

So sánh hiệu quả tạo phôi nang khi sử dụng hệ môi trường đơn bước thay mới và không thay mới môi trường vào ngày 3

Nguyễn Thị Quỳnh Tiên^{1,2}, Trần Tú Cẩm^{1,2}, Lưu Thị Minh Tâm^{1,2}, Phạm Thiệu Quân^{1,2}, Huỳnh Gia Bảo^{1,2}

¹ Đơn vị Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Mỹ Đức

² Trung tâm Nghiên cứu HOPE, Bệnh viện đa khoa Mỹ Đức

doi:10.46755/vjog.2020.1.787

Tác giả liên hệ (Corresponding author): Nguyễn Thị Quỳnh Tiên, email: tien.ntq@myduchospital.vn

Nhận bài (received) 05/12/2019 - Chấp nhận đăng (accepted) 20/04/2020

Tóm tắt

Mục tiêu: So sánh hiệu quả tạo phôi nang hữu dụng và kết quả điều trị khi sử dụng môi trường đơn bước giữa thay mới và không thay mới môi trường ở giai đoạn phôi nang ngày 3.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu đoàn hệ hồi cứu trên 200 bệnh nhân thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm tại Đơn vị Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện đa khoa Mỹ Đức từ tháng 8/2017 đến tháng 12/2017. Các bệnh nhân được chia thành 2 nhóm, nhóm 1: có thay mới môi trường ($n = 97$) vào ngày 3 và nhóm 2: không thay mới môi trường ($n = 103$) vào ngày 3. Vào ngày 5, đánh giá phôi và lựa chọn phôi để trữ. Đánh giá kết quả điều trị dựa trên lần chuyển phôi trữ đầu tiên.

Kết quả: Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ tạo phôi nang hữu dụng (22,06% và 19,77%; $p = 0,205$) giữa 2 nhóm. Tương tự, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm về tỷ lệ thai lâm sàng, tỷ lệ làm tổ và tỷ lệ sẩy thai (68,1% và 73,2%; $p = 0,576$; 53,3% và 59,1%; $p = 0,36$; 4,4% và 7,3%; $p = 0,62$). Tỷ lệ tạo phôi nang ở nhóm không thay mới có xu hướng cao hơn ở nhóm thay mới (55,51% và 51,06%, $p = 0,09$).

Kết luận: Dữ liệu từ nghiên cứu cho thấy việc không thay mới và thay mới môi trường vào ngày 3 cho khả năng tạo phôi nang hữu dụng tương đương nhau, đồng thời khi đánh giá kết quả điều trị trong lần chuyển phôi trữ đầu tiên cho thấy không có sự khác biệt.

Từ khóa: môi trường đơn bước, phôi nang, làm mới môi trường vào ngày 3

A comparison of blastocyst development in single - step medium with or without day-3 refreshment

Nguyen Thi Quynh Tien^{1,2}, Tran Tu Cam^{1,2}, Luu Thi Minh Tam^{1,2}, Pham Thieu Quan^{1,2}, Huynh Gia Bao^{1,2}

¹ IVFMD, My Duc Hospital

² HOPE Research Center, My Duc Hospital

Abstract

Objective: Comparison of good quality blastulation rate and treatment result in single – step medium with or without day - 3 refreshment.

Materials and methods: A retrospective cohort study was conducted at IVFMD, My Duc Hospital from August to December 2017. A total of 200 couples were included in this study, divided into two groups, renewal group ($n = 97$) on day 3 and without renewal group ($n = 103$) on day 3. On day 5, embryos were evaluated and selected for freezing. Treatment results based on the first frozen embryo transfer.

Result (s): From August 2017 to December 2017, there were 97 patients whose embryos were cultured in SSM renewal on day 3 and 103 patients whose embryos were cultured in SSM without renewal on day 3. Baseline characteristics were comparable between the two groups. The good - quality blastulation rate was not statistically significant difference (22.06% vs 19.77%, $p = 0.205$). Clinical pregnancy rate was 68.1% in refreshment group, compared to 73.2% in the non-refreshment group ($p = 0.576$). All other secondary outcomes were comparable between the two groups.

Conclusion: Our data suggests that day - 3 renewal offers no advantage to blastocyst development in the SSM culture system.

