

KẾT QUẢ CẢI TIẾN QUI TRÌNH NUÔI TRƯỞNG THÀNH NOÃN TRONG ỐNG NGHIỆM (IVM)

Hà Thanh Quế^(1,2), Hồ Mạnh Tường^(1,2), Nguyễn Thị Thu Lan^(1,2), Lâm Anh Tuấn⁽¹⁾, Vương Thị Ngọc Lan⁽³⁾

(1) IVFAS, Bệnh viện An sinh, (2) CGRH, Khoa Y, Đại học Quốc gia TP HCM, (3) Đại học Y Dược TP HCM

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Kỹ thuật IVM mang lại nhiều lợi ích như an toàn, thuận tiện và giảm chi phí điều trị. Hiệu quả của kỹ thuật là vấn đề được quan tâm trong nhiều năm qua. Cải thiện hiệu quả để tăng tỉ lệ có thai lâm sàng và tỉ lệ làm tổ của phôi là vấn đề được nhiều nhà khoa học và lâm sàng quan tâm.

Đây là một nghiên cứu hồi cứu nhằm đánh giá hiệu quả của việc cải tiến đồng bộ qui trình IVM nhằm nâng cao tỉ lệ thành công.

Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu do Trung tâm nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe sinh sản (CGRH), Khoa Y Đại học Quốc gia TP HCM chủ trì và phối hợp thực hiện với đơn vị IVFAS, Bệnh viện An Sinh. Từ năm 2010 đến năm 2012 chúng tôi tiến hành cải tiến nhiều qui trình kỹ thuật của IVM. Số liệu và các thông số điều trị được ghi nhận từ hồ sơ và cơ sở dữ liệu của đơn vị.

Kết quả: Tỉ lệ thai lâm sàng tăng dần từ 25,7% (2010) đến 29,9% (2011) và 38,1% (2012). Tỉ lệ làm tổ của phôi cũng tăng dần từ 12,1% (2010) đến 16,5% (2011) và 17,3% (2012). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh số liệu năm 2012 với số liệu 2010.

Kết luận: Với việc cải tiến đồng bộ các qui trình kỹ thuật, tỉ lệ thành công của IVM đã tăng đáng kể và đạt tương đương với kết quả chung của các trường hợp TTTON có kích thích buồng trứng.

Abstract

The treatment results of the modification of technical

protocols in In-vitro Maturation (IVM) of oocytes

Introduction: In-vitro maturation has many advantages such as safety, convenience, reduced treatment cost. Yet, the efficacy of the technique has been most concerned for years. The improvement of technique efficacy in terms of pregnancy and implantation rates have attracted many clinicians and scientists.

This is a retrospective study to verify the improvement of IVM results after the modifications of different treatment protocols in IVM.

Materials & methods: The study were conducted by CGRH, School of Medicine, VNU-HCM. Data were collected at IVFAS, An Sinh Hospital. Treatment protocols were modified consecutively from late 2010 to 2012. Data were retrieved from patients' files and patients database at IVFAS.

Results: The treatment results showed that clinical pregnancy rate increased gradually through years from 25.7% (2010) to 29.9% (2011) and 38.1% (2012). The implantation rates also increased from 12.1% (2010) to 16.5% (2011) and 17.3% (2012). The differences are statistically significant when compared data of the year 2012 and 2010.

Conclusion: The modification of several important procedures in IVM treatment resulted in improvement of pregnancy rates. The clinical pregnancy rate of IVM program is now comparable to that of conventional, stimulated IVF program.

Đặt vấn đề

Kỹ thuật IVM áp dụng thành công lần đầu tiên ở Việt nam vào năm 2006. Chúng tôi đã thành công ngay từ trường hợp IVM đầu tiên với kết quả là 2 trẻ song sinh vào năm 2007. Từ đó đến nay, kỹ thuật IVM tiếp tục phát triển mạnh ở Việt nam. Tuy nhiên, giai đoạn trước năm 2010, tỉ lệ có thai sau IVM thường không cao, chỉ bằng khoảng 80% so với phác đồ TTTON tiêu chuẩn. Nhưng kể từ năm 2010 đến nay, những nghiên cứu cải tiến liên tục nhiều khâu trong toàn bộ qui trình IVM đã góp phần giúp tỉ lệ có thai của chương trình IVM gia tăng đáng kể - tương đương hoặc cao hơn so

với TTTON tiêu chuẩn tại trung tâm. Hiện tại, đây là kỹ thuật điều trị đầu tay của chúng tôi đối với các trường hợp phụ nữ có buồng trứng dạng đa nang (PCO) và có chỉ định TTTON. Tính tới thời điểm này, tại trung tâm đã có hơn 1.000 trường hợp IVM đã được thực hiện và có trên 400 em bé đã ra đời khỏe mạnh từ kỹ thuật này.

