

MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA NỒNG ĐỘ CỦA CÁC TÁC NHÂN OXY HÓA TRONG DỊCH NANG VÀ CHẤT LƯỢNG PHÔI

Luu Thị Minh Tâm⁽¹⁾, Lê Hoàng Anh⁽¹⁾, Phạm Dương Toàn⁽¹⁾, Huỳnh Gia Bảo⁽¹⁾, Đặng Quang Vinh⁽²⁾
(1) Bệnh viện Đa khoa Mỹ Đức, (2) Khoa Y - Đại học quốc gia Tp.HCM

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Các tác nhân oxy hóa (ROS) có một số vai trò trong quá trình sinh sản của con người, đặc biệt trong vấn đề hiếm muộn. Hiện đang có các nghiên cứu về sự ảnh hưởng của nồng độ ROS trong dịch nang đến chất lượng phôi trong quá trình điều trị thụ tinh trong ống nghiệm (IVF).

Mục tiêu: Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này để tìm hiểu mối tương quan giữa ROS trong dịch nang và chất lượng phôi trong thụ tinh ống nghiệm.

Vật liệu và phương pháp: Nghiên cứu tiến cứu được tiến hành tại IVFMD, bệnh viện Mỹ Đức từ tháng 08/2014 đến tháng 01/2015. Dịch nang tử buồng trứng trái và phải của mỗi bệnh nhân được thu nhận trong quá trình chọc hút trứng. Nồng độ ROS của mỗi buồng trứng được đo và ghi nhận bằng máy đo phát quang hóa học Glomax 20/20 (Promega, Mỹ) sử dụng đầu dò luminol 5mM. Chất lượng phôi ngày 3 được ghi nhận cho mỗi buồng trứng của từng bệnh nhân.

Kết quả: Tổng cộng 301 mẫu dịch nang từ 151 bệnh nhân được thu nhận trong đó có 150 mẫu được thu từ buồng trứng trái và 151 mẫu được thu từ buồng trứng phải. Tiến hành đo nồng độ ROS và ghi nhận chất lượng phôi sau 3 ngày cho kết quả phân tích: hệ số tương quan giữa tỉ lệ phôi loại 1 ngày 3 với nồng độ ROS dịch nang ở mỗi bên buồng trứng phải và trái lần lượt là -0,159 ($P=0,051$) và -0,011 ($P=0,89$).

Kết luận: Không tìm thấy mối tương quan giữa nồng độ ROS trong dịch nang và chất lượng phôi.

Abstract

THE CORRELATION BETWEEN THE REACTIVE OXYGEN SPECIES IN FOLLICULAR FLUID AND EMBRYO QUALITY

Introduction: Reactive oxygen species (ROS) have roles in the pathophysiology of human reproduction, especially of infertility. There has been a concern on the impact of the reactive oxygen species (ROS) in follicular fluid on the quality of embryo of IVF treatment.

Tác giả liên hệ (Corresponding author):
Luu Thị Minh Tâm,
email: tam.ltm@myduchospital.vn
Ngày nhận bài (received): 05/04/2016
Ngày phản biện đánh giá bài báo (revised):
20/04/2016
Ngày bài báo được chấp nhận đăng
(accepted): 25/04/2016

Objective: We conducted this study to explore the correlation between ROS in follicular fluid and embryo quality.

Material & methods: A prospective study was conducted at IVFMD, My Duc hospital from August 2014 to January 2015. ROS was measured by luminometer Glomax 20/20 (Promega, America) using luminol probe in follicular fluid from each ovary at oocyte pick-up. Quality of day 3 embryos were recorded for each patient's ovary. Spearman's correlation was used to explore the correlation between ROS in follicular fluid and embryo quality.

Results: A total of 301 follicular fluid samples from 151 patients were measured, in which 151 samples obtained from right ovary, 150 samples obtained from left ovary. ROS was measured and day 3 embryo quality was recorded for each patient's ovary. The correlation between ROS in follicular fluid and embryo quality from left and right ovary were -0.011 ($P=0.890$) and -0.159 ($P=0.051$), respectively.

Conclusion: No correlation was found between ROS in follicular fluid and embryo quality.

