

ỨNG DỤNG HỆ THỐNG KÍNH HIỂN VI PHÂN CỰC TRONG HỖ TRỢ SINH SẢN

CNSH. Phạm Duy Tùng, CNSH. Trần Nhật Ánh Dương, CNSH. Hồ Lan Trâm

Bệnh viện đa khoa Mỹ Đức

GIỚI THIỆU

Hiện nay, việc đánh giá và lựa chọn giao tử chủ yếu dựa trên các tiêu chí đánh giá về hình thái. Phương pháp này đơn giản, tiện lợi và không xâm lấn nhưng mang tính chủ quan của người thực hiện dẫn đến độ chính xác và đồng thuận chưa cao. Bên cạnh đó, phương pháp này không cung cấp được những thông tin về hình thái và cấu trúc của các bào quan nhỏ có độ tương phản kém như thoi phân bào (meiotic spindle) hay độ nén của nhân tinh trùng. Sự ra đời của hệ thống kính hiển vi phân cực (Polscope) cho phép chuyên viên phôi học có thể tiếp cận và đánh giá các cấu trúc này một cách không xâm lấn, thông qua ảnh chụp với độ phân giải cao mà các phương pháp nhuộm thông thường không thể làm được, từ đó cung cấp thông tin để lựa chọn giao tử một cách hiệu quả hơn. Mục đích của bài viết này nhằm giới thiệu về cấu tạo, nguyên lý hoạt động của hệ thống Polscope và một số ứng dụng hiện nay của nó trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản.

HỆ THỐNG POLSCOPE

Hiện tượng phân cực ánh sáng

Là hiện tượng ánh sáng đi qua môi trường bất đẳng hướng về mặt quang học, đặc biệt là khi ánh sáng truyền qua các vật liệu lưỡng chiết (có hai giá trị chiết suất khác nhau). Khi ánh sáng đi qua vật liệu lưỡng chiết sẽ bị phân tách thành hai chùm tia khác nhau, di chuyển cùng phương nhưng khác nhau về vận tốc. Còn đối với những vật liệu thông thường (đồng nhất, chỉ có một giá

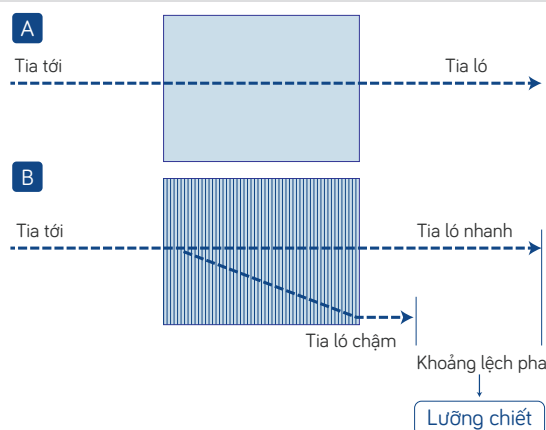
trị chiết suất) thì không xảy ra hiện tượng này (Hình 1). Tính chất quang học này xuất phát từ cấu trúc và sự sắp xếp của các phân tử trong vật liệu. Dựa vào đó, người ta sử dụng hệ thống Polscope để nghiên cứu cấu tạo của vật liệu mà không cần phải tác động đến mẫu vật.