Các ưu điểm chính của kỹ thuật IVM bao gồm:

(1) Loại trừ hoàn toàn nguy cơ hội chứng quá kích buồng trứng (OHSS), ngay cả khi thực hiện trên đối tượng nguy cơ cao.

(2) Giảm gần 50% chi phí điều trị do giảm chi phí thuốc, siêu âm, xét nghiệm, tái khám.

(3) Giảm thời gian điều trị và thuận tiện cho bệnh nhân.

Nhiều báo cáo trên thế giới cho thấy kết quả bước đầu của IVM đem lại nhiều tiềm năng ứng dụng lâm sàng. Tuy nhiên, vấn đề gặp phải ở phần lớn các trung tâm TTTON là tỷ lệ thụ tinh và mang thai thấp hơn so với chương trình TTTON tiêu chuẩn. Hiện nay theo chúng tôi biết, vẫn chưa có một nghiên cứu ngẫu nhiên có nhóm chứng nào so sánh hiệu quả điều trị bằng IVM với các phương pháp TTTON thông thường, mà chỉ có duy nhất một nghiên cứu bệnh chứng vào năm 2002 của trường Đại học McGill, Montreal, Canada. Nghiên cứu này đã chứng minh tỷ lệ thành của IVM chỉ đạt được gần một nửa kết quả của phương pháp TTTON thông thường. Trong khi đó, nhiều báo cáo trên thế giới cũng cho kết quả không mấy khả quan với IVM. Vì vậy, vấn đề cần đặt ra ở đây là làm cách nào giúp gia tăng tỷ lệ thành công của IVM ngang bằng hoặc hơn với các phương pháp TTTON khác (IVF/ICSI), để đáp ứng với nhu cầu thực tế ngày càng tăng cao khi IVM dần được ứng dụng rộng rãi. Do đó, việc cải tiến và thay đổi một số công đoạn trong qui trình là hết sức cần thiết nếu mong muốn cải thiện kết quả thu được.

Từ cuối năm 2010, chúng tôi đã bắt đầu nghiên cứu cải tiến các qui trình trong kỹ thuật IVM tại Đơn vị IVFAS, Bệnh viện An Sinh. Trong năm 2011, chúng tôi từng bước cải tiến nhiều qui trình kỹ thuật của IVM. Năm 2012 là năm chúng tôi áp dụng thường qui toàn bộ qui trình IVM mới. Sau 2 năm cải tiến qui trình chúng tôi đã ghi nhận sự cải thiện tỉ lệ có thai. Tỉ lệ có thai sau IVM hiện nay tại IVFAS đạt tương đương với tỉ lệ có thai chung của thụ tinh trong ống nghiệm tiêu chuẩn.

Mục tiêu nghiên cứu

Đánh giá hiệu quả cải tiến tỉ lệ có thai trước, trong và sau khi cải tiến các qui trình kỹ thuật của IVM tại Đơn vị IVFAS từ năm 2010 đến năm 2012.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Hồi cứu

Chúng tôi thống kê các thông số và kết quả điều trị bằng kỹ thuật IVM tại IVFAS trong 3 năm từ 2010 đến 2012. Số liệu được ghi nhận từ dữ liệu thống kê của Đơn vị IVFAS. Các số liệu của các chu kỳ điều trị IVM từ 2010 đến 2012 tại Đơn vị IVFAS, Bệnh viện An Sinh từ 2010 đến 2012 được ghi nhận. Kết quả thu được chia thành vào 3 giai đoạn: (1) giai đoạn thực hiện IVM theo phác đồ cũ (2010), (2) IVM bắt đầu có sự cải tiến tuần tự nhiều bước trong qui trình IVM (2011), (3) giai đoạn ứng dụng thường qui qui trình đã cải tiến (2012).

Các yếu tố đánh giá kết quả: Số noãn thu được, số

noãn trưởng thành, tỉ lệ thụ thai dương tính, tỷ lệ thai lâm sàng, tỷ lệ làm tổ của phôi.