1. Đặt vấn đề

Stress oxy hóa hay mất cân bằng oxy hóa (Oxydative Stress - OS) là hậu quả của sự mất cân bằng giữa sự hình thành các gốc oxy hóa tự do (Reactive Oxygen Species - ROS) và cơ chế kháng oxy hóa của cơ thể. Khi nồng độ các gốc tự do có oxy trong cơ thể tăng cao sẽ dẫn đến nhiều bệnh lý ở người như xơ vữa động mạch, ung thư, tiểu đường, tổn thương gan, thấp khớp, đục thủy tinh thể, rối loạn thần kinh trung ương, Parkinson, hiếm muộn, bệnh lý phụ khoa, bệnh lý trong thai kỳ...[1].

Một số nghiên cứu phát hiện ở nhóm phụ nữ bị lạc nội mạc tử cung (LNMTTC) thì sự phát triển của các tế bào LNMTTC có thể gia tăng nếu nồng độ ROS tăng. Một giả thuyết cho rằng ROS tăng trong bệnh lý LNMTTC có thể góp phần làm giảm chất lượng noãn và phôi đồng thời tạo một môi trường bất lợi cho tinh trùng. Điều này có thể là một phần nguyên nhân gây giảm khả năng sinh sản ở nhóm bệnh nhân này. Nhiều nghiên cứu khác cũng cho thấy hội chứng buồng trứng đa nang (PCOS) cũng liên quan đến sự mất cân bằng cân bằng giữa nồng độ các chất kháng oxy hóa và ROS. Ở phụ nữ lớn tuổi, số lượng nang noãn và chất lượng noãn giảm nhanh và ROS có vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy sự lão hóa của buồng trứng [1].

Thụ tinh trong ống nghiệm là một kỹ thuật điều trị cho các cặp vợ chồng hiếm muộn được chấp

nhận rộng rãi trên toàn thế giới. Tuy nhiên, tỉ lệ thành công của kỹ thuật này trung bình chỉ đạt 30-40% [2]. Một trong những nguyên nhân dẫn đến tỉ lệ thành công thấp là do tuổi của người phụ nữ tăng, giảm dự trữ buồng trứng, các bệnh lý như PCOS, LNMTTC ...và do sự stress oxy hóa [3]. Mặc dù đã có một vài nghiên cứu đưa ra kết quả ảnh hưởng của ROS lên sinh lý sinh sản và quá trình điều trị hỗ trợ sinh sản nhưng những kết quả này vẫn còn đang tranh luận và ảnh hưởng của ROS đến kết quả một chu kỳ điều trị IVF vẫn chưa rõ ràng [4]. Một vài nghiên cứu hiện nay đang tập trung vào nồng độ ROS trong dịch môi trường bao quanh noãn ảnh hưởng như thế nào đến chất lượng noãn và phôi [1].

Dịch nang là một vi môi trường đóng một vai trò quan trọng cho quá trình trưởng thành của noãn và sự phát triển của phôi [1][5][6][7]. Dịch nang còn là môi trường biến dưỡng chứa các hormone steroid, các yếu tố tăng trưởng, các cytokine, tế bào hạt và bạch cầu [8]. Ngoài ra, rất nhiều chất chống oxy hóa đã được tìm thấy trong dịch bao quanh noãn bao gồm vitamin E, carotene, ascorbate, cysteamine, taurine, hypotaurine, transferrin, thioredoxin, và dithiothreitol, nhằm hỗ trợ cho sự tồn tại và trưởng thành của noãn.

ROS có thể được tạo ra từ môi trường biến dưỡng xung quanh noãn do sự phosphoryl hóa oxy hóa, từ các enzyme NADPH oxydase

và xanthine oxidase [8]. Ngoài ra các steroid hormone, các yếu tố tăng trưởng, các cytokine tế bào hạt, và bạch cầu hiện diện trong vi môi trường này cũng làm tăng nồng độ ROS. Từ đó có thể suy đoán rằng vi môi trường trong nang noãn và các điều kiện trong đó có một vai trò quan trọng trong sự phát triển của tế bào noãn. Nồng độ ROS tăng liên quan đến chất lượng noãn kém, tỷ lệ thụ tinh thấp và phôi phát triển xấu [2][9]. Nồng độ ROS trong dịch nang noãn ở những phụ nữ đã từng điều trị IVF thành công cao hơn có ý nghĩa so với nồng độ ROS trong dịch nang noãn của những phụ nữ không điều trị IVF [2][10]. Điều này cho thấy khi sự mất cân bằng giữa các gốc oxy hóa và chất chống oxy hóa có thể dẫn đến sự xáo trộn trong khuynh hướng sinh sản tự nhiên của nữ giới. Khi nồng độ ROS trong dịch nang giảm và nồng độ các chất chống oxy hóa tăng lên sẽ làm tăng khả năng phát triển của phôi. Tuy nhiên, những kết quả trên vẫn còn nhiều bàn luận [7][11].

