

Hiệu quả của kỹ thuật hỗ trợ thoát màng bằng Axít Tyrode cho phôi đông lạnh

**Đoàn Thị Hằng* ; Nguyễn Thanh Tùng*
Quản Hoàng Lâm* ; Nguyễn Đình Tảo* và CS**

TÓM TẮT

Nghiên cứu trên 257 phôi nuôi cấy ngày 3 có chỉ định đông lạnh và rã đông bằng phương pháp thủy tinh hóa (vitrification) cho 98 bệnh nhân (BN) tại Trung tâm Công nghệ Phôi, Học viện Quân y. Mục tiêu: đánh giá hiệu quả hỗ trợ thoát màng đối với tỷ lệ phôi làm tổ và thai lâm sàng sau khi chuyển phôi đông lạnh. Kết quả: nhóm BN có hỗ trợ thoát màng phôi sau đông lạnh có tỷ lệ phôi làm tổ và thai lâm sàng cao hơn so với nhóm không hỗ trợ thoát màng phôi (16,26% so với 7,14% và 33,33% so với 15,9%).

* Từ khóa: Thụ tinh trong ống nghiệm; Màng zona pellucid; Hỗ trợ thoát màng; Phôi đông lạnh.

The effect of assisted hatching using Acid Tyrode on cryopreserved - thawed embryo

SUMMARY

Our study was performed in 257 cryopreserved embryos in day 3 by vitrification technique of 98 patients in the Centre for Human Reproduction and Embryology. The aim of this study was to assess the effect of assisted hatching on implantation as well as clinical pregnancy rates after the transfer of frozen-thawed embryos. The results showed that the patient group with assisted hatching for embryos had higher rates of implantation and clinical pregnancy than the patient group without assisted hatching for embryos (16.26% versus 7.14 and 33.33% versus 15.9%).

** Key words: In vitro fertilization; Zona pellucida; Assisted hatching; Cryopreserved-thawed embryo.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ năm 1983, ca chuyển phôi đông lạnh có thai lần đầu tiên làm cho kỹ thuật đông lạnh phôi người trở thành một kỹ thuật hỗ

trợ sinh sản hết sức cần thiết đối với trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm (IVF), giúp bác sỹ giảm số phôi chuyển cần thiết, phòng ngừa quá kích buồng trứng, gia tăng hiệu quả của IVF và tiết kiệm kinh phí.

* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: PGS. TS. Hoàng Văn Lông

Tuy nhiên, nhược điểm của quy trình đông lạnh và rã đông là làm thay đổi glycoprotein của màng trong suốt (ZP), dẫn đến màng trong suốt bị “cứng” lại hoặc không mỏng đi trong quá trình phôi phát triển. Điều này làm cho phôi không thể thoát ra ngoài và bám vào nội mạc tử cung để làm tổ.

Dựa trên giả thuyết về sự bất thường có thể của màng ZP sau nuôi cấy nói chung và sau đông lạnh nói riêng, các nhà khoa học phát triển kỹ thuật làm mỏng hoặc làm thủng màng ZP bên ngoài phôi, giúp phôi dễ thoát ra ngoài và làm tổ vào tử cung hơn. Kỹ thuật này được gọi là kỹ thuật “hỗ trợ thoát màng” (AH). Hiện nay, trên thế giới có 4 phương pháp được áp dụng để hỗ trợ phôi thoát màng [2]: làm mỏng màng trong suốt bằng axit tyrode; làm mỏng màng trong suốt bằng tia laser; làm mỏng màng trong suốt bằng men pronase; làm thủng màng trong suốt bằng cơ học.

Cho đến nay, hầu hết các nhà nghiên cứu cho rằng hỗ trợ thoát màng có lợi cho phôi làm tổ, tuy nhiên vẫn còn nhiều tranh cãi liệu kỹ thuật hỗ trợ thoát màng có thật sự cải thiện được khả năng làm tổ cho phôi sau đông lạnh và rã đông hay không?

Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu với mục tiêu: *Đánh giá hiệu quả hỗ trợ thoát màng cho phôi sau đông lạnh.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

257 phôi ngày 3 của 98 BN sau đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa, được rã đông tại Trung tâm Công nghệ Phôi, Học viện Quân y từ tháng 3 - 2008 đến 12 - 2010. Chia 98 BN thành 2 nhóm:

Nhóm 1: phôi sau rã đông không thực hiện hỗ trợ thoát màng (44 BN thực hiện từ tháng 3 - 2008 đến 8 - 2009).

Nhóm 2: phôi sau rã đông thực hiện hỗ trợ thoát màng (54 BN thực hiện từ tháng 9 - 2009 đến 12 - 2010).

2. Phương pháp nghiên cứu.

* *Thiết kế nghiên cứu:* tiến cứu, mô tả cắt ngang.