Qui trình IVM cơ bản được thực hiện như mô tả sau đây. Vào ngày đầu vòng kinh, bệnh nhân được siêu âm để loại trừ các nang cơ năng. Đến ngày thứ 8 hoặc 9 của kỳ kinh, tiêm 100 đơn vị FSH tái tổ hợp (Puregon) mỗi ngày, trong vòng 3 ngày. Tiêm 10.000 đơn vị hCG (Pregnyl) vào ngày tiếp theo, sau khi siêu âm. Tiến hành chọc hút các nang nhỏ ở buồng trứng để thu noãn, 36 đến 38 giờ sau tiêm hCG. Thụ tinh trùng và noãn trưởng thành bằng phương pháp ICSI. Chuyển phôi vào giai đoạn phôi ngày 2 hoặc ngày 3. Hỗ trợ giai đoạn hoàng thể kết hợp progesterone đặt âm đạo và estradiol đường uống. Xét nghiệm máu định lượng beta hCG thụ thai được thực hiện 14 ngày sau chuyển phôi. Thai lâm sàng được xác định khi phát hiện túi thai trên siêu âm 3 tuần sau khi thụ thai.

Các bước cải tiến qui trình IVM trong năm 2010 và 2011 bao gồm:

- Chuẩn bị môi trường nuôi trưởng thành noãn.
- Thời điểm đánh giá độ trưởng thành noãn, phân loại noãn dựa vào hình thái tại thời điểm thu nhận.
- Thời điểm thực hiện kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI).
- Cách chọn phôi để chuyển vào buồng tử cung dựa vào các yếu tố kết hợp: thời điểm trưởng thành, phân loại noãn theo hình dạng, đặc điểm hình dạng phôi vào thời điểm đánh giá.
- Thời gian 2010-2012 cũng là thời gian chúng tôi từng bước xây dựng và áp dụng hệ thống quản trị chất lượng toàn bộ.

• Chuẩn bị môi trường nuôi trưởng thành noãn

Bổ sung vào 10ml môi trường IVM final (Origio): 1ml huyết thanh của bệnh nhân, 100μl môi trường đã pha FSH (75mIU/ml), 10μl môi trường đã pha hCG (100mIU/ml). Sau đó môi trường sẽ được lọc liệt trùng và chuẩn bị các giọt cấy trong đĩa cấy phủ dầu. Từ cuối năm 2010, chúng tôi pha bổ sung thêm 300μl môi trường pha GH (10mcg/ml) khi chuẩn bị môi trường nuôi trưởng thành noãn.

• Thời điểm đánh giá trưởng thành

Theo qui trình nuôi cấy IVM từ trước đến năm 2010, noãn chỉ được đánh giá trưởng thành một lần duy nhất trong khoảng 26-28 giờ sau cấy. Từ cuối năm 2010, chúng tôi thực hiện đánh giá trưởng thành noãn tại 3 thời điểm: ngay thời điểm chọc hút; sau đó, noãn chưa trưởng thành sẽ được nuôi cấy 2 giờ trong môi trường trung gian LAG và tiếp tục nuôi cấy trong môi trường nuôi trưởng thành noãn trong điều kiện trong điều kiện 6% CO₂, 5% O₂, 89% N₂. Kiểm tra

trưởng thành nở lần hai vào 20 giờ sau chọc hút và lần 3 vào 25 giờ sau chọc hút. Có thể sử dụng kính hiển vi đảo ngược ở độ phóng đại 200 lần để xác định chính xác hơn về giai đoạn trưởng thành.

• Thời điểm thực hiện tiêm tinh trùng

Năm 2010 trở về trước, ICSI được thực hiện 1 lần sau khi kiểm tra trưởng thành noãn. Thời điểm thực hiện ICSI dao động từ 2-6 giờ sau khi kiểm tra trưởng thành. Trong phác đồ cải tiến, ICSI có thể được thực hiện vào 3 thời điểm, 2-3 giờ sau kiểm tra trưởng thành noãn: 2-3 giờ sau chọc hút, 22-23 giờ sau chọc hút và 27-28 giờ sau chọc hút.

• Nuôi cấy và theo dõi noãn, phôi

Từ năm 2011, noãn được phân độ thành 4 nhóm ngay từ lúc chọc hút và thông tin về loại noãn được tiếp tục sử dụng trong quá trình theo dõi thụ tinh và sự phát triển của phôi. Do ICSI có thể được thực hiện vào 2 thời điểm khác nhau, nên theo phác đồ cải tiến, chúng tôi có thể có phôi phát triển ở những giai đoạn khác nhau và hơn kém nhau khoảng 1 ngày. Một phôi được theo dõi có 3 thông số cơ bản: phân loại noãn, thời điểm trưởng thành và đặc điểm phôi.

• Chọn lựa phôi để chuyển vào buồng tử cung

Phôi được chọn lựa dựa vào cả 3 tiêu chí đánh giá: phôi được ưu tiên chọn là các phôi xuất phát từ noãn loại tốt, thời điểm noãn trưởng thành sớm và chất lượng phôi tốt. Vào ngày chuyển phôi, phôi được cấy vào buồng tử cung có thể bao gồm phôi ở 2 giai đoạn ngày 3 (phôi từ noãn trưởng thành sớm) và phôi ngày 2.