Cấu tạo

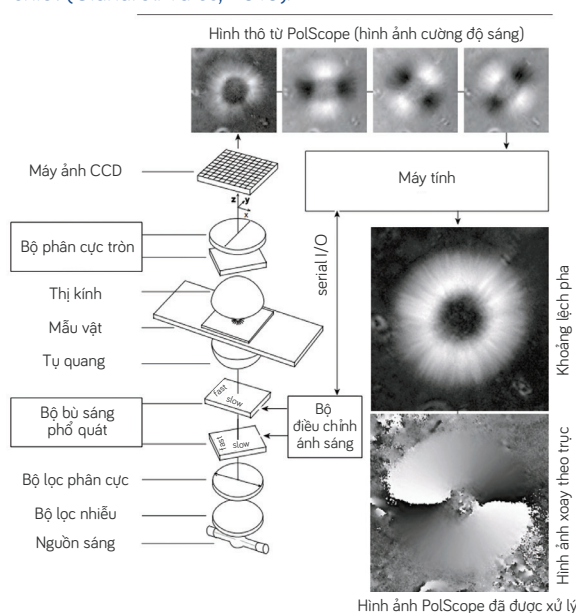
Hệ thống Polscope truyền thống là sự kết hợp giữa kính hiển vi quang học và 2 bộ phân cực. Vào những năm 90, hệ thống LC-Polscope ra đời với sự thay đổi về hai thành phần chính: bộ phân cực tròn (Circularly polarized light) và bộ bù sáng phổ quát (Universal Compensator) thay thế cho 2 bộ phân cực trong hệ thống Polscope truyền thống, giúp cải thiện độ nhạy và thuận tiện hơn khi quan sát những vật có tính chiết quang thấp (như spindle) (Oldenbourg R, 2013). Bộ phân cực tròn có tác dụng tạo ra nhiều mặt phẳng ánh sáng phân cực thẳng khác nhau thay vì phải di chuyển mẫu. Bộ bù sáng phổ quát cho phép khuếch đại sự chênh lệch khoảng cách giữa 2 tia sáng sau khi đi qua môi trường lưỡng chiết. Những thông tin về sự chênh lệch này sẽ được máy tính ghi nhận và phân tích để cho ra hình ảnh cũng như thông số chiết quang, qua đó phản ánh được cấu trúc và cách sắp xếp của các phân tử trong mẫu (Oldenbourg R, 2013). (Hình 2)

ỨNG DỤNG POLSCOPE TRONG HỖ TRỢ SINH SẢN

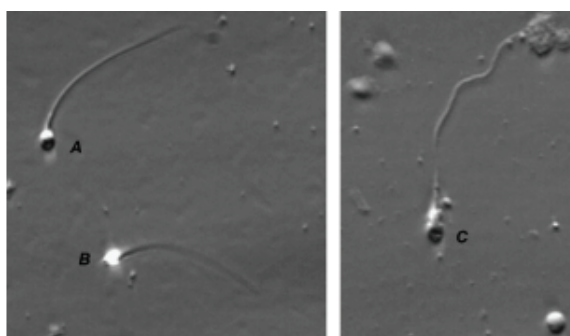
Nhờ vào sự phát hiện tính lưỡng chiết ở noãn



Hình 1. (A) Ánh sáng truyền qua vật liệu thông thường. (B) Hiện tượng phân cực ánh sáng khi đi qua vật liệu lưỡng chiết (Gianaroli và cs, 2010).



Hình 2. Cấu tạo và nguyên tắc hoạt động của LC-PolScope. Hình ảnh từ vật quan sát được chụp lại dưới 5 mặt phẳng phân cực khác nhau được cài đặt từ trước. Dựa trên những hình ảnh thô này, máy tính sẽ kết hợp những hình ảnh này lại bằng thuật toán (Oldenbourg R, 2013).



Hình 3. Các mức độ lưỡng chiết của tinh trùng quan sát dưới Polscope. (A) tinh trùng lưỡng chiết một phần. (B) tinh trùng lưỡng chiết toàn bộ. (C) tinh trùng không có tính lưỡng chiết (Gianaroli và cs, 2008).

trong thập niên 70, người ta đã từng bước ứng dụng Polscope vào lĩnh vực hỗ trợ sinh sản (Kilani S và cs., 2011). Nhiều nghiên cứu sau đó đã cho thấy giá trị ứng dụng của nó trong đánh giá và lựa chọn giao tử, từ đó cải thiện chất lượng phôi và kết quả điều trị cho bệnh nhân.

Đánh giá và lựa chọn tinh trùng

Người ta nhận thấy phần đầu của tinh trùng có tính lưỡng chiết khi được quan sát dưới ánh sáng phân cực do sự sắp xếp trật tự của các sợi nucleoprotein. Tính lưỡng chiết ở đầu tinh trùng phản ánh kết cấu chặt chẽ, có tổ chức trong cấu trúc vùng nhân và vùng acrosome, qua đó, phản ánh mức độ trưởng thành của tinh trùng (Baccetti, 2004). Một nghiên cứu của Crippa và cộng sự (2009) cho thấy tỷ lệ phân mảnh DNA cao hơn đáng kể ở những tinh trùng đầu không có lưỡng chiết. Khi quan sát bằng Polscope, tính lưỡng chiết cao được thể hiện qua độ sáng và sự đồng đều (Gianaroli và cs., 2008). Về cơ bản, tính lưỡng chiết ở tinh trùng được chia thành ba dạng là lưỡng chiết toàn bộ, lưỡng chiết một phần (nhân hoặc acrosome) và bất thường (lưỡng chiết không đều hoặc không có tính lưỡng chiết) (Hình 3). Dựa vào điều này người ta sử dụng Polscope để lựa chọn những tinh trùng có đầu lưỡng chiết để sử dụng cho ICSI (Gianaroli và cs., 2008).

