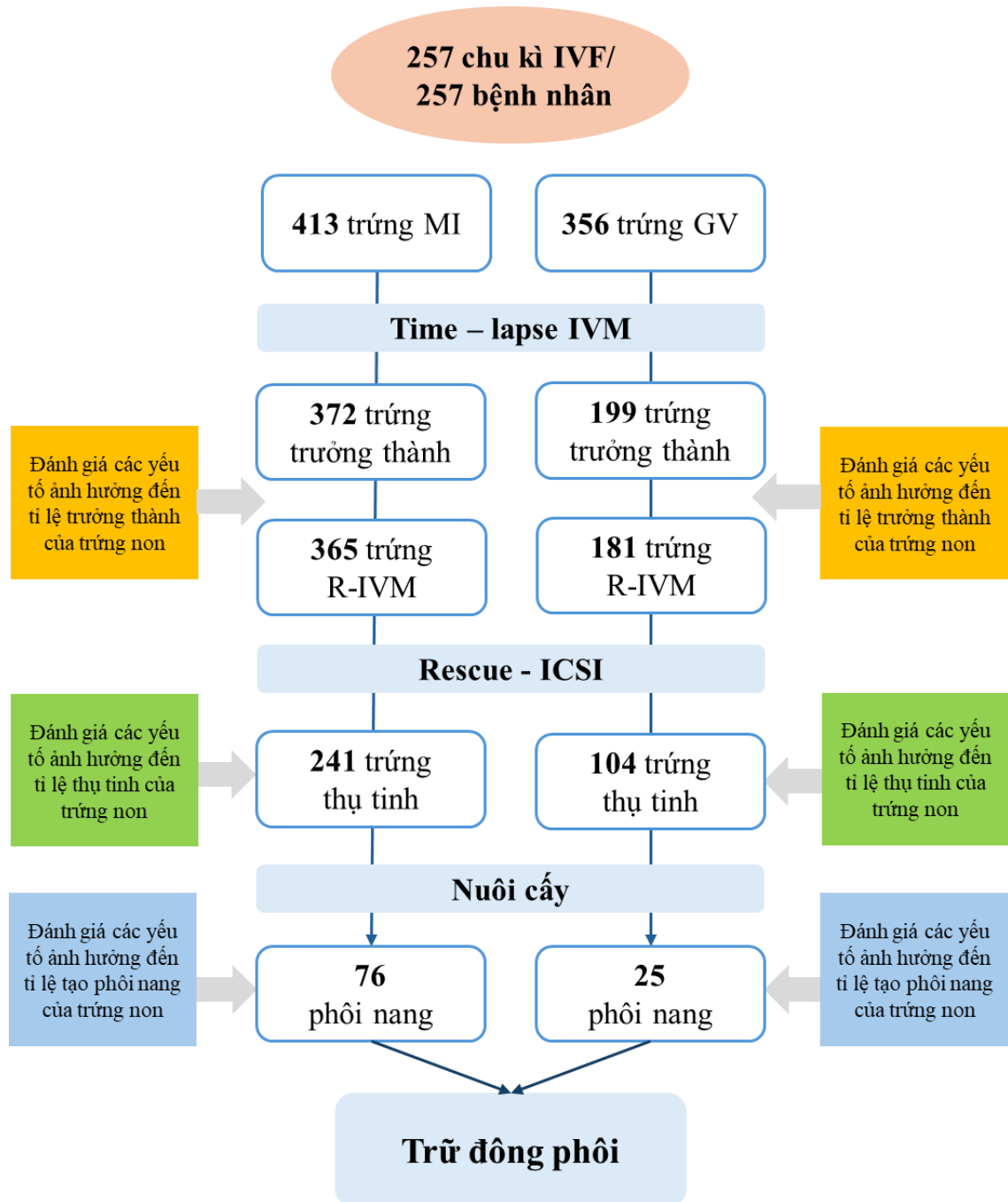
Các đặc điểm lâm sàng tuổi mẹ (năm), loại vô sinh, thời gian mong con (năm), chỉ số khối/BMI (kg/m²), AMH (ng/ml) được thu thập dựa trên hồ sơ bệnh án của bệnh nhân tại khoa Hỗ trợ sinh sản - Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng.

Các biến số chính bao gồm :

- Giá trị trung bình của thời gian GV.MI
- Giá trị trung bình của thời gian GV.MII
- Giá trị trung bình của thời gian MI.MII^{GV}
- Giá trị trung bình của thời gian MI.MII^{MI}
- Giá trị trung bình của thời gian MII.ICSI
- Tỷ lệ trứng non trưởng thành trong thời gian theo dõi nuôi cấy.
- Tỷ lệ thụ tinh bình thường của trứng non.
- Tỷ lệ phôi nang từ trứng non.

2.2.5.2 Phương pháp xử lý số liệu.

Các biến liên tục được biểu diễn dưới dạng trung vị (khoảng tứ phân vị - IQR) khi phân phối không chuẩn. Các biến phân loại được biểu diễn dưới dạng tần suất (%). Trứng non được chia vào các nhóm dựa vào đặc điểm lâm sàng hoặc các khoảng tứ phân vị của các khoảng thời gian trưởng thành và tiến hành so sánh sự khác biệt giữa các nhóm độc lập bằng kiểm định Khi bình phương với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$. Số liệu được nhập và phân tích bằng phần mềm thống kê SPSS 26.0

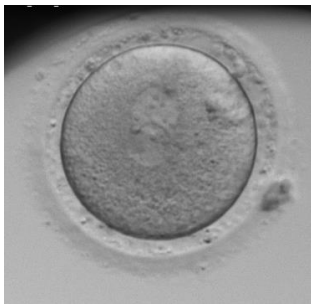


Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

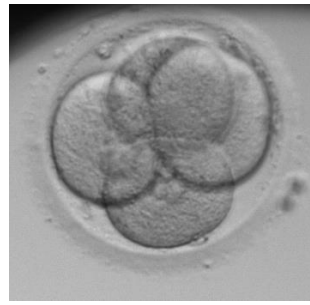
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 KẾT QUẢ PHÔI HỌC CỦA TRỨNG NON NUÔI TRƯỞNG THÀNH TRONG ống NGHIỆM.

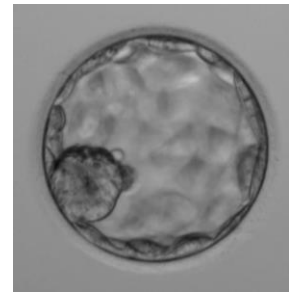
Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành ghi nhận các thông số động học trưởng thành của trứng non được thu nhận từ các chu kì KTBT có kiểm soát thông qua hệ thống nuôi cấy phôi theo dõi liên tục Time lapse (TLS) đồng thời nghiên cứu ảnh hưởng của các đặc điểm lâm sàng và các khoảng thời gian trưởng thành lên kết quả phôi học của trứng non MI và GV.



Thụ tinh 2PN



Phôi phân chia



Phôi nang

Hình 3.1. Các giai đoạn phát triển của phôi từ trứng non

3.1.1 Đặc điểm nền của bệnh nhân

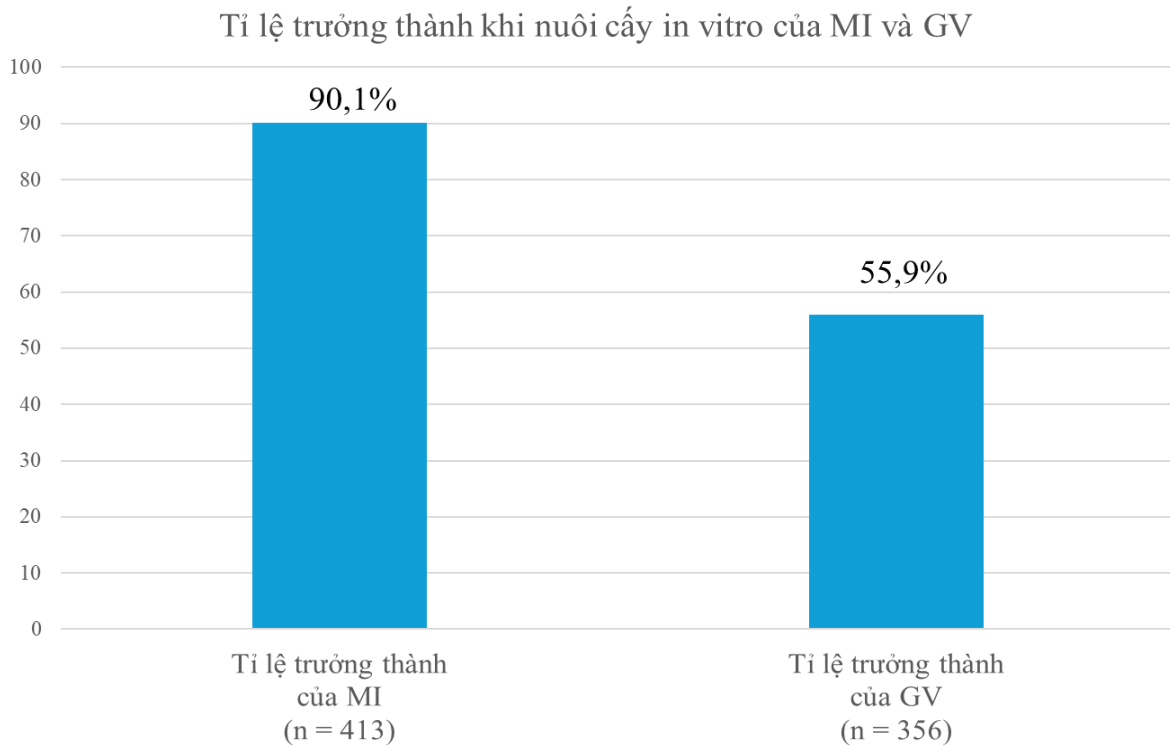
Tổng cộng 413 trứng MI và 356 trứng GV được thu thập từ 257 chu kì IVF của 257 cặp vợ chồng thỏa mãn tiêu chuẩn của nghiên cứu với độ tuổi trung bình là 33 tuổi, chỉ số khối cơ thể (BMI) trung bình là 21,3 (kg/m²). Hầu hết bệnh nhân (67%) được chuẩn đoán là vô sinh thứ phát và 33% là vô sinh nguyên phát. Thời gian mong con trung bình là 2 năm. Các đặc điểm khác bao gồm chỉ số dự trữ buồng trứng AMH, các đặc điểm của chu kì kích thích buồng trứng được trình bày chi tiết trong bảng 3.1.

Bảng 3.1. Đặc điểm nền của bệnh nhân

Đặc điểm (N = 257)	Kết quả
Tuổi (năm)	33,0 (30,0 – 36,0)
BMI (kg/m ²)	21,3 (20,0 – 22,9)
Loại vô sinh, (n, %)	
• Vô sinh nguyên phát	85 (33,1%)
• Vô sinh thứ phát	172 (66,9%)
Thời gian mong con (năm)	2,0 (1,0 – 3,0)
Dự trữ buồng trứng - AMH (ng/ml)	3,2 (2,2 – 5,0)
Số trứng sau chọc hút (n)	17 (13 -22)
Tỉ lệ trứng trưởng thành sau chọc hút (%)	74,9%
Tỉ lệ thụ tinh bình thường của trứng trưởng thành (%)	80,4%
Tỉ lệ tạo phôi nang của trứng trưởng thành (%)	50,2%

3.1.2 Kết quả phôi học của trứng non nuôi trưởng thành trong ống nghiệm

Trứng non sau khi được nuôi cấy *in vitro* ghi nhận có 372 trứng trưởng thành từ trứng MI (90,1%) và 199 trứng trưởng thành từ trứng GV (55,9%). Kết quả này tương đương với nghiên cứu của Shani và cộng sự năm 2023 cho kết quả tỉ lệ trưởng thành của MI cao hơn so với trứng GV (89% và 54%) [26].



Hình 3.2. So sánh tỉ lệ trưởng thành của trứng MI và GV nuôi cấy *in vitro*

Trong tổng số 571 trứng trưởng thành có 546 trứng được rescue, số lượng trứng được rescue trung bình là 2,1 trứng/bệnh nhân.

Bảng 3.2. So sánh kết quả phôi học của trứng non MI và GV nuôi trưởng thành trong ống nghiệm

Đặc điểm	MI	GV	P value	OR 95% CI
Tỉ lệ trưởng thành (n, %)	90,1 (372/413)	55,9 (199/356)	0,000	7,158 (4,874 – 10,514)
Tỉ lệ thụ tinh (n, %)	65,7 (241/367)	57,5 (104/181)	0,030	0,671 (0,468 – 0,964)
Tỉ lệ tạo phôi nang (n, %)	30,3 (73/241)	24,0 (25/104)	0,339	0,773 (0,456 – 1,311)

Trứng non thu được từ các chu kì KTBT có kiểm soát được nuôi trưởng thành trong ống nghiệm thụ động, có kết quả phôi học kém hơn so với nuôi trứng

non chủ động, kết quả này tương tự với nghiên cứu trước đây [32], đặc biệt là trứng GV. Điều này có thể được giải thích bởi việc trứng GV thu nhận từ các chu kỳ COH thường không thể trưởng thành *in vivo*, về bản chất là những trứng có tiềm năng phát triển tự nhiên kém hoặc chậm hơn, giảm khả năng thụ tinh và phát triển tiếp theo của tế bào trứng. Nghiên cứu này cũng không sử dụng các hóa chất chuyên biệt để nuôi trưởng thành trứng trong ống nghiệm nhằm hạn chế phát sinh chi phí điều trị cho bệnh nhân.