Kết quả

Các kết quả chính được mô tả trong bảng 1.

Từ 2010 đến 2012 có 1.007 chu kỳ IVM được thực hiện tại IVFAS, bao gồm 255 chu kỳ năm 2010, 346 chu kỳ 2011 và 406 chu kỳ 2012. Tất cả các trường hợp chọc hút đều có noãn. Số noãn chọc hút trung bình mỗi trường hợp không có sự khác biệt giữa

các năm, số noãn trung bình thu được là khoảng 15 noãn. Số noãn này nhiều hơn số noãn trung bình thu được của các trường hợp TTON qui chuẩn. Tỷ lệ noãn trưởng thành cũng không có sự khác biệt giữa các năm mặc dù cách đánh giá trưởng thành noãn khác nhau. Tỷ lệ noãn thụ tinh bình thường (hình ảnh 2 tiền nhân) có xu hướng tăng đều hàng năm, tuy nhiên, sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê khi so sánh số liệu năm 2012 so với 2010 (75,1% so với 67%, $p < 0,05$). Trong các chu kỳ TTON qui chuẩn, có kích thích buồng trứng, tỷ lệ noãn không trưởng thành cũng dao động khoảng 20%. Do đó, với phác đồ IVM hiện tại, chúng tôi đã đạt được một tỷ lệ noãn trưởng thành rất tốt. Với số noãn thu được trung bình là khoảng 15 noãn và tỷ lệ trưởng thành là 75%, chúng tôi có được trung bình hơn 10 noãn trưởng thành cho một lần thực hiện IVM.

Tỷ lệ thử thai dương tính (bê-ta hCG trên 25mIU/ml vào 14 ngày sau chuyển phôi) tăng dần qua các năm và có ý nghĩa thống kê, 31,1% (2010), 39,1% (2011), 47,7% (2012). Tỷ lệ thai lâm sàng cũng tăng dần qua từng năm 25,7% (2010), 29,9% (2011), 38,1% (2012). Tuy nhiên, sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê khi so sánh kết quả giữa 2 năm 2010 và 2012. Số phôi chuyển trung bình cho mỗi bệnh nhân có xu hướng giảm nhẹ, nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ làm tổ của phôi cũng tăng tương ứng qua từng năm 12,1% (2010), 16,5% (2011), 17,3% (2012). Tương tự, sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê khi so sánh số liệu 2012 và 2010.

Như vậy, nói chung các thông số quan trọng của chương trình như tỷ lệ có thai và tỷ lệ làm tổ của phôi đều tăng rõ rệt trong thời gian từ 2010 đến 2012 và tăng khoảng 50%.

Bàn luận

Trong vòng 2 năm từ 2010 đến 2012, với cải tiến tuần tự các qui trình kỹ thuật của phác đồ nuôi trưởng thành noãn trong ống nghiệm (IVM), chúng tôi đã tăng được tỷ lệ thành công lên đáng kể, tăng thêm khoảng 50%. Tuy nhiên, cũng trong thời gian trên, tỷ lệ có thai của TTON tiêu chuẩn cũng tăng lên hơn 20% theo các số liệu thu được tại đơn vị. Với việc áp dụng và cải tiến thành công kỹ thuật IVM, kết hợp với chương trình quản trị chất lượng hiệu quả và phù hợp, Chúng tôi đã làm gia tăng đáng kể kết quả điều trị, bên cạnh đó làm giảm đáng kể nguy cơ OHSS của các bệnh nhân buồng trứng đa nang, đồng thời giảm tỷ lệ biến chứng OHSS chung của toàn bộ chương trình điều trị, và chi phí điều trị cũng được giảm rõ rệt.

Bảng 1. Kết quả kỹ thuật IVM qua các năm 2010 - 2012

Các chỉ số	Giai đoạn 1 (2010)	Giai đoạn 2 (2011)	Giai đoạn 3 (2012)
Số chu kỳ	255	346	406
Số noãn chọc hút	4053	5580	5896
Số noãn chọc hút trung bình	15,9 ± 9,7	16,1 ± 11,1	14,5 ± 9,7
Số noãn trưởng thành	2639	3756	3984
Tỷ lệ noãn trưởng thành	65,1%	67,3%	67,6%
Tỷ lệ thụ tinh bình thường	67,0%	71,8%	75,1%
Tỷ lệ phôi phân chia	95,8%	93,2%	93,8%
Số phôi chuyển trung bình	3,5 ± 1,5	3,5 ± 1,4	3,4 ± 1,3
Tỷ lệ beta-HCG (+)	31,1%	39,1%	47,7%
Tỷ lệ thai lâm sàng	25,7%	29,9%	38,1%
Tỷ lệ làm tổ	12,1%	16,5%	17,3%