Đánh giá tính lưỡng chiết đầu tinh trùng không mang nhiều giá trị lâm sàng trên những mẫu tinh trùng có nhiều tinh trùng di động, nhưng giúp cải thiện đáng kể tỷ lệ thụ tinh (Ghosh S và cs., 2012; Nordhoff V và cs., 2013), thai lâm sàng và thai diễn tiến trên nhóm không có tinh trùng di động hoặc tinh trùng thu nhận từ sinh thiết tinh hoàn (TESE) (Gianaroli và cs., 2008). Các tác giả cho rằng tinh trùng được thu nhận từ TESE có thể bị khiếm khuyết trong quá trình trưởng thành và hoạt hóa ở mào tinh nên

rất khó để có thể thu nhận tinh trùng trưởng thành và di động. Trong trường hợp tinh trùng bất động hoàn toàn, Polscope cho phép xác định những tinh trùng sống, trưởng thành thông qua lưỡng chiết cao ở vùng đầu, để sử dụng trong ICSI. Các kết quả trên cho thấy việc ứng dụng Polscope để lựa chọn tinh trùng cho ICSI là một phương pháp đầy hứa hẹn đối với những trường hợp tinh trùng bất động hay tinh trùng từ thủ thuật.

Đánh giá và lựa chọn noãn

Đánh giá tính lưỡng chiết của zona pellucida (ZP)

ZP là lớp màng bao quanh noãn, có thành phần cấu tạo từ glycoprotein, đóng vai trò như một hàng rào bảo vệ noãn và phôi. ZP có các thụ thể liên kết với tinh trùng, giúp ngăn chặn đa thụ tinh. Khi sử dụng Polscope, người ta có thể quan sát được cấu trúc 3 lớp của ZP gồm: lớp trong, lớp giữa và lớp ngoài. Trong đó, lớp trong ZP thể hiện tính lưỡng chiết cao hơn so với hai lớp còn lại (Claudia và cs., 2011). Chính vì đặc điểm này mà hiện nay có một số nghiên cứu mới về việc đánh giá và chọn lọc noãn dựa vào độ lưỡng chiết, tính đồng nhất của ZP. Qua đó, độ lưỡng chiết của ZP sẽ được phần mềm tính toán cho ra giá trị “ZP score” và được gắn với các nhãn màu thể hiện từng mức độ lưỡng chiết khác nhau: xanh lá có tính lưỡng chiết cao, vàng có tính lưỡng chiết trung bình và cam có tính lưỡng chiết thấp (Hình 4).

Cho đến nay đã có nhiều nghiên cứu sử dụng Polscope để đánh giá mối tương quan giữa lưỡng chiết của ZP với các kết quả điều trị IVF. Đa số các nghiên cứu đều nhận thấy có mối tương quan thuận giữa tính lưỡng chiết cao ở ZP với kết quả điều trị IVF, đặc biệt về tỷ lệ thụ tinh, phát triển phôi và thai lâm sàng (Rama Raju và cs, 2007; Montag và cs, 2008; Dr Edson Borges và cs, 2009). Việc sử dụng noãn có ZP lưỡng chiết cao giúp cải thiện kết quả lâm sàng (Rama Raju và cs, 2007; Montag và cs, 2008; Madaschi và cs, 2009). Còn đối với noãn có ZP lưỡng chiết

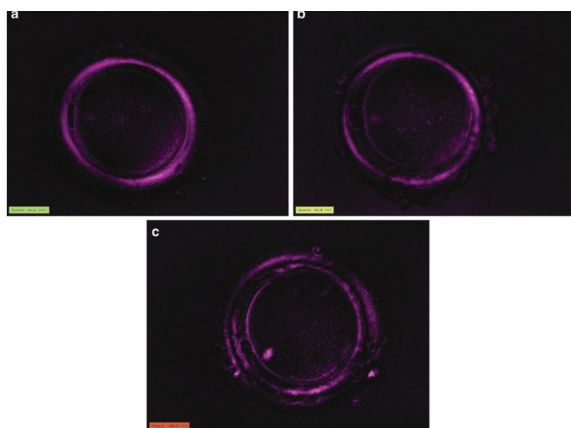
thấp cho thấy tỷ lệ sảy thai cao (Madaschi và cs., 2009; Edson Borges và cs., 2009). Trong tương lai, cần nhiều hơn các nghiên cứu phân tích mối tương quan giữa các dạng ZP và kết quả ICSI để có thể ứng dụng phương pháp này như một yếu tố tiên lượng cho bệnh nhân.