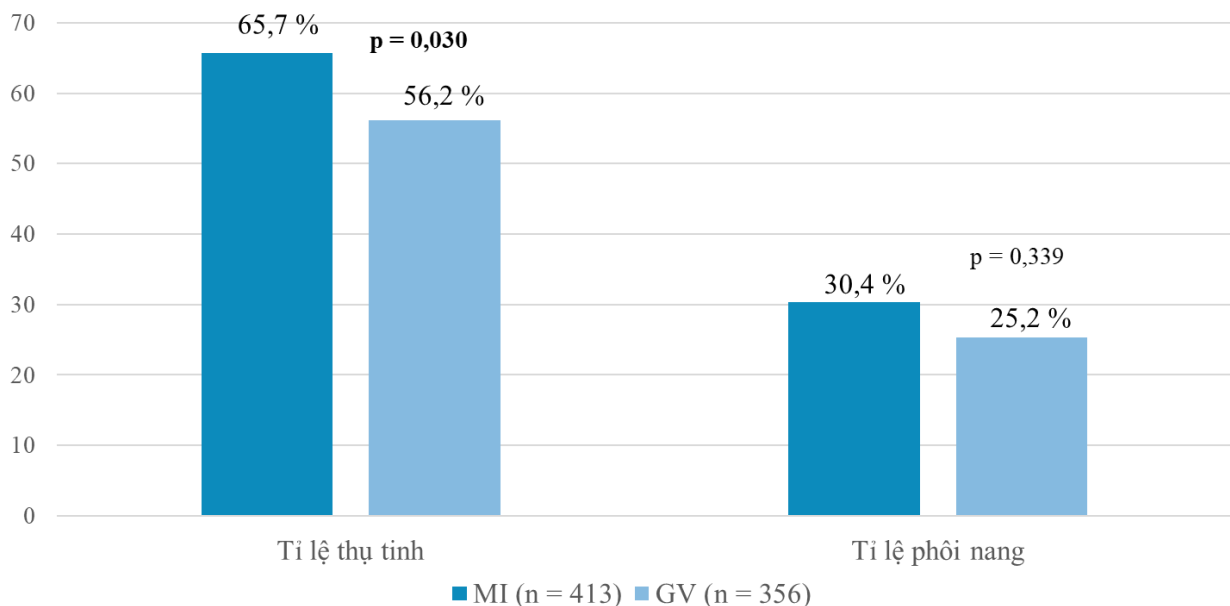
Tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ tạo phôi nang của trứng MI là 65,7% và 30,3%, trứng GV là 57,5% và 24,0%, thấp hơn so với trứng trưởng thành của cùng chu kỳ IVF (80,4% và 50,2 %). Kết quả này tương tự như với hầu hết các nghiên cứu trước đây cho rằng trứng MI và GV có tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ tạo phôi thấp hơn trứng trưởng thành MII [33-38]. Có nhiều nguyên nhân dẫn đến tỉ lệ thụ tinh và tạo phôi kém hơn của trứng non như sự không đồng bộ trưởng thành nhân và tế bào chất, thời gian nuôi cấy *in vitro* kéo dài, hoặc do việc sử dụng tinh trùng để qua đêm có thể tăng tỉ lệ phân mảnh dẫn đến tăng khả năng phôi phân chia bất thường từ đó giảm tỉ lệ hình thành phôi nang.

Quá trình trưởng thành tế bào chất của trứng cho đến nay vẫn chưa thể hiểu một cách rõ ràng cũng như không có dấu hiệu nào để nhận biết. Do đó không có một bằng chứng trực tiếp nào đảm bảo trứng trưởng thành kể về nhân và tế bào chất. Trong khi, sự trưởng thành về tế bào chất bao gồm hàng loạt các quá trình tổng hợp protein, mRNA, tích lũy ribosome, ti thể và sự thay đổi của hệ thống vận chuyển màng tế bào... đóng góp vai trò quan trọng trong quá trình thụ tinh và phân chia của phôi ở giai đoạn sớm. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng trứng non trưởng thành trong ống nghiệm cần thêm từ 2 – 6 giờ ủ sau khi xuất hiện thể cực thứ nhất để có tỉ lệ thụ tinh và tạo phôi tốt hơn [17].

Mặt khác, trứng non nuôi cấy *in vitro* kéo dài bị già hóa dẫn đến những bất thường về nhân. Trứng già hoá đã được chứng minh có tỉ lệ phôi hữu dụng thấp vì bị ngừng ở giai đoạn MII thời gian lâu và có khoảng không quanh noãn rộng với thể cực phân mảnh. Các noãn già hoá thụ tinh sẽ có tiên nhân lớn với số lượng thể hạt nhân bất thường, điều này ảnh hưởng xấu đến sự phát triển của phôi. Theo

nghiên cứu của Khzaei và Aghaz (2007), nếu trứng nuôi cấy kéo dài mà không được thụ tinh có thể làm thay đổi việc sản xuất yếu tố thúc đẩy pha M và protein kinase hoạt hóa mitogen dẫn đến giảm nồng độ ion canxi và tăng nồng độ gốc oxy tự do, ảnh hưởng không tốt đến chất lượng trứng [39]. Ủ trứng qua đêm khi nuôi cấy IVM có thể làm tăng nồng độ ROS trong môi trường, từ đó tăng tỉ lệ phân mảnh ở giai đoạn phôi phân chia và giảm khả năng hình thành phôi nang [40].

Rescue – IVM sử dụng mẫu tinh trùng để qua đêm ở 37°C cũng là một trong những nguyên nhân làm giảm đáng kể tỉ lệ tạo phôi chất lượng tốt từ trứng non. Nghiên cứu năm 2014 của Nabi và cộng sự đã chứng minh, tinh trùng sau khi lọc rửa được lưu trữ ở nhiệt độ 37 độ C để sử dụng trong một số trường hợp như trì hoãn thời điểm chọc hút trứng, nuôi trứng non trưởng thành trong ống nghiệm và rescue – ICSI, có tỉ lệ phân mảnh tinh trùng tăng đáng kể (sau 3 giờ ủ, tăng $10,76 \pm 0,89\%$, $P 0,0001$) [41]. DNA phân mảnh ảnh hưởng đáng kể đến quá trình phát triển và khả năng làm tổ của phôi, đây cũng là một trong những nguyên nhân hàng đầu dẫn đến hiện tượng phôi ngừng phân chia hoặc phôi thoái hóa [42].



Hình 3.3. So sánh tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi của trứng non MI và GV

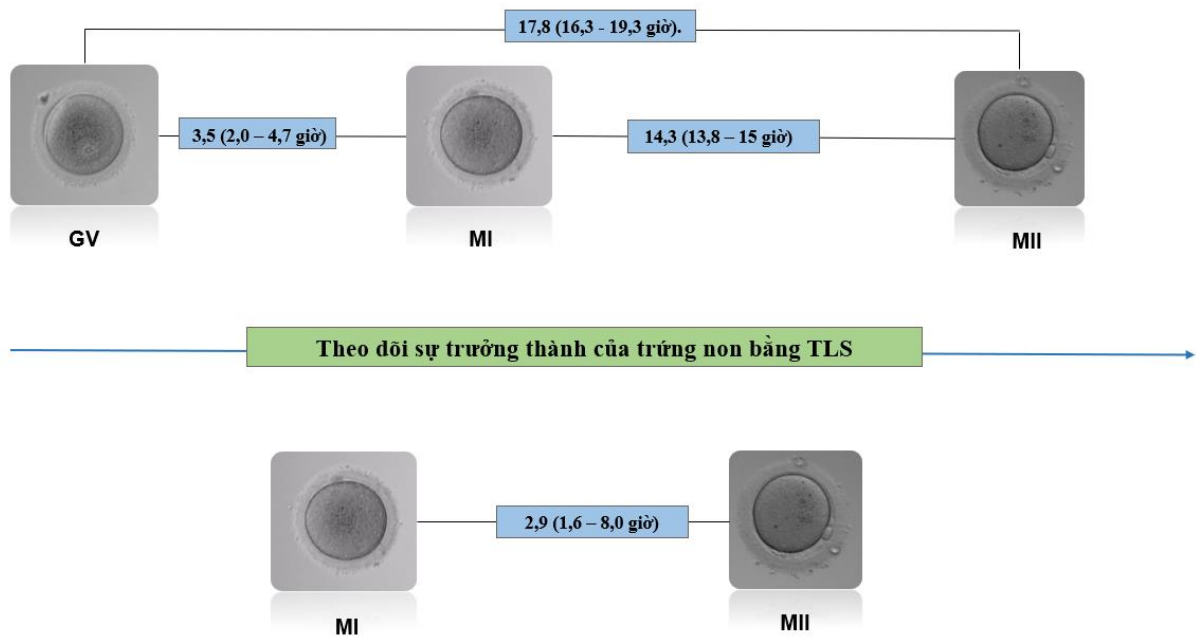
So sánh kết quả phôi học của trứng MI và GV, trứng MI có tỉ lệ tạo thụ tinh hơn so với trứng GV (65,7% và 57,5%; $p = 0,030$) nhưng không có sự khác biệt về tỉ lệ phôi nang giữa hai nhóm. Kết quả này ngược lại với kết quả trong nghiên

cứu của Rachael và cộng sự năm 2021, đánh giá tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ phôi nang giữa các nhóm trứng MI và GV trưởng thành vào ngày 1 sau chọc hút trứng cho kết quả về tỉ lệ thụ tinh không có sự khác biệt nhưng trứng MI lại có kết quả tỉ lệ phôi nang cao hơn trứng GV [11]. Tỉ lệ tạo phôi nang ở GV trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với ở nghiên cứu của nhóm tác giả (24,0% và 13%).

Tóm lại, trứng non thu được từ các chu kì COH thông thường vẫn có tiềm năng để trưởng thành khi được nuôi cấy *in vitro*. Mặc dù có tỉ lệ thụ tinh và tạo phôi kém hơn trứng trưởng thành nhưng, Rescue – IVM thực sự khẳng định được sự cần thiết và khả năng cải thiện kết quả phôi học trong các chu kì trị IVF.

3.2 ĐÁNH GIÁ CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KẾT QUẢ PHÔI HỌC CỦA TRỨNG NON

3.2.1 Kết quả động học trưởng thành của trứng non



Hình 3.4. Các khoảng thời gian trưởng thành của trứng non khi theo dõi bằng TLS

Theo dõi động học trưởng thành của 356 trứng non GV trong vòng 22 – 23 giờ nuôi cấy, ghi nhận có 199 trứng trưởng thành với các khoảng thời gian trưởng

thành bao gồm: trung bình thời gian GV.MI là 3,5 giờ (2,0 – 4,7 giờ), trung bình khoảng thời gian MI.MII^{GV} là 14,3 giờ (13,8 - 15 giờ), trung bình khoảng thời gian GV.MII là 17,8 giờ (16,3 - 19,3 giờ). Các khoảng thời gian GV.MI, MI.MII^{GV}, GV.MII trong nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu trước ở nhóm trứng non trưởng thành < 24 giờ [43, 44]. Đối với trứng MI, ghi nhận khoảng thời gian từ sau khi loại bỏ tế bào hạt đến khi xuất hiện thể cực thứ nhất (MI.MII^{MI}) là 2,9 giờ (1,6 – 8 giờ).

Bên cạnh các thông số về động học trưởng thành, một số đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân được thu thập để đánh giá tổng quát các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phôi học của trứng non, các đặc điểm này bao gồm: tuổi mẹ, chỉ số khối BMI và chỉ số dự trữ buồng trứng AMH. Tuổi mẹ được chia thành 2 nhóm: tuổi mẹ < 35 và tuổi mẹ \geq 35 dựa theo khuyến cáo của Hiệp hội Sinh sản và Phôi học Châu Âu (ESHRE) [45]. Với chỉ số AMH < 1,1 ng/ml, phụ nữ thuộc vào nhóm giảm dự trữ buồng trứng. Bệnh nhân có chỉ số khối BMI \geq 25 kg/m² thuộc nhóm béo phì. Béo phì được cho rằng có ảnh hưởng đến kết quả khi điều trị IVF [46].

3.2.2 Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phôi học của trứng MI

3.2.2.1 Ảnh hưởng của các đặc điểm lâm sàng đến kết quả phôi học của trứng MI

Tiến hành phân tích một số đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân, kết quả cho thấy các đặc điểm này không ảnh hưởng đến tỉ lệ trưởng thành, tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ tạo phôi của trứng MI. Các đặc điểm tuổi mẹ, chỉ số khối BMI và dự trữ buồng trứng AMH đã được chứng minh có ảnh hưởng đến kết quả phôi học và kết cục lâm sàng của trứng trưởng thành, tuy nhiên các nghiên cứu tương tự trên trứng non còn khá hạn chế.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của tuổi mẹ đến tỉ lệ trưởng thành và kết quả phôi học của trứng MI

	Tuổi mẹ < 35	Tuổi mẹ ≥ 35	p value	OR, 95% CI
Tỉ lệ trưởng thành (%) N = 413 (Số trứng nuôi cấy IVM)	91,2 (280/307)	86,8 (92/106)	0,190	1,578 (0,794 – 3,137)
Tỉ lệ thụ tinh (%) N = 365 (Số trứng ICSI)	67,0 (183/273)	62,0 (57/92)	0,375	0,801 (0,490 – 1,308)
Tỉ lệ tạo phôi nang (%) N = 249 (Số trứng thụ tinh)	31,4 (58/185)	28,1 (18/64)	0,629	0,857 (0,458 – 1,604)

Tuổi mẹ là một trong những yếu tố thường được nhắc đến nhiều nhất khi điều trị thụ tinh trong ống nghiệm. Phụ nữ sau 35 tuổi, số lượng và chất lượng trứng càng giảm, khi điều trị IVF có kết quả phôi học, tỉ lệ thai lâm sàng, tỉ lệ làm tổ và tỉ lệ trẻ sinh sống cộng dồn đều thấp hơn đáng kể so với nhóm tuổi mẹ dưới 35 tuổi [47]. Mặc dù nhóm bệnh nhân < 35 tuổi có xu hướng có nhiều trứng non thu nhận sau chọc hút trứng hơn [48] nhưng tuổi mẹ không ảnh hưởng đến tỉ lệ trưởng thành, tỉ lệ thụ tinh và tạo phôi của trứng MI. Kết quả này cũng tương tự như kết quả của Lee và cộng sự năm 2012 cho rằng tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ phôi phân chia và tỉ lệ phôi nang của trứng MI ở các nhóm tuổi ≤ 30; 31 – 34 tuổi; 35 – 40 tuổi và ≥ 40 tuổi là không có sự khác biệt [49].