Bảng 2. Kết quả của các chu kỳ IVM tại IVFAS (Việt nam, số liệu chung 3 năm 2010-2012) so với báo cáo khác (theo Marcus W, 2006) ⁽⁴⁾

Tác giả	Cỡ mẫu	Số noãn trung bình	Tỷ lệ trưởng thành % (thời gian nuôi cấy - giờ)	Tỷ lệ thụ tinh (%)	Tỷ lệ phôi phân chia (%)	Số phôi chuyển	Tỷ lệ thai lâm sàng (%)	Tỷ lệ làm tổ (%)
Cha 2000	94	13,6	62,2 (48)	68	88	4,9	27,1	6,9
Chian 2000	13	7,8	78,2/85,2 (24/48)	90,7	94,9	2,8	38,5	16,6
Child 2001	53 (PCO)	10	76 (48)	76,3	94,8	3,3	23,1	8,9
	68 (PCOS)	11,3	77(48)	79,3	91,3	3,2	29,9	9,6
Mikkelsen 2001	12	6,8	44 (24)	69	64	1,7	0	0
	24	6,5	59 (24)	70	56	1,8	33	21,6
Child 2002	107	10,3	76 (48)	78	74	3,2	21,5	9,5
Lin 2003	35	21,9	43,2/76,5 (24/48)	75,8	89,4	3,8	31,4	9,7
	33	23,1	39,2/71,9 (24/48)	69,5	88,1	3,8	36,4	11,3
LeDu 2005	45	11,4	54,2/63(24/48)	70,1	96,3	2,5	22,5	10,9
Soderstrom-Anttila 2005	20 (PCO)	9,3	54,9 (30-48)	35 (IVF)	85,7	1,7	22,2	13,3
				72,4 (ICSI)	61,9	2	0	0
	28 (PCOS)	14,3	58,2 (30-48)	43,8 (IVF)	82,5	1,7	52,9	34,5
				78,4 (ICSI)	70,9	1,8	22,2	12,5
Cha 2005	203	15,5	-	-	-	5	21,9	5,5
Việt nam 2013	1007	15,4	66,8 (20-25)	71,8%	94,1%	3,4	32,1	15,7

So sánh với kết quả kỹ thuật IVM trên y văn (Bảng 2.)

Nhiều báo cáo và nghiên cứu đã được tiến hành nhằm đánh giá hiệu quả mà IVM đem lại. Child và cs. (2001)⁽¹⁾ trực tiếp so sánh kết quả của 107 chu kỳ IVM với 107 chu kỳ TTTON ở phụ nữ PCOS và PCO tương đương nhau về độ tuổi. Kết quả khảo sát cho thấy số noãn thu được, tỷ lệ trưởng thành, tỷ lệ thụ tinh, và tỷ lệ phân chia cao hơn đáng kể so với nhóm TTTON thông thường. So sánh các thông số điều trị giữa hai nhóm này cho thấy, có khoảng 76% noãn trưởng thành thu được sau nuôi cấy IVM, trong khi đó ở nhóm TTTON thông thường tỷ lệ này đạt khoảng 80% (12/15). Tương tự, tỉ lệ thụ tinh lần lượt đạt 78,2% với IVM, và 77,5% với TTTON thông thường; tỉ lệ phôi phân chia là 95,1% với IVM và 92,5% với TTTON thông thường; tỉ lệ thai lâm sàng không khác biệt rõ rệt giữa hai nhóm khảo sát này, mặc dù kết quả có khuynh hướng thấp hơn ở nhóm IVM (21,5% của IVM so với 33,7% của TTTON thông thường). Tỉ lệ làm tổ của phôi ở nhóm TTTON thông thường lại cao hơn IVM (17,1% so với 9,5%).

Trong một nghiên cứu khác, Cha và cs (2000)⁽²⁾ báo cáo tỉ lệ thai lâm sàng đạt 27,1% (chuyển 4,9 phôi cho mỗi lần chuyển) trong 94 chu kỳ IVM ở bệnh nhân PCO và PCOS, và đồng thời đạt 37,5% (chuyển 5 phôi cho mỗi lần chuyển) trong 43 chu kỳ TTTON thông thường ở bệnh nhân PCO và PCOS. Kết quả IVM vẫn cho thấy tính hiệu quả của chương trình này so với TTTON thông thường khi xét tới số lượng noãn trưởng thành thu được, tỷ lệ thụ tinh, phân chia và thai lâm sàng. Ngoài ra, nguy cơ hội chứng OHSS giảm trong IVM so với TTTON thông thường.