* *Tiêu chuẩn chọn mẫu nghiên cứu:*

Tất cả phôi đông lạnh được rã đông để chuyển cho BN. Đông lạnh phôi được chỉ định cho các trường hợp:

- Có phôi dư thừa sau chuyển phôi tươi.
- Có hiện tượng quá kích buồng trứng mức độ vừa, nặng.
- Không chuyển phôi do không qua được cổ tử cung, niêm mạc tử cung chưa tốt cho việc chuyển phôi tươi.

* *Chuẩn bị niêm mạc tử cung:*

- Thuốc sử dụng: estrogen (provames 2 mg, progynova 2 mg), progesteron (utrogestan 100 mg).

- Cho BN uống progynova 4 mg/ngày từ ngày thứ 4 của chu kỳ kinh.

- Siêu âm đo niêm mạc tử cung vào ngày thứ 10 của chu kỳ kinh, chỉnh liều progynova.
- Ngày 12 - 14: siêu âm đo niêm mạc tử cung: nếu niêm mạc tử cung ≥ 8 mm, bổ sung utrogestan 400 mg/ngày (đặt âm đạo) trước chuyển phôi 2 ngày.

** Đánh giá chất lượng phôi:*

- Phân độ phôi nuôi cấy ngày 3 trước khi đông dựa trên quan sát hình thái cấu trúc phôi bằng kính hiển vi đảo ngược Olympus IX 70, độ phóng đại 200 lần, theo phân loại hình thái phôi của Andres Salumets (2001) [4]: căn cứ vào số phôi bào, bào tương phôi bào. Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương trong phôi chia thành 4 loại:

+ Phôi độ 4: phôi ngày 2 có 4 tế bào đồng đều, phôi ngày 3 có 6 - 8 tế bào đồng đều, không có mảnh vỡ bào tương.

+ Phôi độ 3: phôi ngày 2 có 2 - 4 tế bào, phôi ngày 3 có 4 - 8 tế bào, mảnh vỡ bào tương chiếm < 20% thể tích phôi.

+ Phôi độ 2: phôi có tỷ lệ mảnh vỡ bào tương chiếm từ 20 - 50% thể tích phôi.

+ Phôi độ 1: phôi có tỷ lệ mảnh vỡ bào tương chiếm > 50% thể tích phôi.

Chỉ có phôi độ 3 và 4 được đông phôi.

** Quy trình đông lạnh và rã đông phôi bằng kỹ thuật thủy tinh hoá theo phương pháp Cryotop của Massahige Kuwayama (2005) [6]:*

- Quy trình đông lạnh: đặt phôi trong giếng có môi trường cân bằng ES (Equilibration Solution) trong 12 phút. Sau đó, chuyển sang giếng có môi trường thủy tinh hoá VS1 (Vitrification Solution) trong 1 phút, tiếp tục chuyển sang giếng có môi trường thủy tinh hoá VS2 (Vitrification Solution), sau đó nhanh chóng đặt phôi lên đầu của dụng cụ Cryotop (cần lưu ý thời gian phôi trong VS2 đến khi đặt trong Cryotop không quá 30 giây), nhúng trực tiếp vào trong nitơ lỏng và cất trong cassette để trong bình chứa.

- Quy trình rã đông phôi: lấy phôi từ nitơ lỏng, nhúng thẳng vào môi trường rã đông TS (Thaw Solution) 37°C trong 1 phút, sau đó chuyển sang môi trường pha loãng DS (Diluent Solution) trong 3 phút, tiếp tục chuyển sang môi trường rửa WS1 (Washing Solution) 5 phút, môi trường rửa WS2 1 phút. Phôi sau rã đông chuyển sang môi trường nuôi phôi.

** Đánh giá phôi sau rã đông và phát triển:*

Căn cứ vào tiêu chuẩn của Veeck (1988) [9]: phôi được đánh giá sau 1 giờ rã đông.

- Phôi còn nguyên vẹn: 100% phôi bào còn sống.

- Phôi tổn thương một phần: > 50% phôi bào còn sống.

- Phôi thoái hoá khi < 50% phôi bào còn sống.

Phôi được cho là sống khi có $\geq 50\%$ phôi bào còn nguyên vẹn. Chỉ số sống tính bằng tỷ lệ tế bào còn sống trên tổng số tế bào trong một phôi.

Phôi được đánh giá là phát triển khi số phôi bào tăng lên sau nuôi cấy 24 giờ, thể hiện bằng tỷ lệ phôi phát triển trên tổng số phôi nuôi cấy.