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của chỉ số AMH (ng/ml) đến tỉ lệ trưởng thành và kết quả phôi học của trứng MI

	AMH < 1,1	AMH ≥ 1,1	P value	OR, 95% CI
Tỉ lệ trưởng thành (%) N = 413 (Số trứng nuôi cấy IVM)	100 (33/33)	89,2 (339/380)	0,057	1,121 (1,082 – 1,161)
Tỉ lệ thụ tinh (%) N = 365 (Số trứng rescue - IVM)	69,7 (23/33)	65,4 (217/332)	0,617	0.820 (0,378 – 1,783)
Tỉ lệ tạo phôi nang (%) N = 249 (Số trứng thụ tinh)	29,2 (8/24)	30,7 (69/225)	0,879	1,074 (0,426 – 2,708)

Nồng độ AMH trong huyết thanh đóng vai trò như một dấu hiệu dự đoán số lượng trứng và khả năng đáp ứng với thuốc kích thích buồng trứng [50]. AMH sẽ giảm dần theo tuổi của bệnh nhân, tuy nhiên cũng có những trường hợp bệnh nhân suy buồng trứng sớm có nồng độ AMH thấp khi tuổi còn trẻ. Nồng độ AMH < 1,1 ng/ml xem là giảm dự trữ buồng trứng. Nghiên cứu của Vijay và cộng sự năm 2023 có kết quả bệnh nhân có nồng độ AMH ≥ 1,1 ng/ml có số lượng trứng thu được nhiều hơn với chất lượng trứng tốt hơn, tỉ lệ trứng trưởng thành cao hơn 2,44 lần so với nhóm còn lại, điều này cũng giúp cho tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ chuyển phôi cũng cao hơn [50].

Tuy nhiên đối với trứng non, kết quả của chúng tôi và nghiên cứu của Hoon và cộng sự năm 2016 [14], đều cho kết quả không có sự khác biệt trong tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ tạo phôi của trứng MI giữa nhóm bệnh nhân giảm dự trữ buồng trứng và dự trữ buồng trứng bình thường. Rescue – IVM giúp tăng thêm số lượng phôi cho bệnh nhân ở cả hai nhóm và góp phần nâng cao tỉ lệ thành công khi điều trị IVF cho bệnh nhân.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của chỉ số khối cơ thể - BMI (kg/m^2) đến tỉ lệ trưởng thành và kết quả phôi học của trứng MI

	BMI < 25	BMI \geq 25	P value	OR, 95% CI
Tỉ lệ trưởng thành (%) N = 413 (Số trứng nuôi cấy IVM)	89,6 (336/375)	94,7 (36/38)	0,479	0,983 (0,111 – 2,065)
Tỉ lệ thụ tinh (%) N = 365 (Số trứng ICSI)	65,3 (215/329)	69,4 (25/36)	0,623	1,205 (0,572 – 2,537)
Tỉ lệ tạo phôi nang (%) N = 249 (Số trứng thụ tinh)	31,8 (71/223)	19,2 (5/26)	0,186	0,510 (0,185 – 1,407)

Đã có rất nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của chỉ số BMI đến kết cục của IVF. Béo phì ($\text{BMI} \geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$) có thể kéo dài thời gian sử dụng thuốc kích thích buồng trứng, giảm số lượng trứng thu được và cả số trứng trưởng thành [51, 52]. Một số nghiên cứu báo cáo rằng béo phì ảnh hưởng đến chất lượng trứng và chất lượng phôi khi điều trị IVF [53, 54, 51].

Nghiên cứu này của chúng tôi và một số các nghiên cứu về ảnh hưởng của béo phì đến kết quả của Rescue - IVM đã chứng minh không có mối liên hệ giữa chỉ số BMI và tỉ lệ trưởng thành *in vitro* và các kết quả phôi học khác của trứng non [55]. Mặc dù vậy, bệnh nhân khi điều trị IVF nên thay đổi lối sống để có cân nặng nằm trong phạm vi phù hợp vì nhiều nghiên cứu khác cũng đã chứng minh rằng béo phì khiến phụ nữ gặp phải một số biến chứng sản khoa như tiền sản giật, tiểu đường thai kì thậm chí là dị tật bẩm sinh. Bên cạnh đó, BMI thấp cũng liên quan đến các kết quả như thai chậm phát triển trong tử cung hoặc sinh non [56-58, 52].

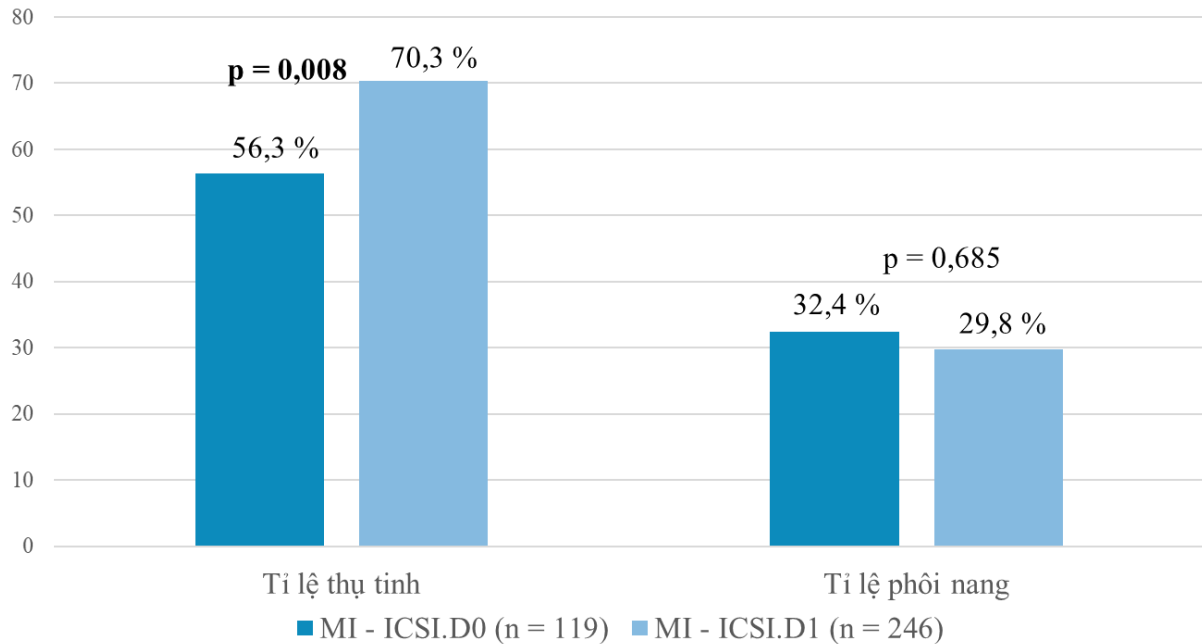
3.2.2.2 Ảnh hưởng của các khoảng thời gian trưởng thành đến kết quả phôi học của trứng non MI

Tiến hành chia trứng MI thành 2 nhóm là ICSI – D0 (trứng MI trưởng thành trước thời điểm thực hiện thụ tinh cho trứng trưởng thành) và ICSI – D1 (trứng MI trưởng thành và được ICSI vào ngày thứ nhất sau ngày chọc hút trứng).

So sánh tỉ lệ thụ tinh và tạo phôi của 2 nhóm, chúng tôi nhận thấy trứng MI trưởng thành và được ICSI vào ngày D1 có tỉ lệ thụ tinh tốt hơn đáng kể so với nhóm trứng trưởng thành và được ICSI vào D0 (70,3% và 56,3%, $p = 0,008$), tuy nhiên không có khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ tạo phôi nang ở 2 nhóm này (bảng 3.6):

Bảng 3.6. So sánh tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ tạo phôi nang của trứng MI ở hai nhóm RI – D0 và RI – D1

Đặc điểm	Nhóm RI-D0 N = 119	Nhóm RI-D1 N = 246	p value	OR 95% CI
Tỉ lệ thụ tinh (%)	56,3	70,3	0,008	1,839 (1,168 – 2,896)
Tỉ lệ tạo phôi nang (%)	32,4	29,8	0,685	0,885 (0,490 – 1,599)



Hình 3.5. So sánh tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ tạo phôi nang của trứng MI ở hai nhóm ICSI. D0 và ICSI.D1

Có nhiều quan điểm khác nhau về việc có nên ICSI trứng non ngay sau khi trứng tổng xuất thể cực thứ nhất hay không bởi vì các kết quả so sánh không đồng nhất. ICSI ngay sau khi trứng xuất thể cực thứ nhất, trứng có thể trưởng thành về nhân nhưng chưa trưởng thành hoàn toàn về tế bào chất. Hoặc nếu không, trứng non sẽ được ICSI khoảng 22 – 23 giờ sau, khi đó lại có trường hợp trứng trưởng thành bị trì hoãn quá lâu mới ICSI khiến trứng bị già hóa, ảnh hưởng không tốt cho sự thụ tinh của trứng và sự phát triển của phôi giai đoạn sớm.

Nghiên cứu của Racheal và cộng sự 2021, nhóm MI trưởng thành vào D0 có tỉ lệ thụ tinh không khác biệt với nhóm MI trưởng thành vào D1 nhưng lại có tỉ lệ phôi phân nang cao hơn đáng kể [25]. Xem xét kỹ thấy trong nghiên cứu này, trứng MI trưởng thành muộn vào ngày D0 được ICSI sau 2 – 4 giờ kể từ khi xuất thể cực thứ nhất. Thời gian này dài hơn trong nghiên cứu của chúng tôi (0,2 – 2 giờ) và tương đối phù hợp với khuyến cáo trước đó về thời điểm ICSI tối ưu cho trứng non Rescue – IVM [19]. Có thể điều này khiến cho trứng MI trưởng

thành muộn vào D0 trong nghiên cứu của nhóm tác giả trên có kết quả tốt hơn so với nhóm MI ICSI – D0 trong nghiên cứu của chúng tôi.

Phân tích trong nhóm 246 trứng được thụ tinh vào ngày D1, ghi nhận trung bình thời gian MI.MII^{MI} là 5,9 giờ (2,8 – 12,1 giờ) và thời gian MII.ICSI là 15,8 giờ (10 – 19 giờ). Phân tích tương quan cho thấy khoảng thời gian MI.MII^{MI} và MII.ICSI không tạo nên sự khác biệt về tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ hình thành phôi nang của trứng MI. Kết quả chi tiết được trình bày trong bảng 4:

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của thời gian trưởng thành và thời gian ICSI đến tỉ lệ thụ tinh của trứng non MI.

	TỈ LỆ THỤ TINH n (%)		p value
	N = 246 (Số trứng được ICSI)		
MI.MII^{MI} (giờ)			
0,8 – 2,8	n = 64	46 (71,9)	0,660
2,9 – 5,9	n = 60	43 (71,7)	
6,0 – 12,1	n = 61	44 (72,1)	
12,2 – 18,6	n = 61	40 (65,6)	
MII.ICSI (giờ)			
3,2 – 10,0	n = 62	39 (62,9)	0,167
10,1 – 15,8	n = 63	44 (69,8)	
15,9 – 19,0	n = 60	49 (81,7)	
19,1 – 23,3	n = 61	41 (67,2)	

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của thời gian trưởng thành và thời gian ICSI đến tỉ lệ tạo phôi nang của trứng non MI.

	TỈ LỆ TẠO PHÔI NANG (%)		p value
	N = 178 (<i>Số trứng thụ tinh</i>)		
MI.MII^{MI} (giờ)			
0,8 – 2,8	n = 49	13 (26,5)	0,835
2,9 – 5,9	n = 43	12 (27,9)	
6,0 – 12,1	n = 43	15 (34,9)	
12,2 – 18,6	n = 43	13 (30,2)	
MI.ICSI (giờ)			
3,2 – 10,0	n = 42	13 (31,0)	0,390
10,1 – 15,8	n = 44	17 (38,6)	
15,9 – 19,0	n = 49	11 (22,4)	
19,1 – 23,3	n = 43	12 (27,9)	

Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Moon và cộng sự năm 2014, trong đó tỷ lệ thụ tinh và hình thành phôi nang ở nhóm trứng MI với khoảng thời gian MI.MII từ 1 – 4 giờ lần lượt là 84,4% và 36,8%, không có sự khác biệt đáng kể so với nhóm có MI.MII > 4 giờ với tỷ lệ tương ứng là 75,5% và 22,5%, khi cả hai nhóm đều được thực hiện ICSI vào cùng thời điểm vào ngày hôm sau. Tuy nhiên, tỷ lệ phôi nang chất lượng tốt ở nhóm có MI.MII từ 1 – 4 giờ cao hơn đáng kể so với nhóm có MI.MII > 4 giờ (18,4% so với 2,5%) [59]. Tại đây, nhóm nghiên cứu cho rằng tiềm năng tạo phôi nang chất lượng cao của trứng MI phụ thuộc nhiều hơn vào thời gian trưởng thành nhân (MI.MII) so với thời gian nghỉ trước khi thực hiện ICSI [59]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, việc đánh giá đồng thời ảnh hưởng của khoảng thời gian MI.MII và MI.RI đến tiềm năng phát triển của trứng MI gặp khó khăn. Chúng tôi nhận thấy rằng với thời điểm ICSI cố định vào ngày hôm sau, trứng MI trưởng thành càng sớm thì thời gian chờ đợi để thực hiện ICSI càng dài, và ngược lại. Để đánh giá khách quan ảnh hưởng của hai yếu tố này đến sự thụ tinh và phát triển của phôi, chúng tôi sẽ cần thực hiện các nghiên cứu độc lập cho từng yếu tố, chẳng hạn như theo dõi sự

trưởng thành của trứng non và thực hiện ICSI sau khoảng 5 – 6 giờ. Tuy nhiên, việc này sẽ tốn nhiều thời gian, công sức và không phù hợp với lịch làm việc của các chuyên viên phôi.

3.2.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phôi học của trứng GV

Trong 181 trứng GV được rescue, ghi nhận 104 trứng thụ tinh bình thường (57,4%), tiếp tục được nuôi cấy đến giai đoạn phôi ngày 5/ngày 6 ghi nhận có 25 phôi nang (24,0%).

3.2.3.1 Ảnh hưởng của các đặc điểm lâm sàng đến kết quả phôi học của trứng GV

Tương tự như trứng MI, tỉ lệ trưởng thành, kết quả phôi học của trứng GV đều không bị ảnh hưởng bởi các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân (bảng 3.9).