Tìm hiểu các báo cáo về kết quả IVM trong dữ liệu y văn cho thấy, báo cáo của chúng tôi hiện là một trong những báo cáo với số liệu lớn nhất về chương trình IVM (khảo sát trên 1007 chu kỳ IVM), với tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ làm tổ tương đương và cao hơn so với các đa số các báo cáo khác với cỡ mẫu tương đối lớn như Child và cs (2001, 2005) với cỡ mẫu lần lượt 121, 107; và Cha và cs (2005)⁽³⁾ với 203 chu kỳ IVM (Bảng 2). Với kết quả này, Việt Nam có thể được xem là một trong những nước thực hiện IVM thành công nhất trên thế giới hiện nay. Điều này cũng đã được các đồng nghiệp thế giới ghi nhận khi chúng tôi báo cáo tại các hội nghị khu vực và quốc tế.

Thời điểm đánh giá trưởng thành noãn và thời điểm tiêm tinh trùng vào noãn

Như chúng ta đã biết, một trong những đặc điểm của chu kỳ IVM là sự trưởng thành không đồng bộ của các noãn và cơ chế gây trưởng thành noãn trong IVM chưa được hiểu rõ. Xác định sự xuất hiện cũng như thời gian trưởng thành noãn rất quan trọng cho các ứng dụng lâm sàng vì có thể giúp sắp xếp hoặc lên kế hoạch cho việc thụ tinh nhằm đạt kết quả tốt nhất. Hơn nữa, xác định thời điểm trưởng thành noãn là một trong những yếu tố rất quan trọng, bởi thời gian chính xác để tiêm tinh trùng vào tế bào noãn giúp đạt hiệu quả thụ tinh tối ưu, mà việc gia tăng tỷ lệ thụ tinh đồng nghĩa với việc gia tăng số lượng phôi có được, cũng như gia tăng cơ hội có thai của bệnh nhân.

Tác nhân in vitro và in vivo đều ảnh hưởng lên khả năng tăng trưởng, phát triển, trưởng thành về nhân và tế bào chất của noãn. Trong cơ thể sống,

sự phát triển toàn diện của một nang noãn rất phức tạp, yêu cầu hàng loạt các chuỗi tương tác giữa tế bào noãn và các tế bào soma bao quanh chúng. Các tương tác này ảnh hưởng chủ yếu trong quá trình sinh noãn, và rất có khả năng ảnh hưởng đến tiềm năng phát triển thành phôi sau khi noãn này thụ tinh. Trước đây, một số quan niệm cho rằng tế bào noãn chỉ đơn thuần nhận các tín hiệu trưởng thành từ các tế bào soma một cách thụ động, nhưng nhiều nghiên cứu sau này lại khẳng định có sự trao đổi thông tin liên lạc qua lại giữa hai loại tế bào này⁽⁵⁾.

Mặc dù noãn được cho là trưởng thành về mặt phân bào (thể hiện bởi việc tổng xuất thể cực), nhưng nếu bào tương noãn không hoàn tất quá trình trưởng thành sẽ dẫn đến việc thiếu hụt một số yếu tố cần thiết có nguồn gốc từ mẹ; mà chính các yếu tố này lại có vai trò quan trọng trong quá trình thụ tinh, hình thành tiền nhân, và phát triển phôi về sau⁽⁶⁾. Chất lượng noãn chủ yếu phụ thuộc vào sự trưởng thành của tế bào chất. Tế bào chất chuẩn bị cho quá trình thụ tinh và quá trình phát triển phôi ở giai đoạn sớm lại liên quan đến với sự trưởng thành nhân. Nếu trưởng thành tế bào chất không hoàn thiện, tế bào noãn sẽ không thể thụ tinh và phát triển thành công^(7,8). Chính vì vậy, xác định thời gian trưởng thành noãn rất quan trọng cho các ứng dụng lâm sàng vì có thể giúp sắp xếp hoặc lên kế hoạch cho việc thụ tinh giúp đạt kết quả tốt nhất⁽⁹⁾.