Tại Việt Nam, hiện nay vẫn chưa có nghiên cứu nào về nồng độ ROS trong dịch nang ảnh hưởng thế nào đến chất lượng phôi trong thụ tinh ống nghiệm. Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này để tìm mối tương quan giữa nồng độ ROS trong dịch nang và chất lượng phôi nhằm cung cấp thêm các dự đoán cơ hội mang thai hoặc giải thích một số nguyên nhân cơ bản cho một số bệnh lý sinh sản ở nữ giới.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu tiến cứu. Nghiên cứu được thực hiện trên 151 chu kỳ xin-cho noãn. Bệnh nhân được chuyển phôi tươi hoặc trữ ngày 3 sau khi thực hiện kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI).

Thời gian tiến hành từ tháng 08/2014 đến tháng 01/2015 tại Đơn vị hỗ trợ sinh sản Mỹ Đức, bệnh viện Đa khoa Mỹ Đức.

Tổng cộng 151 bệnh nhân cho noãn được KTBT, sử dụng phác đồ GnRH antagonist. Bệnh nhân được tiếp tục theo dõi bằng siêu âm nang noãn để đánh giá và điều chỉnh liều. Sau đó bệnh nhân được kích thích trưởng thành noãn bằng liều GnRH agonist Dipherelline 0,2mg. Chọc hút noãn

được tiến hành 36 giờ sau tiêm liều Dipherelline. Chúng tôi ghi nhận các đặc điểm của bệnh nhân: độ tuổi, chỉ số AMH, chỉ số BMI. Trong quá trình chọc hút noãn, dịch nang từ mỗi buồng trứng được thu nhận riêng biệt. Phương pháp ICSI được dùng để thụ tinh tinh trùng và noãn trưởng thành sau khi chọc hút khoảng 4 giờ. Sau 16-18 giờ kể từ khi ICSI, tiến hành kiểm tra thụ tinh. Việc đánh giá phôi ngày 3 được thực hiện tại thời điểm 66 giờ \pm 2 sau ICSI theo tiêu chuẩn của đồng thuận Alpha năm 2011 [12].

Sau quá trình chọc hút noãn, dịch nang thu nhận từ mỗi buồng trứng được ly tâm ở tốc độ 500G/10phút và thu nhận dịch nổi. Nồng độ ROS trong dịch nang được đo bằng phương pháp phát quang hóa học (Chemiluminescence) sử dụng đầu dò luminol 5mM (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione). Tiến hành đo chứng dương và chứng âm một lần duy nhất (lặp lại 2 lần và lấy giá trị trung bình) trước khi tiến hành đo mẫu dịch nang. Các tube chứa mẫu được đặt vào trong máy đo phát quang hóa học (Luminometer) Glomax 20/20 (Promega, Mỹ).

Mẫu chứng âm: 10 μ l luminol 5mM trong 400 μ l PBS 1X.

Mẫu chứng dương: 10 μ l luminol 5mM trong 400 μ l PBS 1X và cho vào 50 μ l hydrogen peroxide (H₂O₂).

Mẫu dịch nang: 10 μ l luminol 5mM trong 400 μ l dịch nang.

Các mẫu dịch nang từ mỗi buồng trứng của từng bệnh nhân sẽ được tiến hành đo 2 lần và lấy giá trị trung bình. Giá trị ROS toàn phần (nội bào, ngoại bào và tất cả các gốc tự do) từ mỗi buồng trứng được tính bằng số photon trong từng phút (CPM) hoặc RLU/s [13].

Các yếu tố đánh giá kết quả: nồng độ ROS và tỉ lệ phôi tốt ngày 3.