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của tuổi mẹ đến tỉ lệ trưởng thành và kết quả phôi học của trứng GV

	Tuổi mẹ < 35	Tuổi mẹ ≥ 35	p value	OR, 95% CI
Tỉ lệ trưởng thành (%) N = 356 (Số trứng nuôi cấy IVM)	52,3 (134/256)	65,0 (65/100)	0,031	0,591 (0,366 – 0,954)
Tỉ lệ thụ tinh (%) N = 181 (Số trứng rescue - IVM)	55,4 (67/121)	55,0 (33/60)	0,962	0,985 (0,529 – 1,835)
Tỉ lệ tạo phôi nang (%) N = 104 (Số trứng thụ tinh)	22,5 (15/71)	24,2 (8/33)	0,836	1,109 (0,416 – 2,961)

Tương tự với trứng MI, các nghiên cứu về ảnh hưởng của tuổi mẹ đến tỉ lệ trứng non sau chọc hút từ các chu kì KTBT có kiểm soát có kết quả không đồng nhất. Có nghiên cứu cho rằng, tỉ lệ trứng non có xu hướng tăng ở nhóm bệnh nhân < 30 tuổi và nhóm bệnh nhân ≥ 40 tuổi. Người ta dự đoán những bệnh nhân trẻ nói chung có khả năng đáp ứng cao với thuốc kích thích buồng trứng, làm tăng khả năng nang trứng phát triển không đồng nhất dẫn đến tỉ lệ trứng non

nhều hơn [49]. Mặt khác, nhóm bệnh nhân lớn tuổi có chức năng buồng trứng suy yếu có thể giảm đáp ứng với thuốc KTBT cũng dẫn đến tỉ lệ trứng non cao [49]. Dữ liệu về tỉ lệ trưởng thành của trứng non rescue – IVM ở độ tuổi khác nhau cũng rất hạn chế.

Trong nghiên cứu này, với kết quả tỉ lệ trứng non trưởng thành *in vitro* thấp hơn ở nhóm bệnh nhân trẻ tuổi (< 35), chúng tôi cho rằng đáp ứng buồng trứng cao dẫn đến tỉ lệ chọc hút các nang thứ cấp cao hơn. Nang thứ cấp là những nang chưa có khả năng phát triển đầy đủ nên có tiềm năng trưởng thành *in vitro* thấp hơn [48].

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của chỉ số AMH (ng/ml) đến tỉ lệ trưởng thành và kết quả phôi học của trứng GV

	AMH < 1,1	AMH ≥ 1,1	P value	OR, 95% CI
Tỉ lệ trưởng thành (%) N = 356 (Số trứng nuôi cấy IVM)	85,7 (6/7)	55,3 (193/349)	0,109	4,850 (0,578 – 40,708)
Tỉ lệ thụ tinh (%) N = 181 (Số trứng rescue - IVM)	50,0 (2/4)	55,4 (98/177)	0,831	1,241 (0,171 – 9,005)
Tỉ lệ tạo phôi nang (%) N = 104 (Số trứng thụ tinh)	0,00 (0/6)	23,5 (23/98)	0,435	1,307 (1,171 – 1,458)

Kết quả này của chúng tôi tương tự với kết quả của Yang và cộng sự năm 2023 [44], chỉ số AMH không ảnh hưởng đến tiềm năng phát triển của trứng GV, nhưng ngược lại nghiên cứu của Hoon và cộng sự 2015, có kết quả nhóm bệnh nhân có dự trữ buồng trứng thấp có tỉ lệ trứng GV đạt đến giai đoạn MII trong vòng 24 giờ nuôi cấy cao hơn đáng kể (66,9% và 30,4%; p = 0,013) [14].

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của chỉ số BMI (kg/m^2) đến tỉ lệ trưởng thành và kết quả phôi học của trứng GV

	BMI < 25	BMI \geq 25	P value	OR, 95% CI
Tỉ lệ trưởng thành (%) N = 356 (Số trứng nuôi cấy IVM)	56,5 (160/283)	53,4 (39/73)	0,633	1,134 (0,677 – 1,901)
Tỉ lệ thụ tinh (%) N = 181 (Số trứng rescue - IVM)	55,0 (83/151)	56,7 (17/30)	0,864	1,071 (0,486 – 2,361)
Tỉ lệ tạo phôi nang (%) N = 104 (Số trứng thụ tinh)	22,9 (19/83)	23,8 (5/21)	0,955	1,036 (0,302 – 3,553)

Chỉ số BMI cũng không ảnh hưởng đến tỉ lệ trưởng thành, khả năng thụ tinh và tạo phôi của trứng GV tương tự như kết quả của Yang và cộng sự 2023 [44].

3.2.3.2 Ảnh hưởng của các khoảng thời gian trưởng thành đến kết quả phôi học của trứng GV

Với thời gian ICSI trung bình là 22 – 23 giờ kể từ khi trứng non bắt đầu được theo dõi bằng TLS, kết quả cho thấy trứng non có khoảng thời gian GV.MI từ 0 - 2,0 giờ và GV.MII từ 12,2 - 16,3 giờ có tỷ lệ thụ tinh bình thường cao hơn so với các nhóm khác (75,9%, $p = 0,000$ và 69,6%, $p = 0,032$) (bảng 3.12). Tương tự như trứng MI, khoảng thời gian MI.MII không ảnh hưởng đến tỷ lệ thụ tinh và tạo phôi của trứng GV. Trong nhiều nghiên cứu trước đây, khoảng thời gian MI.MII^{GV} của trứng GV được báo cáo là ít biến động, trung bình là $14,0 \pm 0,3$ giờ [60] (trong nghiên cứu của chúng tôi khoảng thời gian này là 14,3 (13,8 – 15,0 giờ)).

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của các khoảng thời gian trưởng thành đến tỉ lệ thụ tinh của trứng non GV.

TỈ LỆ THỤ TINH BÌNH THƯỜNG			p value
n (%)			
N = 181 (<i>Số trứng được thụ tinh</i>)			
GV.MI (giờ)			
0 – 2,0	n = 54	41 (75,9)	0,000
2,1 – 3,5	n = 37	16 (43,2)	
3,6 – 4,7	n = 45	27 (60,0)	
4,8 – 10,1	n = 45	16 (35,6)	
MI.MII^{GV} (giờ)			
9,5 – 13,8	n = 46	21 (45,7)	0,431
13,9 – 14,3	n = 55	32 (58,2)	
14,4 – 15,0	n = 35	22 (62,9)	
15,1 – 18,1	n = 43	23 (53,5)	
GV.MII (giờ)			
12,2 – 16,3	n = 46	33 (69,6)	0,032
16,4 – 17,8	n = 46	28 (60,9)	
17,9 – 19,3	n = 45	22 (48,9)	
19,4 – 22,4	n = 44	18 (40,9)	
MI.ICSI (giờ)			
0 – 2,2	n = 46	18 (39,1)	0,030
2,3 – 3,8	n = 43	23 (53,5)	
3,9 – 5,1	n = 43	32 (62,8)	
5,2 – 9,5	n = 39	27 (69,2)	

Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Yang và cộng sự năm 2023 cho rằng, trứng GV có khoảng thời gian GV.MI < 8 giờ và GV.MII < 24 giờ có tỉ lệ thụ tinh cao hơn [44] và nghiên cứu của Eschrich và cộng sự (2012) cho thấy nhóm trứng Rescue - IVM trưởng thành trong 24 giờ, với GV.MII trung bình là $18,4 \pm 2,7$ giờ, có kết quả phôi học tốt hơn [43].

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của các khoảng thời gian trưởng thành đến tỉ lệ tạo phôi nang của trứng non GV

TỈ LỆ TẠO PHÔI NANG n (%)			p value
N = 104 (<i>Số trứng thụ tinh</i>)			
GV.MI (giờ)			
0 – 2,0	n = 43	12 (27,9)	0,698
2,1 – 3,5	n = 18	5 (27,7)	
3,6 – 4,7	n = 27	4 (14,8)	
4,8 – 10,1	n = 16	4 (25,0)	
MI.MII^{GV} (giờ)			
9,5 – 13,8	n = 24	7 (29,1)	0,567
13,9 – 14,3	n = 32	6 (18,8)	
14,4 – 15,0	n = 25	8 (32,0)	
15,1 – 18,1	n = 23	4 (17,4)	
GV.MII (giờ)			
12,2 – 16,3	n = 34	12 (35,2)	0,045
16,4 – 17,8	n = 28	3 (10,7)	
17,9 – 19,3	n = 22	7 (31,8)	
19,4 – 22,4	n = 20	3 (16,7)	
MI.ICSI (giờ)			
0 – 2,2	n = 18	2 (11,1)	0,324
2,3 – 3,8	n = 23	6 (26,1)	
3,9 – 5,1	n = 27	6 (18,5)	
5,2 – 9,5	n = 27	9 (33,3)	

Tác động của khoảng thời gian GV.MI lên khả năng thụ tinh và tạo phôi của trứng non được quan sát thấy ở chuột và trâu, tuy nhiên cơ chế còn chưa rõ ràng. Có nhiều các nghiên cứu chứng minh khoảng thời gian GV.MI có liên hệ mật thiết tới khả năng thụ tinh và tạo phôi của trứng non. GV.MI kéo dài ảnh hưởng đến khả năng dịch mã dẫn tới giảm khả năng tạo phôi nang của tế bào trứng [61]. Ở chuột, quan sát thấy tỉ lệ tạo phôi nang cao hơn ở nhóm trứng non

có GVBD xảy ra sớm với nhóm có GVBD xảy ra muộn (47,3% và 17,9%, $p < 0,05$) [62]

Trong nghiên cứu này, tuy thời gian từ GV đến MI ảnh hưởng đến khả năng tạo phôi nang không có ý nghĩa thống kê do cỡ mẫu hạn chế, nhưng vẫn có thể quan sát thấy rằng nhóm có GV.MI 0 – 2,0 giờ có tỉ lệ phôi nang tốt nhất.

Tầm quan trọng của khoảng thời gian GV.MII cũng được khẳng định lại khi tỉ lệ hình thành phôi nang của trứng GV có khoảng thời gian GV.MII $\leq 16,3$ giờ có tỉ lệ phôi nang cao hơn các nhóm còn lại (34,4%, $p = 0,045$). Với khoảng thời gian MI.MII tương đối ổn định, trứng GV xảy ra GVBD càng sớm thì tương ứng cũng đạt đến giai đoạn MII càng sớm.

Vậy tại sao GVBD xảy ra càng sớm thì càng có lợi cho khả năng thụ tinh và hình thành phôi nang hữu dụng của trứng non?

Trong điều kiện nuôi cấy không bổ sung các hóa chất kéo dài thời gian GVBD, việc loại bỏ tế bào cumulus làm cắt đứt sự tương tác quan trọng giữa tế bào trứng và tế bào soma dẫn đến con đường truyền tín hiệu điều khiển yếu tố trưởng thành của trứng (MPF) bị gián đoạn và trứng GV có xu hướng tiếp tục quá trình giảm phân một cách tự nhiên [62]. Do đó, nếu khoảng thời gian GV.MI và GV.MII kéo dài có thể dẫn đến các bất thường trong các hoạt động nội bào của trứng, không chỉ ảnh hưởng đến sự thụ tinh mà còn ảnh hưởng đến sự phân chia và phát triển của phôi [63-65]. Trong nghiên cứu sau đây, nhóm trứng non với thời gian GV.MII trung bình $18,4 \pm 2,7$ giờ có khả năng thụ tinh và tạo phôi nang cao hơn đáng kể so với nhóm có thời gian GV.MII là $26,3 \pm 3,8$ giờ ($p < 0,01$) [43].

Việc chọc hút noãn ra khỏi cơ thể dẫn đến việc mất đi sự tương tác với dịch nang và tế bào soma [36], hiện tượng phá vỡ túi mầm (GVBD) sẽ xảy ra do mất đi tương tác giữa tế bào cumulus và tế bào trứng dẫn tới nồng độ cAMP giảm đột ngột. Đây là tín hiệu để trứng bắt đầu lại quá trình giảm phân, nhưng đồng thời các kênh vận chuyển các chất chuyển hóa quan trọng như nucleotide, dinh dưỡng và mRNA, vốn đóng vai trò không nhỏ trong quá trình trưởng thành của trứng, cũng bị gián đoạn. Điều này ảnh hưởng không nhỏ đến sự thụ tinh và

phân chia của phôi ở giai đoạn sớm [7]. Quá trình trưởng thành của trứng GV trong buồng trứng càng dài thì trứng càng có nhiều cơ hội phát triển và trưởng thành một cách toàn diện hơn. Hay nói cách khác khoảng thời gian GV.MI *in vitro* càng ngắn thì trứng càng có tiềm năng thụ tinh và tạo phôi tốt hơn

Mặt khác, thời điểm ICSI cũng ảnh hưởng không nhỏ đến tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ phôi hữu dụng. Kết quả từ nghiên cứu của Huyn và cộng sự năm 2007 đã chỉ ra rằng ICSI được thực hiện ở thời điểm 5 – 6 giờ sau khi trứng GV tổng xuất thể cực thứ nhất, cho tỷ lệ tạo phôi cao nhất [19]. Một số nghiên cứu khác cũng báo cáo rằng trứng trưởng thành trong ống nghiệm và trong cơ thể cần nghỉ khoảng 3 - 6 giờ để trục phân bào ổn định vị trí, thuận lợi cho quá trình thụ tinh [20-23]. Trong nghiên cứu hiện tại, chúng tôi cũng quan sát thấy rằng trứng GV với MII.ICSI từ 5,2 – 9,5 giờ có tỷ lệ thụ tinh là 69,2% ($p = 0,030$) cao hơn so với nhóm còn lại.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Theo dõi động học trưởng thành của trứng non MI và GV bằng hệ thống nuôi cấy phôi Time-lapse

- Trứng non MI có tỷ lệ trưởng thành và kết quả phôi học tốt hơn so với trứng GV. Trong đó, trứng MI trưởng thành và được ICSI vào ngày hôm sau có tỷ lệ thụ tinh cao hơn so với nhóm trưởng thành muộn và được ICSI vào ngày chọc hút trứng.
- Trứng GV có thời gian GV.MII từ 0 – 2,0 giờ, thời gian trưởng thành (GV.MII) từ 12,2 - 16,3 giờ và thời gian từ khi trưởng thành đến khi ICSI từ 5,2 – 9,5 giờ có tỷ lệ thụ tinh cao hơn so với các nhóm khác. Đặc biệt, trứng GV có thời gian trưởng thành từ 12,2 - 16,3 giờ có tỷ lệ hình thành phôi nang tốt hơn.
- Tuổi mẹ < 35 có tỉ lệ trưởng thành của trứng GV thấp hơn nhưng không ảnh hưởng đến tỉ lệ trưởng thành của trứng MI. Các đặc điểm chỉ số khối BMI và chỉ số dự trữ buồng trứng AMH không ảnh hưởng đến tỉ lệ trưởng thành, tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ tạo phôi nang của trứng non.