Việc khởi động quá trình phát triển vào giai đoạn thụ tinh là một chu trình được kiểm soát chặt chẽ dựa vào trạng thái nguyên vẹn về cấu trúc và phân tử của noãn và tinh trùng. Dưới điều kiện lý tưởng, quá trình thụ tinh sẽ kích thích một loạt các biến động $[Ca^{2+}]_i$, dẫn đến biến đổi hoàn thiện các tổ chức tế bào và phân tử ở noãn⁽¹²⁾. Nếu xác định không chính xác thời điểm trưởng thành noãn có thể dẫn đến việc noãn chưa hoàn thiện quá trình trưởng thành (trưởng thành bào tương) trước khi tiến hành ICSI. Còn như nếu trì hoãn quá trình ICSI sẽ làm tăng nguy cơ vắng mặt hoặc suy giảm chức năng của tiền nhân đực, do việc giải nén không hoàn thiện chất nhiễm sắc ở tinh trùng, cũng như việc không hình thành tiền nhân đực có thể liên đến hoạt động bất thường của các yếu tố giải nén tồn tại trong tế bào noãn. Để khắc phục nguy cơ này, đánh giá trưởng thành noãn nên được tiến hành vào nhiều thời điểm khác nhau để xác định trạng thái trưởng thành noãn (giai đoạn GV, MI hay

MII), cũng như thời gian tiến hành ICSI cần được diễn ra vào đúng thời điểm cần thiết cho từng giai đoạn đã được xác định. Hầu hết các nghiên cứu IVM đều ghi nhận khoảng 40 – 60% noãn trưởng thành sau cấy 1 ngày (cấy 24-30 giờ), trong khi một số nghiên cứu trước đây lại cấy noãn suốt 48-56 giờ mà không đánh giá trưởng thành ở thời điểm 24-30 giờ, do đó thời điểm cho thụ tinh tối ưu đã bị bỏ qua⁽¹³⁾.

Ngoài ra, việc trưởng thành noãn đều đã được lên chương trình và theo đúng thời gian cụ thể; chính vì vậy việc tinh trùng xâm nhập, hoạt hóa noãn, và khả năng phát triển hoàn thiện chỉ có thể đạt hiệu quả cao nhất trong vòng vài giờ sau phóng noãn. Nếu bỏ qua giai đoạn lý tưởng dành cho thụ tinh này, hợp tử tạo nên từ các trứng lão hóa (aged oocyte) hay quá trưởng thành thường khả năng phát triển rất kém và tiếp đến là sự chết của tế bào hay apoptosis (chết theo chương trình). Tiềm tinh trùng quá trễ sau khi noãn trưởng thành được biết là ảnh hưởng đến tỉ lệ thụ tinh, đồng thời chất lượng và khả năng làm tổ của phôi. Trong phác đồ IVM cải tiến, chúng tôi thực hiện kiểm tra mức độ trưởng thành tại nhiều thời điểm và tiềm tinh trùng trong khoảng thời gian 2-3 giờ sau khi đánh giá là noãn đã trưởng thành. Đây có thể là yếu tố quan trọng giúp làm tăng khả năng làm tổ của phôi.

Dựa trên các kiến thức trên và thời gian làm việc hiện tại về phía lâm sàng và tuân thủ quy trình nuôi cấy giao tử, phôi, chúng tôi chọn các thời điểm đánh giá trưởng thành vào 0 giờ, 20 giờ và 25 giờ sau chọc hút noãn. Chúng tôi thực hiện tiềm tinh trùng trong vòng 2-3 giờ sau khi đánh giá là noãn đã trưởng thành (MII). Chúng tôi cho rằng đây là một trong những thay đổi, mang tính quyết định.

Môi trường nuôi cấy noãn IVM

Một trong những yếu tố góp phần vào thành công cho một chu kỳ IVM chính là quy trình nuôi cấy noãn. Có nhiều loại môi trường nuôi cấy sẵn có trên thị trường, vậy thì việc lựa chọn một môi trường thích hợp cho IVM quả thật không đơn giản. Hiện nay, môi trường nuôi cấy thông dụng nhất cho IVM là môi trường IVM của MediCult (Origio A/S, Jyllinge, Denmark) và một số sản phẩm thương mại khác như Sage (CooperSurgical, Trum bull, CT). Trong quá trình nuôi trưởng thành noãn, thì điều quan trọng là môi trường nuôi cấy có thể cung cấp cho tế bào noãn nguồn năng lượng cho quá trình chuyển hóa thông qua con đường gluco giải như pyruvate và adenosine triphosphate (ATP)⁽¹⁴⁾.

Môi trường nuôi cấy trưởng thành noãn ở người và động vật thường được bổ sung nhiều nguồn protein khác nhau như huyết thanh bào thai bò, huyết thanh dây nhau, hoặc huyết thanh mẹ. Theo một số quan điểm thì huyết thanh có chứa albumin, và một số thành phần khác được cho là rất hữu ích cho sự trưởng thành noãn như epidermal growth factor (EGF), inhibin và activin. EGF trong huyết thanh được bổ sung vào môi trường trưởng thành noãn có thể giúp noãn non loại có ít tế bào hạt bao quanh trưởng thành sau khi cấy, giúp tăng tỉ lệ trưởng thành nhân của noãn GV đã tách tế bào hạt bao quanh và tăng tỉ lệ thụ tinh của noãn non còn nguyên tế bào hạt⁽¹³⁾. Môi trường IVM được thiết kế chủ yếu để đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng của các tế bào soma, và có đủ khả năng hỗ trợ các yêu cầu trao đổi chất cao của noãn bào còn tế bào hạt bao quanh (hoạt động glycolytic rất cao). Dựa vào các kiến thức trên và qua tham khảo ý kiến của các chuyên gia, chúng tôi đã bổ sung thêm hormone tăng trưởng (GH) vào môi trường nuôi trưởng thành noãn (IVM), bên cạnh huyết thanh bệnh nhân, hCG và FSH.