Đánh giá thoi phân bào (Meiotic spindle)

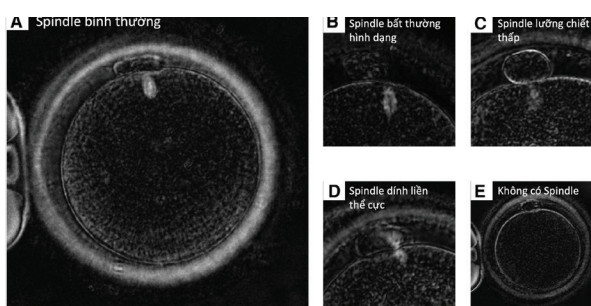
Spindle là một bào quan với cấu trúc hình trụ, gồm các vi ống được cấu tạo bởi các đơn phân β -tubulin kết hợp với các protein dynein hay kinesin. Spindle giữ vai trò quan trọng cho sự phân ly của các cặp nhiễm sắc thể trong quá trình giảm phân, đảm bảo số lượng nhiễm sắc thể của các tế bào con. Việc sử dụng hệ thống Polscope cho phép quan sát cấu trúc của spindle nhờ vào tính lưỡng chiết của nó thay vì sử dụng thuốc nhuộm hoặc tiếp xúc với cường độ ánh sáng cao có thể gây hại (Oldenbourg, 1999; Liu và cs., 2000). Việc đánh giá spindle thường dựa vào một số tiêu chí như sự hiện diện, hình thái, vị trí và kích thước.

– Sự hiện diện và hình thái spindle:

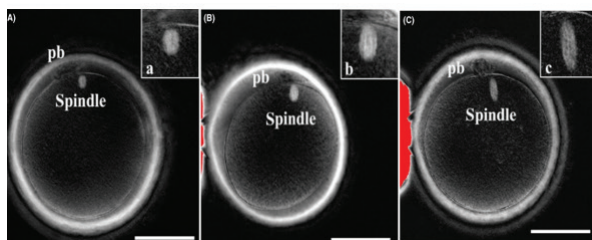
Khi sử dụng hệ thống Polscope để quan sát tế bào noãn, người ta đã nhận thấy khoảng 60 – 70% noãn từ bệnh nhân hiếm muộn mang những bất thường về hình thái của spindle và tỷ lệ này tăng lên đáng kể ở phụ nữ trên 40 tuổi (trên 80%) (Wang và cs., 2001). Các nghiên cứu cho thấy spindle bình thường sẽ có hình thái rõ ràng, hình thùng rượu, các vi ống xếp cùng phương, lưỡng chiết cao, đồng đều (Kilani và cs, 2014). Một số dạng bất thường được quan sát thấy như hình thái và ranh giới spindle không đều và không quan sát rõ (Dysmorphic Spindle); lưỡng chiết thấp, cấu trúc hỗn độn (Translucent spindle); spindle đang gắn với thể cực thứ nhất (noãn còn ở giai đoạn telophase), không quan sát thấy spindle (No visible spindle) (Hình 5). Từ đó, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm điều tra ảnh hưởng của bất thường spindle ở noãn đến các kết quả điều trị IVF. Hầu hết các nghiên cứu cho thấy khi spindle với hình dạng bất thường hoặc không quan sát được liên quan đến tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ phôi phân chia,



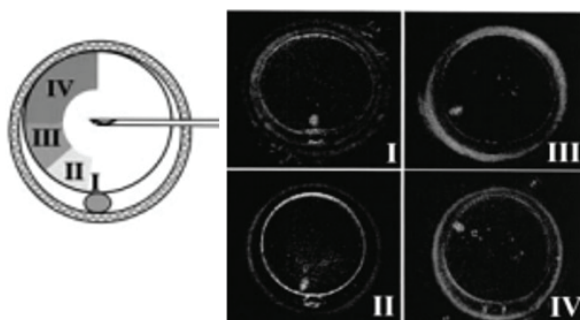
Hình 4. Các mức độ lưỡng chiết của ZP khi quan sát dưới kính Polscope (Claudia và cs., 2011).



Hình 5. Các dạng hình thái spindle chụp bằng Polscope (Tilia và cs., 2016).