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu thu được trong đề tài, tác giả kiến nghị:

- Mở rộng nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn, cập nhật thêm các kết quả thai lâm sàng và sức khỏe của trẻ sinh ra từ phôi có nguồn gốc từ trứng Rescue - IVM
- Kết hợp với kỹ thuật sàng lọc phôi di truyền tiền làm tổ (PGT) để lựa chọn và sử dụng những phôi khỏe mạnh từ trứng non.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hồ Mạnh Tường, Đặng Quang Vinh, Vương Thị Ngọc Lan, 2020, *Thụ tinh trong ống nghiệm*, NXB Tổng hợp Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh.
2. Zhu M., Xu M., Zhang J., Zheng C., 2023, The role of Hippo pathway in ovarian development, *Frontiers in Physiology*, 14(pp. 1198873).
3. Swain J.E., Smith G.D., 2007, Mechanism of oocyte maturation, *In Vitro Maturation of Human Oocytes: Basic Science to Clinical Application.: Informa Healthcare Abingdon*, pp. 83-102.
4. Sathananthan A.H., Ng S.C., Chia C.M., Law H.Y., Edirisinghe W.R., Ratnam S.S., 1985, The origin and distribution of cortical granules in human oocytes with reference to Golgi, nucleolar, and microfilament activity, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 442(pp. 251-264).
5. Perreault S.D., Barbee R.R., Slott V.L., 1988, Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes, *Developmental Biology*, 125(1), pp. 181-186.
6. Gandolfi T.B., Gandolfi F., Fulvio., 2001, The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development, *Theriogenology*, 55(6), pp. 1255-1276.
7. Das M., Son W.Y., 2023, In vitro maturation (IVM) of human immature oocytes: is it still relevant?, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 21(1), pp. 110.
8. Leal G.R., Monteiro C.A.S., Souza-Fabjan J.M.G., de Paula Vasconcelos C.O., Nogueira L.A.G., Ferreira A.M.R., Serapião R.V., 2018, Role of cAMP modulator supplementations during oocyte in vitro maturation in domestic animals, *Animal reproduction science*, 199(pp. 1-14).
9. Arroyo A., Kim B., Yeh J 2020, Luteinizing hormone action in human oocyte maturation and quality: signaling pathways, regulation, and clinical impact, *Reproductive Sciences*, 27(6), pp. 1223-1252.

10. Albuz F.K., Sasseville M., Lane M., Armstrong D.T., Thompson J.G., Gilchrist R.B. , 2010, Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes, *Human reproduction*, 25(12), pp. 2999-3011.
11. Mandelbaum R.S., Awadalla M.S., Smith M.B., Violette C.J., Klooster B.L., Danis R.B., McGinnis L.K., Ho J.R., Bendikson K.A., Paulson R.J., Ahmady A., 2021, Developmental potential of immature human oocytes aspirated after controlled ovarian stimulation, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(9), pp. 2291-2299.
12. Hatırnaz Ş., Ata B., Hatırnaz E.S., Dahan M.H., Tannus S., Tan J., Tan S.L., 2018, Oocyte in vitro maturation: A systematic review, *Turkish Journal Of Obstetrics And Gynecology*, 15(2), pp. 112-125.
13. Walls M.L., Hart R.J., 2018, In vitro maturation, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 53(pp. 60-72.
14. Lee H.J., Barad D.H., Kushnir V.A., Shohat-Tal A., Lazzaroni-Tealdi E., Wu Y.G., Gleicher N., 2016, Rescue in vitro maturation (IVM) of immature oocytes in stimulated cycles in women with low functional ovarian reserve (LFOR), *Endocrine*, 52(1), pp. 165-171.
15. Sánchez F., Smitz J., 2012, Molecular control of oogenesis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(12), pp. 1896-1912.
16. Walls M., Junk S., Ryan J.P., Hart R., 2012, IVF versus ICSI for the fertilization of in-vitro matured human oocytes, *Reproductive BioMedicine Online*, 25(6), pp. 603-607.
17. Álvarez C., García-Garrido, C., Taronger, R., de Merlo G.G., 2013, In vitro maturation, fertilization, embryo development & clinical outcome of human metaphase-I oocytes retrieved from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles, *Indian Journal of Medical Research*, 137(2), pp. 331-338.
18. Vanhoutte L., De Sutter P., Nogueira D., Gerris J., Dhont M., Van der Elst J., 2007, Nuclear and cytoplasmic maturation of in vitro matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor, *Human reproduction*, 22(5), pp. 1239-1246.

19. Hyun C.S., Cha J.H., Son W.Y., Yoon S.H., Kim K.A., Lim J.H., 2007, Optimal ICSI timing after the first polar body extrusion in in vitro matured human oocytes, *Hum Reprod*, 22(7), pp. 1991-1995.
20. Yu Y., Yan J., Liu Z.C., Yan L.Y., Li M., Zhou Q., Qiao J., 2011, Optimal timing of oocyte maturation and its relationship with the spindle assembly and developmental competence of in vitro matured human oocytes, *Fertility and sterility*, 96(1), pp. 73-78. e71.
21. Ranganath A., Appaneravanda L.C., Gerstl B., Math N.T., Menon J., Gunasheela D., 2021, A study to find optimal intra-cytoplasmic sperm injection timing of oocytes matured from germinal vesicle in in vitro maturation cycles using a time lapse system, *Journal of Human Reproductive Sciences*, 14(4), pp. 415-421.
22. Strassburger D., Friedler S., Raziel A., Kasterstein E., Schachter M., Ron-El R., 2004, The outcome of ICSI of immature MI oocytes and rescued in vitro matured MII oocytes, *Human reproduction*, 19(7), pp. 1587-1590.
23. Zhang M., Su Y.Q., Sugiura K., Xia G., Eppig J.J., 2010, Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes, *Science*, 330(6002), pp. 366-369.
24. Kim BK, Lee SC, Kim KJ, Han CH, Kim JH, 2000, In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles, *Fertil Steril*, 74(6), pp. 1153-1158.
25. Moon J.H., Zhao Q., Zhang J., Reddy V., Han J., Cheng Y., Zhang N., Dasig J., Nel-Themaat L., Behr B., Yu B., 2023, The developmental competence of human metaphase I oocytes with delayed maturation in vitro, *Fertility and sterility*, 119(4), pp. 690-696.
26. Shani A.K., Haham L.M., Balakier H., Kuznyetsova I., Bashar S., Day E.N., Librach C.L., 2023, The developmental potential of mature oocytes derived from rescue in vitro maturation, *Fertility and sterility*, 120(4), pp. 860-869.
27. Mateo S., Vidal F., Carrasco B., Rodríguez I., Coroleu B., Veiga A., Boada M., 2020, Morphokinetics and in vitro developmental potential of

- monopronucleated ICSI zygotes until the blastocyst stage, *Zygote*, 28(3), pp. 217-222.
28. 2011, The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting, *Human reproduction*, 26(6), pp. 1270-1283.
 29. Tian T. . Chen L., Yang R., Long X., Li Q., Hao Y., Kong F., Li R., Wang Y., Qiao J., 2022, Prediction of fertilization disorders in the in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a retrospective study of 106,728 treatment cycles, *Frontiers in Endocrinology*, 13(pp. 870708).
 30. Handayani N., Sundari AM., Aprilliana T., Boediono A., Polim A.A., Wiweko B., Sirait B., Sini I., 2024, Immature oocyte proportion in a cohort led to poor embryo development but did not reduce clinical pregnancy rate, *Middle East Fertility Society Journal*, 29(1), pp. 1-6.
 31. Gardner D. K., Schoolcraft W. B., 1999, In vitro culture of human blastocysts, *Towards Reproductive Certainty Infertility and Genetics Beyond*, 11(3), pp. 378–388.
 32. Cekleniak N.A. Combelles C.M., Ganz D.A., Fung J., Albertini D.F., Racowsky C., 2001, A novel system for in vitro maturation of human oocytes, *Fertility and sterility*, 75(6), pp. 1185-1193.
 33. Lanzendorf S.E., Zelinski-Wooten M.B., Stouffer R.L., Wolf D.P., 1990, Maturity at collection and the developmental potential of rhesus monkey oocytes, *Biology of reproduction*, 42(4), pp. 703-711.
 34. Meng L., Wolf D.P., 1997, Sperm-induced oocyte activation in the rhesus monkey: nuclear and cytoplasmic changes following intracytoplasmic sperm injection, *Human reproduction*, 12(5), pp. 1062-1068.
 35. De Vos A., Van De Velde H., Joris H., Van Steirteghem A., 1999, In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection, *Human reproduction*, 14(7), pp. 1859-1863.
 36. Huang F.J., Chang S.Y., Tsai M.Y., Lin Y.C., Kung F.T., Wu J.F., Lu Y.J., 1999, Relationship of the human cumulus-free oocyte maturational profile

with in vitro outcome parameters after intracytoplasmic sperm injection, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 16(pp. 483-487).

37. Chen S.U., Chen H.F., Lie Y.R., Ho H.N., Cha H.C., 2000, Schedule to inject in vitro matured oocytes may increase pregnancy after intracytoplasmic sperm injection, *Archives of andrology*, 44(3), pp. 197-205.
38. Bonu M.A., Papaioannidou P.G., Garetti S., Sciajno R., Serrao L., Preti S., 2001, P-195 Twin pregnancy after in-vitro maturation of oocytes: case report, *Human reproduction*, 16(suppl 1), pp. 176-177.
39. Khazaei M., Aghaz F., 2017, Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during in vitro maturation of oocytes, *International journal of fertility & sterility*, 11(2), pp. 63.
40. Salehi M., reza Afarinesh M., Haghpanah T., Novin M.G., Farifteh F. , 2019, Impact of sperm DNA fragmentation on ICSI outcome and incidence of apoptosis of human pre-implantation embryos obtained from in vitro matured MII oocytes, *Biochemical and biophysical research communications*, 510(1), pp. 110-115.
41. Nabi A., Khalili M.A., Halvaei I., Roodbari F., 2014, Prolonged incubation of processed human spermatozoa will increase DNA fragmentation, *Andrologia*, 46(4), pp. 374-379.
42. Sedó C.A., Bilinski M., Lorenzi D., Uriondo H., Noblía F., Longobucco V., Lagar E.V., Nodar F., 2017, Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects, *JBRA assisted reproduction*, 21(4), pp. 343.
43. Escrich L., Grau N., de los Santos M.J., Romero J.L., Pellicer A., Escribá M.J., 2012, The dynamics of in vitro maturation of germinal vesicle oocytes, *Fertility and sterility*, 98(5), pp. 1147-1151.
44. Yang Q., Zhu L., Wang M., Huang B., Li Z., Hu J., Xi Q., Liu J., Jin L., 2021, Analysis of maturation dynamics and developmental competence of in vitro matured oocytes under time-lapse monitoring, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 19(1), pp. 183.

45. Calhaz-Jorge C., De Geyter C., Kupka M.S., de Mouzon J., Erb K., Mocanu E., Motrenko T., Scaravelli G., Wyns C., 2017, Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE, *Human reproduction*, 32(10), pp. 1957-1973.
46. Deyhoul N., Mohamaddoost T., Hosseini M., 2017, Infertility-related risk factors: a systematic review, *International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences*, 5(1), pp. 24-29.
47. Preutthipan S., Amso N., Curtis P., Shaw R.W., 1996, Effect of maternal age on clinical outcome in women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET), *Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmaihet thangphaet*, 79(6), pp. 347-352.
48. Moore A.K., Arny M., Lynch K., Grow D.R., 2007, Oocyte maturation arrest more common in younger patients undergoing IVF/ICSI, *Fertility and Sterility*, 88, pp. S271.
49. Lee H.J., Jee B.C., Suh C.S., Kim S.H., Moon S.Y., 2012, Oocyte maturity in relation to woman's age in in vitro fertilization cycles stimulated by single regimen, *Yonsei medical journal*, 53(1), pp. 181-185.
50. Vijay A.S., Gopireddy M.M.R., Fyzullah S., Gollapalli P., Maheswari M., Rani U., 2022, Association between AMH levels and fertility/reproductive outcomes among women undergoing IVF: a retrospective study, *Journal of Reproduction & Infertility*, 23(1), pp. 54.
51. Maheshwari A., Stofberg L., Bhattacharya S., 2007, Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology—a systematic review, *Human reproduction update*, 13(5), pp. 433-444.
52. Zhang D., Zhu Y., Gao H., Zhou B., Zhang R., Wang T., Ding G., Qu F., Huang H., Lu X., 2010, Overweight and obesity negatively affect the outcomes of ovarian stimulation and in vitro fertilisation: a cohort study of 2628 Chinese women, *Gynecological Endocrinology*, 26(5), pp. 325-332.
53. Lewis C.G., Warnes G.M., Wang X.J., Matthews C.D., 1990, Failure of body mass index or body weight to influence markedly the response to ovarian hyperstimulation in normal cycling women, *Fertility and sterility*, 53(6), pp. 1097-1099.

54. Fedorcsák P., Dale P.O., Storeng R., Ertzeid G., Bjercke S., Oldereid N., Omland A.K., Åbyholm T., Tanbo T., 2004, Impact of overweight and underweight on assisted reproduction treatment, *Human reproduction*, 19(11), pp. 2523-2528.
55. Shalom-Paz E., Marzal A., Wisner A., Almog B., Reinblatt S., Tulandi T., Holzer H., 2011, Effects of different body mass indices on in vitro maturation in women with polycystic ovaries, *Fertility and sterility*, 96(2), pp. 336-339.
56. Wang J.X., Davies M.J., Norman R.J., 2002, Obesity increases the risk of spontaneous abortion during infertility treatment, *Obesity research*, 10(6), pp. 551-554.
57. Carmichael S.L., Rasmussen S.A., Shaw G.M., 2010, Prepregnancy obesity: a complex risk factor for selected birth defects, *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 88(10), pp. 804-810.
58. Mantakas A., Farrell T., 2010, The influence of increasing BMI in nulliparous women on pregnancy outcome, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 153(1), pp. 43-46.
59. Moon J.H., Garcia-Cerrudo E., Henderson S., Mahfoudh A., Holzer H., Son W.Y., 2014, Embryo developmental potential of in vitro matured mi from stimulation cycles depends on the timing of nuclear maturation rather than the length of mii arrest, *Fertility and sterility*, 102(3), pp. e343.
60. Macklon N.S., Fauser B.C.J.M., 2016, Follicle development during the normal menstrual cycle, *Maturitas*, 30(2), pp. 181-188.
61. Kumar M., Faraji M., Sarwalia P., Kumar S., Gohain M., De S., Kumar R., Datta T.K., 2018, Propensity in low-grade oocytes for delayed germinal vesicle breakdown compromises the developmental ability of sub-optimal grade *Bubalus bubalis* oocytes, *Zygote*, 26(5), pp. 359-365.
62. Higaki S., Kishi M., Koyama K., Nagano M., Katagiri S., Takada T., 2017, Early germinal vesicle breakdown is a predictor of high preimplantation developmental competent oocytes in mice, *Zygote*, 25(1), pp. 41-48.