** Kỹ thuật hỗ trợ thoát màng phôi bằng axit tyrode [2]:*

Phôi sau khi rã đông, nuôi cấy qua đêm, trước khi chuyển phôi 2 giờ thực hiện kỹ thuật hỗ trợ thoát màng. Dùng pipette giữ phôi ở vị trí 9 giờ và đưa pipette chứa dung dịch axit tyrode vào vị trí 3 giờ vùng có khoang quanh phôi trống. Một vùng khiếm khuyết trên màng

trong suốt bị mỏng đi 50% độ dày được tạo ra bằng cách thổi axít tyrode trên bề mặt ngoài của màng trong suốt. Rửa vài lần phôi để loại bỏ lượng axít tyrode thừa và đặt trong môi trường nuôi cấy, chờ cho đến lúc chuyển phôi.

* *Phương pháp đánh giá kết quả lâm sàng:*

- Đánh giá có thai sinh hóa: sau 2 tuần chuyển phôi, lấy máu tĩnh mạch, định lượng nồng độ β HCG > 30 mIU/ml .

- Đánh giá có thai lâm sàng: sau 5 - 6 tuần chuyển phôi, siêu âm kiểm tra thấy có túi ối, có tim thai.

- Tỷ lệ làm tổ: tỷ lệ phần trăm của tổng số thai có được trên tổng số phôi chuyển.

* *Phương pháp xử lý số liệu:* số liệu thống kê được phân tích, so sánh sử dụng phần mềm chuyên ngành thống kê SPSS 13.0 (Statistical Products for the Social Services).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Bảng 1: Đặc điểm mẫu nghiên cứu của 2 nhóm.

CHỈ TIÊU	NHÓM KHÔNG HỖ TRỢ AH (n = 44)	NHÓM CÓ HỖ TRỢ AH (n = 54)	p
Tuổi trung bình	31,9 ± 3,4	31,7 ± 3,6	> 0,05
Số năm vô sinh trung bình	6,5 ± 3,7	6,7 ± 4,2	> 0,05
Độ dày trung bình niêm mạc tử cung (mm)	9,9 ± 1,5	9,2 ± 1,2	> 0,05

Các chỉ tiêu giữa 2 nhóm không có sự khác biệt (p > 0,05).

Bảng 2: Kết quả sau rã đông phôi của 2 nhóm BN.

CHỈ TIÊU	NHÓM KHÔNG HỖ TRỢ AH (n = 44)	NHÓM CÓ HỖ TRỢ AH (n = 54)	p
Số phôi rã đông	129	128	
Tỷ lệ phôi sống	119/129 (92,24%)	120/128 (93,75%)	> 0,05
Tỷ lệ phôi phát triển sau nuôi cấy 24 giờ	93/119 (78,15%)	95/120 (79,16%)	> 0,05
Kích thước màng trong suốt (μ m)	14,65 ± 2,83	14,52 ± 2,87	> 0,05

Các chỉ tiêu giữa 2 nhóm không khác biệt (p > 0,05).

Bảng 3: Kết quả lâm sàng sau chuyển phôi đông lạnh.

CHỈ TIÊU	NHÓM KHÔNG HỖ TRỢ AH (n = 44)	NHÓM CÓ HỖ TRỢ AH (n = 54)	p
Số phôi trung bình chuyển	2,81 ± 1,19	2,17 ± 1,08	> 0,05
Tỷ lệ phôi làm tổ	7/98 (7,14%)	20/123 (16,26%)	< 0,05
Tỷ lệ thai sinh hoá	7/44 (15,9%)	20/54 (37%)	< 0,05
Tỷ lệ thai lâm sàng	7/44 (15,9%)	18/54 (33,33%)	< 0,05

Không có sự khác biệt giữa 2 nhóm không và có hỗ trợ AH về số phôi trung bình chuyển ($p > 0,05$). Trong đó, tỷ lệ phôi làm tổ, tỷ lệ thai sinh hoá và tỷ lệ thai lâm sàng của nhóm có hỗ trợ AH tương ứng là 16,26%, 37% và 33,33%; cao hơn so với nhóm không hỗ trợ AH. Sự khác biệt giữa 2 nhóm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

BÀN LUẬN

Màng trong suốt (ZP) là chất gian bào do tế bào noãn và tế bào nang trứng tiết ra trong quá trình nang trứng phát triển, có vai trò giúp tinh trùng thụ tinh với noãn và phát triển phôi trước khi làm tổ. Màng ZP có cấu trúc nhiều lớp, cấu tạo bởi 4 loại glycoprotein (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4) [7].

Thực tế, vẫn chưa có phương pháp nào xác định được từng đặc tính của màng ZP trước và sau đông lạnh. Chỉ có phương pháp tiêu hoá bằng enzym mới có thể đo được màng ZP hoà tan. Carrol và CS (1990) cho biết: noãn chuột sau rã đông có tỷ lệ thụ tinh thấp hơn so với nhóm noãn không đông lạnh [3]. Manna (2001) nghiên cứu thấy thời gian bào mòn màng ZP của noãn người tăng lên sau đông lạnh [9]. Theo nghiên cứu của Yi-Fan Gu (2010) sử dụng kính hiển vi ánh sáng phân cực đo độ dày các lớp màng ZP giữa nhóm phôi tươi và phôi sau đông lạnh không thấy có sự khác biệt.