Hình 6. Kích thước spindle ở tế bào noãn người được chụp bằng Polscope (Tomari và cs., 2018).
(A) $< 90 \mu\text{m}^2$, (B) $90 - 120 \mu\text{m}^2$ và (C) $> 120 \mu\text{m}^2$.



Hình 7. Góc spindle ở tế bào noãn được chụp bằng Polscope, thể cực thứ nhất ở vị trí 6 giờ, các góc lệch lần lượt là $0 \pm 5^\circ$, $6 \pm 45^\circ$, $46 \pm 90^\circ$ và $> 90^\circ$ (Rienzi và cs., 2003).

phôi nguyên bội và tỷ lệ thai lâm sàng thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng (Wang và cs., 2001; Kilani và cs., 2014; Tilia và cs., 2016).

- Kích thước spindle là diện tích của spindle xuất hiện trên ảnh chụp, tính bằng đơn vị micromet vuông thông qua phần mềm chuyên dụng. Mối liên hệ giữa spindle với khả năng thụ tinh và tạo phôi tốt vẫn đang được nghiên cứu. Theo nghiên cứu của Tomari và cộng sự (2018), kích thước spindle từ $90 - 120 \mu\text{m}^2$ cho các kết quả lâm sàng như tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ hình thành phôi nang và tỷ lệ thai lâm sàng tốt nhất.

- Góc spindle:

Vị trí hay góc spindle được định nghĩa là góc lệch giữa spindle và thể cực thứ nhất so với vị trí tâm noãn (Hình 7). Nghiên cứu của Rienzi và cộng sự (2003) cho thấy góc spindle góc lớn hơn 90° liên quan đến giảm tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ hình thành phôi. Một nghiên cứu khác của Mahfoudh và cộng sự (2017) cho thấy noãn có góc spindle từ $0^\circ - 29^\circ$ giúp tăng tỷ lệ mang thai. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Kim và cộng sự (2018) đã kết luận rằng noãn có góc spindle càng nhỏ thì có tỷ lệ phôi nguyên bội càng cao.

Góc spindle cũng được nghiên cứu để xác định vị trí ICSI. Trước đây người ta cho rằng spindle nằm ngay dưới thể cực, vì vậy noãn sẽ được ICSI với thể cực ở vị trí 6 hoặc 12 giờ và tiêm tinh trùng ở vị trí 3 giờ để tránh gây tổn thương cho spindle (Stoddart và cs., 2000). Tuy nhiên, qua nghiên cứu của Rienzi và cộng sự (2003) có thể thấy rằng không phải lúc nào spindle cũng nằm tại vị trí này. Do đó, việc sử dụng hệ thống Polscope để xác định vị trí ICSI thích hợp giúp hạn chế tối đa tổn thương đến spindle.

Ứng dụng Polscope trong thủy tinh hóa noãn

Trữ đông noãn là một trong những kỹ thuật hỗ trợ rất nhiều trong lĩnh vực hỗ trợ

sinh sản, đặc biệt đối với phụ nữ muốn bảo tồn khả năng sinh sản để trì hoãn thời điểm có con hoặc điều trị các bệnh lý khác có thể ảnh hưởng đến khả năng sinh sản. Noãn là tế bào lớn nhất trong cơ thể, do vậy nhạy cảm hơn trong quá trình trữ lạnh và rã đông so với các tế bào khác. Dẫn đến giảm tỷ lệ sống sau khi rã, giảm tỷ lệ thụ tinh và phát triển của phôi cũng như tỷ lệ thai lâm sàng. Spindle là một bào quan cực kỳ nhạy cảm với nhiệt độ, việc hạ nhiệt độ xuống dưới mức sinh lý có thể khiến cấu trúc của spindle bị xáo trộn. Ở một số loài động vật như chuột, spindle có thể được sửa chữa sau khi rã đông, nhưng ở người, sự biến đổi của spindle là không thể hồi phục được (Chen và cs., 2004).

Việc quan sát sự thay đổi của spindle trong quá trình trữ lạnh và rã đông noãn giúp ích rất nhiều trong việc hoàn thiện các quy trình thụ tinh hóa noãn thông qua việc xác định cũng như so sánh sự thay đổi của spindle trước và sau khi trữ. Nhờ vào những thông tin này, các nhà nghiên cứu có thể tối ưu hóa thành phần môi trường cũng như quy trình trữ lạnh noãn để hạn chế những ảnh hưởng tiêu cực có thể ảnh hưởng đến spindle (Sereni E và cs., 2009). Những đặc điểm của spindle được cho là có khả năng tiên lượng được kết quả của chu kỳ điều trị khi sử dụng noãn đông lạnh. Chẳng hạn như noãn có spindle bình thường về hình thái có tỷ lệ sống sau rã đông cao hơn đáng kể so với nhóm có spindle bất thường về hình thái hoặc không có spindle (Chen và cs., 2004).