Thời gian từ cuối 2010 đến 2012 trùng vào giai đoạn chúng tôi áp dụng nhiều qui trình của hệ

thống quản trị chất lượng tại IVVFAS. Trong thời gian này, chúng tôi cũng đã đạt được tỉ lệ có thai lâm sàng ổn định và tăng dần, đặc biệt trong năm 2012, đối với các chu kỳ điều trị TTTON tiêu chuẩn. Do đó kết quả cải thiện thai lâm sàng và tỉ lệ làm tổ của phôi lên hơn 50% (nếu so năm 2012 với 2010) có thể là cộng hưởng của kết quả cải thiện qui trình kỹ thuật IVM và của hệ thống quản trị chất lượng.

Kết luận

Kết quả của nghiên cứu hồi cứu cho thấy việc cải tiến các qui trình cơ bản trong kỹ thuật IVM, dựa trên kinh nghiệm và kiến thức cơ bản trong lãnh vực này đã giúp chúng tôi tăng đáng kể tỉ lệ thành công trong 2 năm 2010-2012. Tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ làm tổ của phôi tăng hơn 50%. Kinh nghiệm và qui trình điều trị mới đã được chúng tôi chuyển giao đến đồng nghiệp trong và ngoài nước có nhu cầu.

Thành công này giúp khẳng định vị trí của trường phái IVM ở Việt Nam trên bình diện thế giới. Điều này chứng tỏ chúng ta hoàn toàn có thể nghiên cứu và làm chủ các công nghệ mới trong lãnh vực hỗ trợ sinh sản tại Việt nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001;76:936–42.
2. Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, et al. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000;73:978–83.
3. Cha KY, Chung HM, Lee DR, Kwon H, Chung MK, Park LS, et al. Obstetric outcome of patients with polycystic ovary syndrome treated by in vitro maturation and in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2005;83:1461–5.
4. Marcus W, Jurema, and Daniela Nogueira. In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertility and Sterility*. Vol. 86, No. 5, November 2006, 1277-1291.
5. Jane E. Johnson, M.S., H. Lee Higdon III, Ph.D., and William R. Boone, Ph.D. Effect of human granulosa cell co-culture using standard culture media on the maturation and fertilization potential of immature human oocytes. *Fertility and Sterility*. Vol. 90, No. 5, November 2008.
6. Jason E Swain, Gary D Smith. 2007. Mechanism of oocyte maturation. In: *In-vitro Maturation of Human Oocyte*. Chapter 5, pp. 85.
7. Thibault, C. 1977. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *J. Reprod. Fertil.*, 51, 1–15.
8. Thibault, C., Gerard, M. and Ménézo, Y. 1975. Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. *J. Reprod. Fertil.*, 45, 605–610.
9. Ducibella T. 1996. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Hum Reprod Update*; 2:29–42.
10. Martinez F, Rienzi L, Iacobelli M, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E and Tesarik J. 2002. Caspase activity in preimplantation human embryos is not associated with apoptosis. *Human Reproduction*; 17, 1584–1590.
11. Wada M, Hosotani R, Lee JU et al. 1998. An exogenous cdk inhibitor, butyrolactone-I, induces apoptosis with increased Bax/Bcl-2 ratio in p53-mutated pancreatic cancer cells. *Anticancer Research*; 18, 2559–2566.
12. Rafael A. Fissore, Manabu Kurokawa, Jason Knott, Mao Zhang and Jeremy Smyth. 2002. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*; 124, 745–754.
13. Vương Thị Ngọc Lan. 2011. Các yếu tố liên quan đến kết quả IVM. Trong "Kỷ yếu Hội nghị Kỹ thuật hỗ trợ sinh sản – Thành tựu và triển vọng 2011", trang 163.
14. De Araujo CH, Nogueira D, de Araujo MC, Martins Wde P, Ferriani RA, dos Reis RM. Supplemented tissue culture medium 199 is a better medium for in vitro maturation of oocytes from women with polycystic ovary syndrome women than human tubal fluid. *Fertil Steril* 2009;91:509–13.