Xử lý số liệu: sử dụng thống kê tương quan Pearson để tìm mối tương quan giữa nồng độ và tỉ lệ tạo phôi tốt ở từng buồng trứng.

3. Kết quả

Chúng tôi thu thập được tổng cộng 301 mẫu dịch nang từ 151 phụ nữ cho noãn trong đó có 150 mẫu dịch nang từ buồng trứng trái và 151 mẫu dịch nang từ buồng trứng phải.

Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Bảng 1: Đặc điểm bệnh nhân

Đặc điểm (N=151)	Trung bình
Tuổi	27,4 ± 4,7
BMI	21,6 ± 3,6
AMH	7,2 ± 3,5

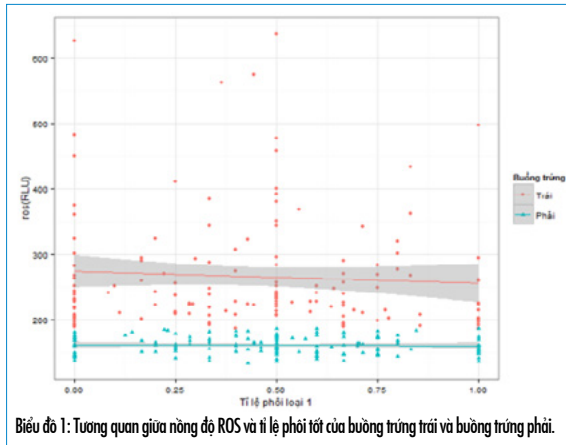
Tương quan giữa nồng độ ROS dịch nang và các thông số tử noãn và phôi

Bảng 2: Tương quan giữa nồng độ ROS và các thông số tử noãn và phôi

	Buồng trứng trái (n=150)	Buồng trứng phải (n=151)	Giá trị P
Số lượng noãn chọc hút	9,5 ± 5,2	9,6 ± 4,6	P>0,05
Tỉ lệ noãn trưởng thành (%)	88,3	87,0	P>0,05
Tỉ lệ thụ tinh (%)	81,2	83,0	P>0,05
Tỉ lệ phân chia (%)	83,1	77,0	P>0,05
Phôi loại 1 ngày 3 (%)	44,0	47,2	P>0,05
Nồng độ ROS (RLU)	219,8±89,5	208,7±69,7	P>0,05

Nồng độ ROS đo được giữa hai buồng trứng không có sự khác biệt thống kê: buồng trứng trái 219,8±89,5 (RLU/s) và buồng trứng phải 208,7±69,7 (RLU/s).

Tương quan giữa tỉ lệ phôi tốt và nồng độ ROS



Hệ số tương quan giữa tỉ lệ phôi loại 1 ngày 3 với nồng độ ROS dịch nang ở mỗi bên buồng trứng phải và trái lần lượt là -0,159 (P=0,051) và -0,011 (P=0,89).

4. Bàn luận

ROS có một vai trò quan trọng trong chức năng sinh lý của hệ sinh sản nữ, trong hiếm muộn và cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến kết quả của quá trình điều trị thụ tinh

trong ống nghiệm [7][14]. Tuy nhiên, sự ảnh hưởng của nồng độ ROS trong dịch nang lên kết quả điều trị IVF vẫn còn đang được tranh luận.

Trong khi Das đã đưa ra mối tương quan giữa các nồng độ ROS và chất lượng phôi thì cả hai tác giả Oral và Jozwick đều không tìm thấy mối tương quan đáng kể giữa kết quả điều trị thụ tinh ống nghiệm và nồng độ ROS [2][15][16]. Tương tự như kết quả của chúng tôi, Jozwick cho thấy không có sự tương quan giữa nồng độ lipid hydroperoxide và kết cục điều trị IVF bao gồm tỷ lệ thụ tinh và tỉ lệ mang thai [16].

Kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi ở nhóm đối tượng cho noãn là không tìm thấy mối tương quan giữa nồng độ ROS trong dịch nang và chất lượng phôi ngày 3: hệ số tương quan giữa tỉ lệ phôi loại 1 ngày 3 với nồng độ ROS dịch nang ở mỗi bên buồng trứng phải và trái lần lượt là -0,159 (P=0,051) và -0,011 (P=0,89). Các chỉ số về tỉ lệ noãn trưởng thành, tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ phân chia và tỉ lệ tạo phôi tốt không có khác biệt giữa 2 buồng trứng. Tuy nhiên, chúng tôi nhận thấy ở buồng trứng phải có tỉ lệ tạo phôi tốt cao hơn và nồng độ ROS thấp hơn so với buồng trứng trái. Nghiên cứu của tác giả Fukuda cho thấy ở cả nhóm đối tượng phụ nữ có khả năng sinh sản bình thường và phụ nữ vô sinh thì tần suất rụng trứng cao hơn ở buồng trứng phải, cũng như kết quả điều trị IUI hay IVF đều cao hơn khi noãn đến từ buồng trứng phải so với noãn thu được từ buồng trứng trái [17].

5. Kết luận

Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam đánh giá sự tương quan giữa nồng độ ROS trong dịch nang và tỷ lệ phôi tốt. Mặc dù không có sự tương quan giữa nồng độ ROS và tỷ lệ phôi tốt ở từng buồng trứng trong nghiên cứu của chúng tôi, nhưng kết quả cũng cho thấy ở buồng trứng phải có nồng độ ROS thấp hơn và tỷ lệ phôi tốt cao hơn so với buồng trứng trái. Nghiên cứu này mở ra hướng nghiên cứu tiếp theo với thiết kế chặt chẽ và cỡ mẫu lớn hơn để có thể kết luận rõ ràng mối tương quan giữa ROS và chất lượng phôi.

Tài liệu tham khảo

- [1] Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S (2012) The effects of oxydative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10:49.
- [2] Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN et al (2006) Reactive oxygen species level in follicular fluid—embryo quality marker in IVF? *Human Reproduction* 21:2403–2407
- [3] Moolenaar, L.M., Mohiuddin, S., Munro Davie, M., Merrilees, M.A., Broekmans, F.J., Mol, B.W., Johnson, N.P., 2013 High live birth rate in the subsequent IVF cycle after first-cycle poor response among women with mean age 35 and normal FSH. *Reproductive Biomed Online* 27, 362–366.
- [4] Fujimoto, V.Y., Bloom, M.S., Huddleston, H.G., Shelley, W.B., Ocque, A.J., Browne, R.W., 2011 Correlations of follicular fluid oxidative stress biomarkers and enzyme activities with embryo morphology parameters during in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 96, 1357–1367
- [5] Ho HN, Wu MY, Chen SU, Chao KH, Chen CD, Yang YS (1997) Total antioxidant status and nitric oxide do not increase in peritoneal fluids from women with endometriosis. *Human Reproduction* 12(12):2810–2815
- [6] Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS (1998) Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Human Reproduction* 13(4):998–1002
- [7] Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P (2003) Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Human Reproduction* 18(11):2270–2274
- [8] Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ et al (2004) Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertility and Sterility* 81:973–976
- [9] Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P (2009) Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7:40
- [10] Jana SK, K NB, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K (2010) Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. *Reproductive Toxicology* 29:447–51
- [11] Appasamy M, Jauniaux E, Serhal P, Al-Qahtani A, Grome NP, Muttukrishna S (2008) Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. *Fertility and Sterility* 89:912–921
- [12] Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011) The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction* 26(6):1270–1283
- [13] Agarwal A, Allamaneni SS, Said TM (2004) Chemiluminescence technique for measuring reactive oxygen species. *Reproductive Biomed Online* 9(4):466–468
- [14] Agarwal A, Gupta S, Sharma R (2005) Oxidative stress and its implications in female infertility—a clinician's perspective. *Reproductive Biomed Online* 11(5):641–650
- [15] Oral O, Kutlu T, Aksoy E, et al The effects of oxidative stress on outcomes of assisted reproductive techniques. *Journal of Assisted Reproduction Genetics* 2006; 23:81–5
- [16] Jozwik M, Wolczynski S, Jozwik M, Szamatowicz M Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Molecular Human Reproduction* 1999; 5:409–13
- [17] Misao Fukuda, Kiyomi Fukuda, Claus Yding Andersen, Anne Grete Byskov Right-sided ovulation favours pregnancy more than left-sided ovulation. *Human Reproduction* 2000; 15 (9):1921–1926