Một số nghiên cứu nhận thấy ảnh hưởng của việc trữ lạnh và rã đông đến ZP. Như mật độ glycoprotein thấp hơn sau khi rã ở những noãn trưởng thành nhưng không ảnh hưởng tiêu cực đến kết quả thụ tinh hay phôi khi thực hiện ICSI (Song và cs., 2016). Tuy nhiên, sự thay đổi cấu trúc có thể ảnh hưởng đến chức năng của ZP, đặc biệt là trong kỹ thuật IVF cổ điển.

Một số hạn chế khi ứng dụng Polscope trong hỗ trợ sinh sản

Hệ thống Polscope đòi hỏi phải có thêm bộ

phân cực và phần mềm xử lý so với kính hiển vi thông thường, khiến chi phí đầu tư cao hơn. Cụ thể hệ thống Polscope có thể tiêu tốn cao, thêm 20.000 – 30.000 đô la Mỹ so với hệ thống ICSI thông thường. Ngoài ra, còn có thêm chi phí sử dụng các đĩa có đáy bằng thủy tinh chuyên dụng để tránh làm biến dạng ánh sáng phân cực. Chưa kể đến việc lắp đặt cũng như bảo trì hệ thống tương đối phức tạp. Thao tác với giao tử bằng Polscope cũng lâu hơn do thời gian phân tích của máy tính, điều này bất lợi cho giao tử và ảnh hưởng đến sự phát triển thành phôi.

KẾT LUẬN

Hệ thống Polscope là một công cụ tiềm năng cho phép đánh giá được hình thái và cấu trúc của một số bào quan trong giao tử một cách không xâm lấn, cung cấp thêm những thông tin quý giá để đánh giá và lựa chọn giao tử, giúp cải thiện kết quả điều trị cho bệnh nhân. Tuy nhiên, việc áp dụng hệ thống Polscope vẫn chưa được áp dụng rộng rãi do những rào cản về chi phí, khả năng vận hành cũng như áp lực về thời gian thao tác trên giao tử. Cần tiếp tục cải tiến để đẩy nhanh thời gian xử lý hình ảnh và đơn giản hóa quy trình sử dụng để có thể sử dụng phổ biến hơn trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen, C. K., Wang, C. W., Tsai, W. J., Hsieh, L. L., Wang, H. S., & Soong, Y. K. (2004). Evaluation of meiotic spindles in thawed oocytes after vitrification using polarized light microscopy. *Fertility and sterility*, 82(3), 666–672.
2. Gianaroli, L., Magli, M. C., Collodel, G., Moretti, E., Ferraretti, A. P., & Baccetti, B. (2008). Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertility and sterility*, 90(1), 104–112.
3. Kilani S., Chapman M. G. (2011). The use of polarized light microscopy in IVF. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology*, 6(3), 241–246
4. Kilani, S., & Chapman, M. G. (2014). Meiotic spindle normality predicts live birth in patients with recurrent in vitro fertilization failure. *Fertility and sterility*, 101(2), 403–406.
5. Oldenbourg R. (2013). *Polarized light microscopy: principles and practice*. Cold Spring Harbor protocols, 2013(11), pdb.top078600.
6. Petersen, C. G., Vagnini, L. D., Mauri, A. L., Massaro, F. C., Silva, L. F., Cavagna, M., ... & Franco, J. G. (2011). Evaluation of zona pellucida birefringence intensity during in vitro maturation of oocytes from stimulated cycles. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1), 1–7.
7. Sereni, E., Sciajno, R., Fava, L., Coticchio, G., Bonu, M. A., & Borini, A. (2009). A PolScope evaluation of meiotic spindle dynamics in frozen-thawed oocytes. *Reproductive biomedicine online*, 19(2), 191–197.
8. Song, W. Y., Peng, Z. F., Chen, X. M., Jin, H. X., Yao, G. D., Shi, S. L., Yang, H. Y., Zhang, X. Y., & Sun, Y. P. (2016). Effects of Vitrification on Outcomes of In Vivo-Mature, In Vitro-Mature and Immature Human Oocytes. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 38(5), 2053–2062.