63. Murray A.W., Kirschner M.W., 1989, Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle, *Nature*, 339(6222), pp. 275-280.
64. Kubiak J.Z., Ciemerych M.A., Hupalowska A., Sikora-Polaczek M., Polanski Z., 2008, On the transition from the meiotic to mitotic cell cycle during early mouse development, *International Journal of Developmental Biology*, 52(pp.
65. Catalá M.G., Izquierdo D., Uzbekova S., Morató R., Roura M., Romaguera R., Papillier P., Paramio M.T., 2011, Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep, *Reproduction*, 142(4), pp. 517.

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1: ĐƠN XIN XÁC NHẬN NGHIÊN CỨU CHO PHÉP THỰC HIỆN TRÊN BỆNH NHÂN KHÁM VÀ ĐIỀU TRỊ.....PL1

PHỤ LỤC 2: CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢPL5

PHỤ LỤC 1: ĐƠN XIN XÁC NHẬN NGHIÊN CỨU CHO PHÉP THỰC HIỆN TRÊN BỆNH NHÂN KHÁM VÀ ĐIỀU TRỊ

TỔNG CÔNG TY HÀNG KÊNH - CTCP
BỆNH VIỆN QUỐC TẾ SẢN - NHI HẢI PHÒNG

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

Hải Phòng, ngày 10 tháng 09 năm 2024

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

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

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

Tôi tên là: Nguyễn Thị Thu Trang Sinh ngày: 24 tháng 03 năm 1994

Hiện tại tôi đang công tác tại Khoa Hỗ trợ Sinh sản – Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng. Trong quá trình công tác, tôi có tiến hành nghiên cứu đề tài: “Đánh giá động học trưởng thành và kết quả phôi học của trứng non qua hệ thống nuôi cấy phôi theo dõi liên tục (Time lapse system) tại Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng từ 8/2023 - 8/2024”. Thời gian nghiên cứu từ tháng 08 năm 2023 đến tháng 08 năm 2024.

Đối tượng nghiên cứu trong đề tài này là: kết quả phôi học về hình thái của các cặp vợ chồng vô sinh điều trị thụ tinh trong ống nghiệm tại Khoa Hỗ trợ Sinh sản – Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng từ tháng 08 năm 2023 đến tháng 08 năm 2024. Các kết quả nghiên cứu không ảnh hưởng tới kết quả của bệnh nhân và đảm bảo vấn đề đạo đức trong nghiên cứu.



Phạm Thu Xanh

TRƯỞNG KHOA

Nguyễn Đức Thuận

NGHIÊN CỨU VIÊN

Nguyễn Thị Thu Trang

DANH SÁCH BỆNH NHÂN

STT	Tên viết tắt	Năm sinh
1	Nguyễn K.K	1990
2	Nguyễn T.Y.	1990
3	Vũ M.I.H.	1990
4	Dương T. T. D.	1990
5	Phạm T.B.	1998
6	Phạm T.T. T.	1987
7	Ngô T. N. H.	1991
8	Trần T.T.	1992
9	Đào M. A.	1996
10	Nguyễn T.H.	1989
11	Lê T. N.	1994
12	Vũ T.P.	1997
13	Nguyễn T.T.	1997
14	Vũ T. N.	2004
15	Nguyễn T.Q. D.	1993
16	Luu T. K. D.	1988
17	Phạm T. T.	1999
18	Cao T.Y.	1994
19	Nông T. H.	2001
20	Võ T. T. H.	1990
21	Đỗ T. M. L.	1995
22	Đinh T. L. H.	1987
23	Lê M. H.	1996
24	Phạm T. B. C.	1995
25	Phạm T. D.	1987
26	Bùi T.L.	1989
27	Nguyễn T. T.	1992
28	Nguyễn T.Q.	1991
29	Trần T. T. H.	1989
30	Nguyễn T.T.	1996
31	Nguyễn T. L.	1988
32	Nguyễn T.T.	1990
33	Phạm T.T.	1984
34	Lê T.H.	1986
35	Trần T. V.	1990
36	Đỗ T. T. D.	1988
37	Nguyễn T.Y.	1990
38	Đông T.T.	1986
39	Lê T.T.P.	1991
40	Lê T.Q.	1992

STT	Tên viết tắt	Năm sinh
41	Nguyễn T. H.	1993
42	Đông T. H.	1989
43	Đỗ T.T.	1995
44	Trần T.T.	1990
45	Nguyễn T. P.T.	1993
46	Lê T.D.	1985
47	Vũ T.H. G.	1997
48	Cù T.T.	1987
49	Trần T.T.N.	1996
50	Ngô T. L. A.	1991
51	Nguyễn T.T.	1990
52	Trịnh T.N.M.	1989
53	Đỗ N.T. H.	1984
54	Nguyễn T.T.	1987
55	Phạm T.H.	1993
56	Lê T.P.	1994
57	Lê T.M. P.	1981
58	Phạm T.H.	1996
59	Đặng N.M.	2004
60	Nguyễn T.H.	1983
61	Hoàng T. H.Y.	1991
62	Nguyễn T.T.	1996
63	Nguyễn T.P.T.	1988
64	Trần T.T.	1990
65	Trần T.H.	1992
66	Đỗ T.T.T.	1995
67	Trần T.B. T.	1981
68	Hoàng T.H.	1990
69	Ngô T.H.	1989
70	Đinh T.H.T.	1983
71	Nguyễn D.L.	1992
72	Phan T.T.	1993
73	Nguyễn T. Đ.	1995
74	Đỗ T.H.	1986
75	Bùi T.H.Y.	1993
76	Lò S.V.	1997
77	Lê T.H.	1986
78	Nguyễn T.B.	1989
79	Nguyễn T. H.	1986
80	Nguyễn T.H.G.	1990

LHM-C
 BỆNH
 QUỐC
 SẢN
 ẢI P
 CN-020

STT	Tên viết tắt	Năm sinh
81	Trần T.H.	1986
82	Ngô T. V. T.	1995
83	Cao T. L.C.	1996
84	Hoàng T.N.	1991
85	Lưu T.K.D.	1988
86	Phạm T.T.	1997
87	Bùi T.H.T.	1986
88	Nguyễn T.T.T.	1989
89	Nguyễn T.H.	1986
90	Vũ T.H.	1987
91	Bùi T.L.O.	1997
92	Vũ T.Á.T.	1995
93	Trần T. K.T.	1993
94	Vũ T.T. G.	1983
95	Phạm T.T.	1994
96	Hà T.D.	1982
97	Nguyễn T.H.	1993
98	Nguyễn T. H.T.	1989
99	Lê T. H.	1988
100	Phạm T.B. L.	1986
101	Trương T.T.	1994
102	Hồ T. H.	1991
103	Nguyễn T. T.	1995
104	Trần T.T.D.	1988
105	Nguyễn T. H.	1986
106	Ngô T. T.	1992
107	Phùng T. D.	1984
108	Nguyễn T.T.	1984
109	Hoài T.H.K.	1987
110	Phạm T.H. Y.	1988
111	Nguyễn T.T. T.	1989
112	Lê T.N.	1993
113	Nguyễn H.G.	1992
114	Nguyễn D. H.	1989
115	Nguyễn T.P. T.	1988
116	Nguyễn T. T.T.	1989
117	Vũ T.N.	1987
118	Phạm T.T.N.	1995
119	Đoàn T.M.P.	1993
120	Phạm T.T.	2001
121	Trần T.M.A.	1986

STT	Tên viết tắt	Năm sinh
122	Bùi H.Q.A.	1983
123	Hoàng T.L.	1996
124	Phạm T.T.D.	1990
125	Nguyễn T.T.	1991
126	Nguyễn T.A.	1991
127	Ngô T.C.	1998
128	Phạm T.N.	1992
129	Nguyễn T.O.	1995
130	Nguyễn T.H.	1987
131	Lý T.M.	1993
132	Nguyễn T.T.V.	1991
133	Trần H.T.	1991
134	Nguyễn T.H. P.	1989
135	Lê T.Y.	1984
136	Phạm H.T.	1990
137	Lê T.K.	1983
138	Nghiêm T.N.M.	1998
139	Bùi T.T.	1980
140	Mào T. S.	1983
141	Phạm T. H. Y.	1988
142	Vũ T.H.	1991
143	Đỗ T. X. T.	1989
144	Đỗ K. A.	1994
145	Nguyễn T.T.	1995
146	Lê H.T.	1998
147	Vũ T.H.	1987
148	Mai T.H.Y.	1992
149	Phạm T.M.	1989
150	Bùi T. N.	1991
151	Vũ T.M.	1987
152	Vũ T.G.	1989
153	Nguyễn T.T.	1988
154	Trần T. T.	1992
155	Ng.T.D.	1995
156	Hồ T.H.Y.	1993
157	Bùi N. L.	1998
158	Ng. Thị . H.	1993
159	P.T. H.	1991
160	Bùi Đ.P.L.	1993
161	Nguyễn T. T.C.	1992
162	Nguyễn T.H.	1993

STT	Tên viết tắt	Năm sinh
163	Vũ T.T.	1993
164	Nguyễn T.N.	1987
165	Nguyễn T. P. H.	1995
166	Trần T.T.	1994
167	Trần T.T.T.	1992
168	Lê T. P. D.	1987
169	Phạm T.H.	1997
170	Nguyễn M.H.	1981
171	Trần T. T. A.	1985
172	Vũ T. N.	1991
173	Lê T. T.T.	1988
174	Phạm P. A.	2000
175	Lê T.H.	1995
176	Nguyễn H. M.	1990
177	Lưu L.Q.	1988
178	Mai T.H.Y.	1998
179	Nguyễn T.T.H.	1974
180	Vũ T.T.	1990
181	Lê T.P. D.	1994
182	Phạm T.N.	1990
183	Trần T.H.	1989
184	Trần T.N.	1988
185	Nguyễn T. V. A.	1991
186	Lê T. T.	1986
187	Nguyễn T. H. P.	1990
188	Phạm T.D.	1990
189	Trần T.K. D.	1988
190	Phạm T.T. Đ.	1991
191	Phạm N.T.	1991
192	Vũ T.T.	1988
193	Nguyễn T.N.	1989
194	Nguyễn N.O.	1993
195	Lưu T. T.	1996
196	Ng. T. H.	1994
197	Vũ T. P. A.	2003
198	Vũ T.H.	1995
199	Ngô T.H.	1995
200	Nguyễn T. N.H.	1998
201	Vũ T. T.	1988
202	Phạm T. L.	1999
203	Đỗ T.T.	1980

STT	Tên viết tắt	Năm sinh
204	Phạm T. H.	1993
205	Nguyễn T. N.	1993
206	Phan T. T. L.	1990
207	Nguyễn T. G.	1994
208	Phạm T.T.	1984
209	Nguyễn T. S.	1989
210	Nguyễn A.N.	1996
211	Bùi T.M. D.	1988
212	Đỗ T.H.	1990
213	Trần T.T. T.	1990
214	Hoàng T. M.	1986
215	Nguyễn T.N.	1991
216	Thái T.T.	1984
217	Nguyễn T.T.H.	1995
218	Đàm T.H.	1985
219	Tạ T. T.H.	1984
220	Nguyễn T.C.	1984
221	Ngô T. M.	1989
222	Nguyễn T. T.	1986
223	Đinh T. H.	1987
224	Phạm T. D.	1990
225	Kiêng T.H.	1989
226	Nguyễn T. H.	1983
227	Đông T. T. H.	1996
228	Đỗ T. T.	2002
229	Hoàng T.M. H.	1995
230	Nguyễn T. T. H.	1999
231	Hứa H.T.	1992
232	Đỗ T.T.	1993
233	Nguyễn T. N.	1986
234	Trần T. L.	1994
235	Lê T. T.H.	1994
236	Nguyễn T.H.	1990
237	Bùi T.C.	1985
238	Đào T. D. K.	1991
239	Nguyễn T.T.	1989
240	Lê T. T.	1992
241	Nguyễn T. T.	1990
242	Trần T.C.	2001
243	Phạm T.N. A.	1989
244	Đặng P.T.	1993

STT	Tên viết tắt	Năm sinh
245	Nguyễn T.H.	1983
246	Đỗ H. H.N.	1993
247	Hoàng T.T. H.	1998
248	Phạm T. T. H.	1991
249	Phạm T.T. L.	1992
250	Bùi T.T.H.	1988
251	Nguyễn T. T.	1990
252	Nguyễn T. N.	1993
253	Nguyễn T.T. L.	1990
254	Nguyễn T. T.	2000
255	Vũ T.H.	1980
256	Đông T. T.	1998
257	Hoàng T. Á. T.	1994



PHỤ LỤC 2: CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

1. Nguyễn Thị Thu Trang, Đào Thị Phương, Đặng Trường Sơn, Đỗ Tuấn Anh, Lưu Trung Tâm, 2024, Đánh giá động học trưởng thành và kết quả phôi học của trứng non thông qua hệ thống nuôi cấy phôi theo dõi liên tục (Time - lapse system), *Kỷ yếu hội nghị IVF Expert Meeting 19*, tr. 246 – 253.