Đặc điểm BN và phôi sau đông lạnh của 2 nhóm nghiên cứu hoàn toàn tương tự nhau. Do vậy, bất cứ một yếu tố nào khác tác động đều ảnh hưởng đến kết quả. Thực tế, chúng tôi thấy nhóm có AH trước khi chuyển phôi đông lạnh đã làm tăng tỷ lệ phôi làm tổ và tỷ lệ thai lâm sàng so với nhóm không AH. Kết quả này phù hợp với Gabrielsen và CS (2004); sử dụng axit tyrode để AH cho phôi đông lạnh giúp phôi làm tổ đạt 30/136 (11,4%), cao hơn so với phôi không AH (13/117 = 5,8%), $p < 0,05$, nhưng tỷ lệ thai lâm sàng chưa khác biệt, do số chu kỳ còn thấp [5]. Một nghiên cứu khác của Balaban và CS (2006) hoàn toàn tương đồng với kết quả của chúng tôi khi sử dụng hỗ trợ thoát màng bằng laser cho phôi sau đông lạnh, kết quả tỷ lệ phôi làm tổ 20,1%, tỷ lệ thai lâm sàng 40,9%, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không AH (tỷ lệ phôi làm tổ 9,9%, tỷ lệ thai lâm sàng 16%), $p < 0,01$ và $p < 0,05$

[1]. Không những chỉ áp dụng AH cho phôi đông lạnh, một số trung tâm chỉ định AH cho những BN tiên lượng kém như tuổi cao, chất lượng phôi yếu, phôi có màng trong suốt dày, chu kỳ trước không có kết quả. Thậm chí, một số trung tâm chỉ định cho tất cả BN làm IVF. Có thể, AH làm cho phôi dễ làm tổ vẫn chưa rõ. Theo Liu và CS (1993), phương pháp AH làm tăng tiếp xúc giữa phôi và nội mạc tử cung, còn Cohen và CS (1992) lại cho rằng: khe nhân tạo ở màng ZP tạo ra do thoát màng như một kênh giúp trao đổi chất và yếu tố tăng trưởng giữa nội mạc tử cung và phôi [4].

KẾT LUẬN

Kỹ thuật hỗ trợ thoát màng phôi bằng axit tyrode trên phôi đông lạnh có tỷ lệ phôi làm tổ 16,26%, tỷ lệ thai sinh hóa 37,0% và tỷ lệ thai lâm sàng 33,3%, cao hơn rõ rệt so với nhóm không có hỗ trợ thoát màng (7,14%, 15,9% và 15,9%). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p < 0,05$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Balaban B, Urman B, Yakin K and Isiklar A. Laser-assisted hatching increases pregnancy and implantation rates in cryopreserved embryos that were allowed to cleave in vitro after thawing: a prospective randomized study. *Human Reproduction*. 2006, 21, pp.2136-2140.
2. Balaban B, Urman B, Alatas C; Mercan R, Mumcu A and Isiklar A. A comparison of four different techniques of assisted hatching. *Human Reproduction*. 2002, 17 (5), pp.1239-1243.
3. Carroll J, Depypene H and Mathews CD. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1990, 90, pp.547-553.
4. Cohen J, Alikani M, Trowbridge J and Rosenwaks Z. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod*. 1992, 7, pp.685-691.
5. Gabrielsen A, Agerholm I, Toft B, Hald F, Petersen K, Aagaard J, Feldinger B, Lindenberg S & Fedder J. Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. *Human Reproduction*. 2004, 19, pp.2258-2262.
6. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*. 2005, 11, pp.608-614.
7. Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M et al. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reproduction*. 2004, 19, pp.1580-1586.
8. Liu H, Cohen J, Alikani M, Noyes N and Rosenwaks Z. Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil Steril*. 1993, 60, pp.871-875.

9. Manna C, Rienzi L, Greco E, Sbracia M, Rahman A, Poverini R, Siracusa G & De Felici M. Zona pellucida solubility and cortical granule complements in human oocytes following assisted reproductive techniques. *Zygote*. 2001, 9, pp.201-210.

10. Ng EH, Naveed F, Lau EY, Yeung WS, Chan CC, Tang OS & Ho PC. A randomized double-blind controlled study of the efficacy of laserassisted hatching on implantation and pregnancy rates of frozen-thawed embryo transfer at the cleavage stage. *Human Reproduction*. 2005, 20, pp.979-985.