ĐÁNH GIÁ ĐỘNG HỌC TRƯỞNG THÀNH VÀ KẾT QUẢ PHÔI HỌC CỦA TRỨNG NON THÔNG QUA HỆ THỐNG NUÔI CẤY PHÔI THEO DÕI LIÊN TỤC (TIME LAPSE SYSTEM)

Nguyễn Thị Thu Trang, Đào Thị Phương, Đặng Trường Sơn, Đỗ Tuấn Anh, Lưu Trung Tâm

Trung tâm Hỗ trợ sinh sản HP Fertility, Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng

TÓM TẮT

Có khoảng 20 – 30% trứng thu được sau chọc hút trong các chu kỳ kích thích buồng trứng có kiểm soát ở trạng thái chưa trưởng thành^[1] sẽ được tiếp tục nuôi cấy và được rescue – ICSI khi trứng đạt tới giai đoạn giảm phân II, nhằm mục đích tối ưu hóa số trứng có thể sử dụng cho bệnh nhân. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích theo dõi động học trưởng thành của trứng non thông qua hệ thống nuôi cấy phôi Time-lapse và đánh giá ảnh hưởng của các khoảng thời gian trưởng thành đó đến kết quả phôi học của trứng non.

Nghiên cứu hồi cứu được thực hiện trên 195 trứng GV từ 91 chu kỳ IVF của 91 cặp vợ chồng thực hiện điều trị thụ tinh trong ống nghiệm tại Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng từ tháng 8/2023 đến hết tháng 3/2024. Trứng non GV được thu nhận từ các chu kỳ KTBT có kiểm soát sẽ được tiếp tục nuôi cấy *in vitro* và ghi nhận các khoảng thời gian (giờ) bao gồm: GV.MI, MI.MII, GV.MII. Trứng non khi trưởng thành sẽ được rescue – ICSI và nuôi cấy để theo dõi sự thụ tinh và phát triển của phôi.

Theo dõi trong vòng 24 giờ, ghi nhận trong 195 trứng GV có 107 trứng trưởng thành (54,9%), với trung bình khoảng thời gian GV.MI là 3,6 giờ (2,1 – 5,2 giờ), trung bình khoảng thời gian MI.MII là 14,2 giờ (13,0 – 14,9 giờ), trung bình khoảng thời gian GV.MII là 17,6 giờ (16,3 – 19,3 giờ). Tỷ lệ trưởng thành, tỷ lệ thụ tinh bình thường và tỷ lệ tạo phôi nang của trứng non GV lần lượt là 54,9%, 51,9% và 32,7%. Các đặc điểm lâm sàng nhìn chung không có ảnh hưởng tỷ lệ trưởng thành, tỷ lệ thụ tinh bình thường và tỷ lệ tạo phôi nang của trứng non. Với quy trình rescue – ICSI tại phòng Lab của HP Fertility, kết quả ghi nhận trứng non có khoảng thời gian GV.MI < 2,1 giờ và GV.MII < 16,3 giờ có tỷ lệ thụ tinh bình thường cao hơn các nhóm còn lại ($p = 0,008$ và $p = 0,045$). Trong khi tỷ lệ phôi nang giữa các nhóm này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Như vậy, trứng non GV được nuôi cấy *in vitro* tiếp tục quá trình giảm phân sau ít hơn 2,1 giờ nuôi cấy và đạt đến trạng thái trưởng thành trong khoảng thời gian ít hơn 16,3 giờ có tỷ lệ thụ tinh bình thường cao hơn ở nhóm còn lại. Thời gian GV.MI và GV.MII ghi nhận

thông qua hệ thống nuôi cấy phôi Time-lapse có thể được sử dụng như một cơ sở để dự đoán kết quả phôi học của trứng non.

Từ khóa: trứng non, rescue-ICSI, trứng non trưởng thành trong ống nghiệm, time-lapse.

MỞ ĐẦU

Theo dõi sự trưởng thành của trứng non trong ống nghiệm, người ta nhận thấy 89% trứng GV tiếp tục phân bào sau 6 giờ nuôi cấy và 70% trưởng thành trong vòng 24 giờ nuôi cấy^[6,7]. Mặc dù có tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi thấp hơn so với trứng trưởng thành nhưng kết quả cho thấy R-ICSI (Rescue – Intra Cytoplasmic Sperm Injection) giúp mang đến thêm 1,5 phôi để chuyển cho bệnh nhân giảm dự trữ buồng trứng và 1,6 phôi ở bệnh nhân có dự trữ buồng trứng bình thường. Hay nói cách khác R-ICSI giúp cải thiện đáng kể cơ hội có phôi để chuyển và tỉ lệ thành công khi điều trị IVF đặc biệt ở nhóm bệnh nhân giảm dự trữ buồng trứng^[8,9]. Do đó, việc nghiên cứu các yếu tố để cải thiện hiệu quả sử dụng trứng non là cần thiết. Hiện nay, phần lớn các nghiên cứu tập trung vào các hóa chất bổ sung nhằm cải thiện tỉ lệ trưởng thành của trứng non trong khi các nghiên cứu về động học trưởng thành còn khá hạn chế.

Hệ thống nuôi cấy phôi theo dõi liên tục Time-lapse (Time-lapse system – TLS) không chỉ được ứng dụng rất rộng rãi trong nuôi cấy và lựa chọn phôi mà còn giúp cho việc theo dõi diễn biến trong quá trình trưởng thành và phát triển của trứng non trở nên thuận tiện hơn^[11]. Trong nghiên cứu này, thông qua TLS, chúng tôi tiến hành theo dõi sự trưởng thành của trứng GV trong vòng 24 giờ, ghi nhận sự trưởng thành để tiến hành R-ICSI; tiếp theo đánh giá sự thụ tinh và phát triển của phôi, đồng thời phân tích một số đặc điểm lâm sàng để đánh giá toàn diện các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phôi học của trứng non.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu hồi cứu được thực hiện trên đối tượng bệnh nhân điều trị thụ tinh trong ống nghiệm tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản – Bệnh viện Quốc tế Sản Nhi Hải Phòng từ tháng 8/2023 đến tháng 3/2024 thỏa mãn tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ.

Tiêu chuẩn lựa chọn bao gồm: bệnh nhân sử dụng phác đồ kích thích buồng trứng có kiểm soát; sau chọc hút phải có ít nhất 01 trứng GV; bệnh nhân có chỉ định nuôi cấy phôi Time lapse và mỗi trứng non phải được nuôi cấy trong từng giếng riêng biệt.

Tiêu chuẩn loại trừ bao gồm: hình dạng tinh trùng bình thường <1% ; tinh trùng thu nhận từ thủ thuật (PESA, TESE) hoặc tinh trùng ít, yếu, dị dạng mức độ nặng (S-OAT); tinh trùng trữ đông; trứng sau khi loại bỏ tế bào hạt ghi nhận có hình thái bất thường^[13], tỉ lệ thụ tinh trên trứng trưởng thành <25%; tỉ lệ trứng non thu nhận sau chọc hút >50%; bệnh nhân có bệnh lý nội khoa như tim mạch, tuyến giáp, bệnh chuyển hóa, bất thường về tâm thần vận động.

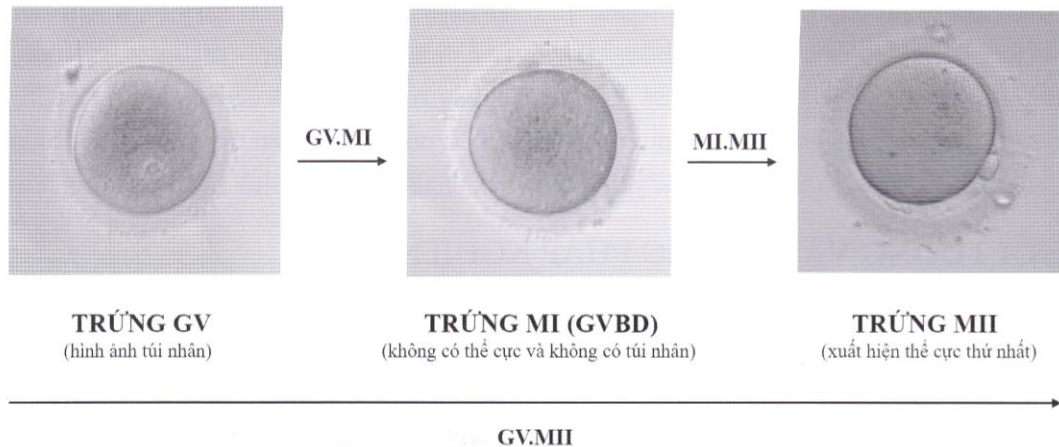
Phương pháp nghiên cứu

Chọc hút trứng và theo dõi sự trưởng thành của trứng non bằng Time-lapse

Phức hợp trứng – tế bào hạt sau khi thu nhận sẽ được ủ trong môi trường G-IVF (Vitrolife – Thụy Điển) hoặc FM (Irvine – Hoa Kỳ) từ 2 – 3 giờ, 37 °C, 6% CO₂ và 5% O₂. Sau được loại bỏ tế bào hạt bằng hyaluronidase 80 IU (Irvine, Hoa Kỳ), trứng được phân loại như sau: (1) trứng MII, tức là đã trưởng thành bên trong cơ thể (nhận diện bằng sự hiện diện của thể cực thứ nhất); (2) trứng MI không có thể cực và không có túi nhân; (3) trứng GV có hình ảnh túi nhân trong bào tương trứng^[14]. Trứng non được nuôi trưởng thành trong môi trường nuôi cấy phôi Geri (Gems – Úc), tủ nuôi cấy Timelapse Geri⁺ (Genea Biomedex)), điều kiện 37°C, 6% CO₂ và 5% O₂.

Thông qua TLS, các khoảng thời gian được xác định trong nghiên cứu bao gồm:

- Thời gian GV.MI: được tính từ sau khi loại bỏ tế bào hạt đến khi quan sát thấy túi mầm biến mất (GVBD).
- Thời gian MI.MII: được tính từ sau khi loại bỏ tế bào hạt (đối với trứng MI) và khi túi mầm biến mất (đối với trứng GV) đến khi xuất hiện thể cực thứ nhất (PB1).
- Thời gian GV.MII: được tính từ sau khi loại bỏ tế bào hạt đến khi xuất hiện thể cực thứ nhất (PB1) hay có thể tính bằng tổng thời gian GV.MI và MI.MII.



Hình 1. Các giai đoạn trưởng thành của trứng non.

Rescue – ICSI và nuôi cấy phôi

Rescue – ICSI được thực hiện trên những trứng trưởng thành trong 24 giờ nuôi cấy. Thời điểm rescue thông thường được thực hiện trong vòng 19 – 22 giờ kể từ khi bắt đầu theo dõi bằng Time – lapse. Sau khi rescue, trứng được nuôi cấy liên tục trong môi trường Geri (Gems – Úc).

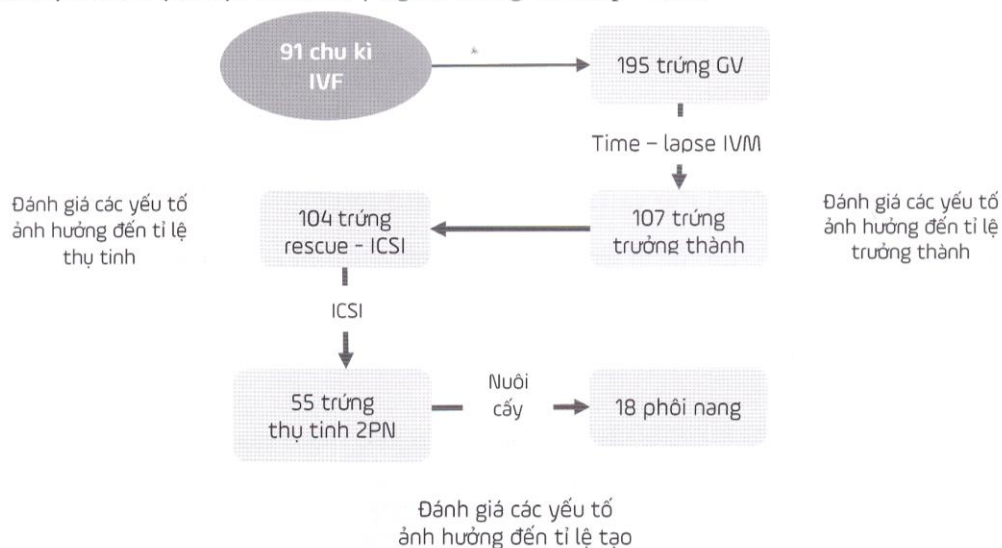
Kiểm tra thụ tinh và đánh giá phôi

Kiểm tra thụ tinh được thực hiện vào khoảng 17 ± 1 giờ sau rescue – ICSI. Đánh giá phôi phân chia được thực hiện khoảng 44 ± 1 giờ; hình thái phôi nang được đánh giá vào thời

điểm 116 ± 1 giờ (đối với phôi ngày 5) và 140 ± 1 giờ (đối với phôi ngày 6). Chất lượng phôi được phân loại dựa theo hệ thống đánh giá của Gardner^[13] và đồng thuận Alpha 2011^[15].

Phương pháp phân tích số liệu

Các số liệu được mã hóa, thu thập và xử lý bằng phần mềm SPSS 25.0, sử dụng Chi-square test. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.



Hình 2. Sơ đồ nghiên cứu.

KẾT QUẢ

Đặc điểm nền của bệnh nhân

Tổng cộng 195 trứng GV được thu thập từ 91 chu kì IVF của 91 bệnh nhân thỏa mãn tiêu chuẩn của nghiên cứu với độ tuổi trung bình là $32,6 (\pm 4,5)$, chỉ số khối trung bình (BMI) là $21,6 (\pm 2,5)$ kg/m, dự trữ buồng trứng AMH trung bình là $4,3 (2,5 - 6)$ ng/ml. Trong đó có 67% bệnh nhân được chẩn đoán là vô sinh thứ phát, 33% là vô sinh nguyên phát với thời gian mong con trung bình là $2,0 (1 - 3)$ năm. Các đặc điểm được trình bày chi tiết trong bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm nền của bệnh nhân.

Đặc điểm (N = 91)	Kết quả
Tuổi (năm)	$32,6 \pm 4,5$
BMI (kg/m ²)	$21,6 \pm 2,5$
Loại vô sinh, (n, %)	
Vô sinh nguyên phát	30 (33%)
Vô sinh thứ phát	61 (67%)
Thời gian mong con (năm)	$2,0 (1 - 3)$
Dự trữ buồng trứng - AMH (ng/ml)	$4,3 (2,5 - 6)$
Số trứng sau chọc hút (n)	17 (13 - 21)
Tỉ lệ trứng trưởng thành sau chọc hút (%)	74%
Tỉ lệ thụ tinh bình thường (%)	77%

195 trứng GV sau khi được nuôi cấy *in vitro* trong vòng 24 giờ, ghi nhận có 107 trứng GV trưởng thành (54,9%), trong đó 104 trứng được rescue, số lượng trứng được rescue trung bình là 1,14 trứng/bệnh nhân. Thông qua việc theo dõi sự trưởng thành của trứng non bằng TLS, ghi nhận trung bình khoảng thời gian GV.MI là 3,6 giờ (2,1 – 5,2 giờ), trung bình khoảng thời gian MI.MII là 14,2 giờ (13,0 – 14,9 giờ), trung bình khoảng thời gian GV.MII là 17,6 giờ (16,3 – 19,3 giờ).[‡]

Kết quả phôi học

Trong 104 trứng GV được rescue, ghi nhận 55 trứng thụ tinh bình thường (51,9%), tiếp tục được nuôi cấy đến giai đoạn phôi ngày 5/ngày 6 ghi nhận có 18 phôi nang (32,7%) trong đó có 6 phôi nang loại 2 (33,3%) và 12 phôi nang loại 3 (66,7%).

Tiến hành phân tích các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân cho thấy, tuổi mẹ (năm); chỉ số khối BMI (kg/m^2), dự trữ buồng trứng AMH (ng/ml) không ảnh hưởng đến tỉ lệ trưởng thành, tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ tạo phôi của trứng non. Kết quả chi tiết được trình bày trong bảng 2,3,4.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các đặc điểm lâm sàng đến tỉ lệ trưởng thành của trứng non.

N = 107	Tỉ lệ trưởng thành của trứng non (%)	P value	OR	95% CI
Tuổi mẹ, (năm)				
< 35 (n = 137)	51,4	0,780	0,571	0,305 – 1,068
≥ 35 (n = 60)	65,0			
AMH (ng/ml)				
< 1,1 (n = 14)	80,0	0,480	3,469	0,947 – 12,71
≥ 1,1 (n = 183)	53,6			
BMI (kg/m^2)				
< 25 (n = 174)	57,1	0,215	1,733	0,721 – 4,167
≥ 25 (n = 23)	43,5			

Kết quả động học và đánh giá tương quan

Với quy trình rescue – ICSI cố định được thực hiện vào khoảng 19 – 22 giờ kể từ khi trứng non bắt đầu theo dõi bằng TLS, kết quả trứng non có khoảng thời gian GV.MI < 2,1 giờ và GV.MII < 16,3 giờ có tỉ lệ thụ tinh bình thường cao hơn các nhóm còn lại (76,0% và 45,6%, $p = 0,008$); (70,8% và 47,5%, $p = 0,045$). Khoảng thời gian MI.MII không ảnh hưởng đến tỉ lệ thụ tinh. Kết quả chi tiết được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của đặc điểm lâm sàng và các khoảng thời gian đến tỉ lệ thụ tinh của trứng non.

N=104	Tỉ lệ thụ tinh của trứng non (%)	P value	OR	95% CI
Tuổi mẹ, (năm)				
< 35 (n = 65)	53,8	0,800	0,902	0,407 – 1,998
≥ 35 (n = 39)	51,3			
AMH (ng/ml)				
< 1,1 (n = 4)	50,0	0,906	1,128	0,153 – 8,323
≥ 1,1 (n = 100)	53,0			
BMI (kg/m ²)				
< 25 (n = 96)	54,2	0,364	0,508	0,115 – 2,245
≥ 25 (n = 8)	37,5			
GV.MI (giờ)				
< 2,1 (n = 25)	76,0	0,008	0,264	0,095 – 0,732
≥ 2,1 (n = 79)	45,6			
MI.MII (giờ)				
< 14,2 (n = 43)	47,1	0,243	1,585	0,730 – 3,441
≥ 14,2 (n = 61)	58,5			
GV.MII (giờ)				
< 16,3 (n = 19)	70,8	0,045	0,373	0,139 – 0,996
≥ 16,3 (n = 85)	47,5			

Tiếp tục phân tích trên 55 trứng được thụ tinh thành công, kết quả cho thấy các khoảng thời gian GV.MI, GV.MII, MI.MII không ảnh hưởng đáng kể đến tỉ lệ hình thành phôi nang. Kết quả chi tiết được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của đặc điểm lâm sàng và các khoảng thời gian đến tỉ lệ tạo phôi nang của trứng non.

N = 55	Tỉ lệ tạo phôi nang của trứng non (%)	P value	OR	95% CI
Tuổi mẹ, (năm)				
< 35 (n = 35)	34,3	0,745	0,821	0,251 – 2,684
≥ 35 (n = 20)	30,3			
AMH (ng/ml)				
< 1,1 (n = 2)	0,00	0,315	1,514	1,248 – 1,837
≥ 1,1 (n = 53)	34,0			
BMI (kg/m ²)				
< 25 (n = 52)	30,8	0,198	4,500	0,380 – 53,288
≥ 25 (n = 3)	66,7			
GV.MI (giờ)				
< 2,1 (n = 11)	27,3	0,666	1,379	0,318 – 5,975
≥ 2,1 (n = 44)	34,1			
MI.MII (giờ)				
< 14,2 (n = 22)	36,4	0,639	0,761	0,243 – 2,385
≥ 14,2 (n = 33)	30,3			
GV.MII (giờ)				
< 16,3 (n = 19)	35,7	0,783	0,836	0,233 – 2,993
≥ 16,3 (n = 36)	31,7			

THẢO LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành theo dõi sự trưởng thành của trứng non GV thu được sau các chu kỳ kích thích buồng trứng có kiểm soát thông qua hệ thống nuôi cấy phôi Time-lapse với tổng số 195 trứng GV được theo dõi, ghi nhận lại các khoảng thời gian GV.MI, MI.MII, GV.MII tương tự với nhiều nghiên cứu trước ở nhóm trứng non trưởng thành sớm (E-IVM) – trứng non trưởng thành trong vòng 24 giờ^[7].

Theo dõi động học trưởng thành của trứng non, kết quả cho thấy trứng GV có khoảng thời gian GV.MI < 2,1 và GV.MII < 16,3 giờ có tỉ lệ thụ tinh cao hơn nhóm còn lại trong khi khoảng thời gian MI.MII dường như không ảnh hưởng đến tỉ lệ thụ tinh. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Yang và cộng sự năm 2020 cho rằng, trứng GV có khoảng thời gian GV.MI < 8 giờ và GV.MII < 24 giờ có tỉ lệ thụ tinh cao hơn^[16].

Một số nghiên cứu báo cáo rằng, trứng trưởng thành *in vitro* và *in vivo* cần nghỉ trong khoảng từ 3 – 6 giờ để trục phân bào ổn định vị trí, thuận lợi cho quá trình thụ tinh^[20-23]. Điều này bổ sung cho kết quả của chúng tôi, trứng GV có khoảng thời gian GV.MI < 2,1 giờ, với khoảng thời gian MI.MII ~ 14,2 giờ tương ứng sẽ có khoảng thời gian GV.MII < 16,3 giờ. Khi đó trứng sẽ có thêm vài giờ để trưởng thành hoàn toàn trước khi được rescue vào thời điểm 19-22 giờ, nhờ đó có tỉ lệ thụ tinh tốt hơn.

Tóm lại, tiềm năng phát triển của trứng non GV liên quan chặt chẽ đến thời gian GV.MI. Do đó, thời gian GV.MI có thể được sử dụng như một chỉ số quan trọng dự đoán sự trưởng thành và khả năng tạo phôi của trứng non.

Nghiên cứu hiện tại chưa cập nhật được các kết quả về tỉ lệ có thai, tỉ lệ làm tổ và tỉ lệ trẻ sinh sống do phôi từ trứng non thường được sử dụng khi bệnh nhân không có phôi từ trứng trưởng thành hoặc đã sử dụng hết phôi từ trứng trưởng thành. Nghiên cứu cũng có cỡ mẫu ít do là nghiên cứu đơn trung tâm và đối tượng nghiên cứu được lựa chọn nghiêm ngặt. Bên cạnh đó, rescue ICSI không sử dụng môi trường chuyên dụng để nuôi trưởng thành trứng *in vitro* nhằm mục đích tiết kiệm chi phí cho bệnh nhân, quy trình rescue trứng non cũng được đơn giản hóa để phù hợp với chu trình làm việc của labo IVF.

KẾT LUẬN

Theo dõi động học trưởng thành trứng non bằng Time-lapse, chúng tôi ghi nhận thời gian GV.MI và GV.MII có ảnh hưởng đáng kể đến tỉ lệ thụ tinh nhưng không ảnh hưởng đến tỉ lệ tạo phôi nang. Khoảng thời gian MI.MII và các đặc điểm lâm sàng nhìn chung không ảnh hưởng đến kết quả phôi học của trứng non.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kim BK, Lee SC, Kim KJ, Han CH, Kim JH. In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertil Steril* 2000;74(6):1153-1158.
2. Mandelbaum RS, Awadalla MS, Smith MB, Violette CJ, Klooster BL, Danis RB, McGinnis LK, Ho JR, Bendikson KA, Paulson RJ, Ahmady A. Developmental potential of immature human oocytes aspirated after controlled ovarian stimulation. *J Assist Reprod Genet* 2021;38(9):2291-2299.

3. Moon JH, Zhao Q, Zhang J, Reddy V, Han J, Cheng Y, Zhang N, Dasig J, Nel-Themaat L, Behr B, Yu B. The developmental competence of human metaphase I oocytes with delayed maturation in vitro. *Fertil Steril* 2023;119(4):690-696.
4. Batha S, Ardestani G, Ocali O, Jarmuz P, Vaughan DA, Barrett CB, Sakkas D. Day after rescue ICSI: eliminating total fertilization failure after conventional IVF with high live birth rates following cryopreserved blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2023;38(7):1277-1283.
5. Boulet SL, Mehta A, Kissin DM, Warner L, Kawwass JF, Jamieson DJ. Trends in use of and reproductive outcomes associated with intracytoplasmic sperm injection. *Jama* 2015;313(3):259-263.
6. Strassburger D, Friedler S, Raziell A, Kasterstein E, Schachter M, Ron-El R. The outcome of ICSI of immature MI oocytes and rescued in vitro matured MII oocytes. *Hum Reprod* 2004;19(7):1587-1590.
7. Escrich L, Grau N, de los Santos MJ, Romero JL, Pellicer A, Escrivá MJ. The dynamics of in vitro maturation of germinal vesicle oocytes. *Fertil Steril* 2012;98(5):1147-1151.
8. Lee HJ, Barad DH, Kushnir VA, Shohat-Tal A, Lazzaroni-Tealdi E, Wu YG, Gleicher N. Rescue in vitro maturation (IVM) of immature oocytes in stimulated cycles in women with low functional ovarian reserve (LFOR). *Endocrine* 2016;52(165-171).
9. Qin, Dan YJ, Hua-Hua L, Yu F, *Frontiers J*. Rescue in vitro maturation may increase the pregnancy outcomes among women undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Front Endocrinol* 2022;13(1047571).
10. Yang, Qiyu Z, Lixia J, Lei Human follicle in vitro culture including activation, growth, and maturation: a review of research progress. *Front Endocrinol* 2020;11(548).
11. Roesner S, Dietrich JE, Weigert J, Montag M, Toth B, Strowitzki T. Time-lapse imaging reveals differences in growth dynamics of embryos after in vitro maturation compared with conventional stimulation. *Fertil Steril* 2017;107(3):606-612.
12. Higaki, Shogo K, Masao K, Keisuke N, Masashi K, Seiji T, Tatsuyuki T, Yoshiyuki Early germinal vesicle breakdown is a predictor of high preimplantation developmental competent oocytes in mice. *Zygote* 2017;25(1):41-48.
13. Gardner, David KW, Ariel H, Colin MS, Zeev. *Textbook of assisted reproductive techniques fourth edition: volume 2: Clinical perspectives*. CRC press.
14. Hà TQ, Hồ MT, Nguyễn TTL, Lâm AT, Vương TNL. Kết quả cải tiến qui trình nuôi trưởng thành noãn trong ống nghiệm (IVM). *Tạp chí Phụ Sản* 2013;78-83.
15. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011;26(6):1270-1283.
16. Yang Q, Zhu L, Wang M, Huang B, Li Z, Hu J, Xi Q, Liu J, Jin L. Analysis of maturation dynamics and developmental competence of in vitro matured oocytes under time-lapse monitoring. *Reprod Biol Endocrinol* 2021;19(1):183.
17. Murray, Andrew W, Kirschner, Marc W Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 1989;339(6222):275-280.
18. Kubiak, Jacek ZC, Maria AH, Anna SP, Marta P, Zbigniew On the transition from the meiotic to mitotic cell cycle during early mouse development. *Int. J. Dev. Biol.* 2008;52(2-3):201-217.
19. Catalá, Maria G, Izquierdo, Dolores U, Svetlana M, Roser R, Montserrat R, Roser P, Pascal P, Maria T. Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction* 2011;142(4):517.
20. De S, Petra D, Cieslak D, Wolf J, Verlinsky G, Dyban Y. Parthenogenetic activation of human oocytes by puromycin. *J Assist Reprod Genet* 1992;9(328-337).
21. De Vos, Annick VDV, Hilde J, Hubert VS, Andre In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *J Hum Reprod* 1999;14(7):1859-1863.
22. Goud, Pravin G, Anuradha VO, Patrick VE, Josiane D, Marc Fertilization abnormalities and pronucleus size asynchrony after intracytoplasmic sperm injection are related to oocyte postmaturity. *Fertil Steril* 1999;72(2):245-252.
23. Paffoni, Alessio B, Tiziana AL, Somigliana, Edgardo R, Liliana G, Fulvio R, Guido In vitro development of human oocytes after parthenogenetic activation or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2007;87(1):77-82.
24. Lee HJ, Barad DH, Kushnir VA, Shohat TA, Lazzaroni TE, Wu YG, Gleicher N. Rescue in vitro maturation (IVM) of immature oocytes in stimulated cycles in women with low functional ovarian reserve (LFOR). *Endocrine* 2016;52(1):165-171.