Key words: single step medium, blastocyte, day-3 refreshment

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong hơn một thập kỷ qua đã có những tiến bộ lớn trong lĩnh vực thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) để cải thiện tỷ lệ thành công cũng như giảm thiểu những nguy cơ có thể xảy ra cho bệnh nhân. Đã có nhiều chứng cứ cho thấy việc nuôi cấy phôi đến giai đoạn phôi nang cho phép lựa chọn phôi có tiềm năng phát triển hơn, khả năng làm tổ cao hơn. Một lý do thứ hai giúp ích cho việc sử dụng các phương pháp chẩn đoán di truyền tiền làm tổ. Để đáp ứng cho việc nuôi phôi dài ngày, hệ môi trường nuôi cấy phôi cần đáp ứng được nhu cầu dinh dưỡng của phôi ở từng giai đoạn phát triển. Trên thế giới có hai hệ môi trường nuôi cấy phôi đang được sử dụng đó là hệ môi trường chuyển tiếp và hệ môi trường đơn bước. Trong hệ môi trường đơn bước có hai phương pháp để nuôi cấy phôi đến giai đoạn phôi nang: thay mới môi trường và không thay mới môi trường vào ngày 3. Hệ môi trường đơn bước cung cấp tất cả các chất dinh dưỡng cần thiết cho phôi, phôi được nuôi cấy liên tục đến giai đoạn phôi nang, không cần thay đổi môi trường ở ngày 3 như trong hệ môi trường chuyển tiếp, đồng thời cho kết quả tốt về chất lượng phôi nang và tỷ lệ thai (Biggers và Racowsky, 2002; Macklon và cộng sự, 2002) [1, 2]. Việc không thay mới môi trường ở hệ môi trường đơn bước vào ngày 3 giúp phôi được ổn định trong môi trường nuôi cấy và không phải thay đổi môi trường đột ngột, làm giảm tác động xấu hoặc gây "stress" cho phôi khi không phải tiếp xúc với thành phần môi trường mới. Đồng thời giảm áp lực cho quy trình của một đơn vị TTTON. Tuy nhiên, một dữ liệu khác của Ronny Janssens lại cho rằng, khi nuôi cấy liên tục đến ngày 4, sẽ làm tăng áp suất thẩm thấu, và theo Swain 2012 [3], khi áp suất thẩm thấu tăng lên 310 mOsm, sẽ ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi chuột ở giai đoạn 8 tế bào.

Các nghiên cứu hiện nay vẫn chưa xác định được phương thức nuôi cấy nào ưu việt hơn trong nuôi cấy phôi cũng như tỷ lệ làm tổ của phôi chuyển. Do đó, chúng tôi tiến hành một nghiên cứu so sánh tỷ lệ tạo phôi nang giữa thay mới và không thay mới môi trường nuôi cấy vào ngày 3 và kết quả điều trị trong lần chuyển phôi trữ đầu tiên.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu đoàn hệ hồi cứu trên 200 bệnh nhân thực hiện TTTON tại Đơn vị Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện đa khoa Mỹ Đức từ tháng 8/2017 đến tháng 12/2017.

Tiêu chuẩn nhận - loại

Tiêu chuẩn nhận: Số chu kỳ điều trị ≤ 2 ; tổng số phôi

tốt ngày 3 (loại I và loại II) ≥ 8 ; nuôi cấy phôi đến ngày 5 toàn bộ.

Tiêu chuẩn loại: Tinh trùng từ phẫu thuật cryptozoospermia; có chỉ định AOA, r.AOA, r.ICSI; chu kỳ IVF.

2.2. Phương pháp tiến hành

Chuẩn bị giao tử:

Noãn được chọc hút 36 - 38 giờ sau khi tiêm hCG. Noãn sau chọc hút được nuôi cấy trong môi trường Global total LP for Fertilization (LifeGlobal) trong khoảng 2 giờ nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂ và 5% O₂. Trong khi đó, tinh trùng của người chồng sẽ được lọc rửa bằng phương pháp thang nồng độ. Sau đó, noãn được tách ra khỏi tế bào xung quanh noãn và được thực hiện phương pháp ICSI vào khoảng 39 - 41 giờ (sau khi tiêm hCG).

Thụ tinh và nuôi cấy phôi:

Tiến hành ICSI ở thời điểm 39 - 41 giờ sau mũi tiêm hCG theo quy trình kích thích buồng trứng thường quy. Noãn sau khi ICSI được nuôi cấy trong môi trường Global Total LP ở 37°C, 5% CO₂ và 5% O₂. Kiểm tra thụ tinh được tiến hành ở 16 - 18 giờ sau ICSI. Vào ngày 3, các phôi được đánh giá vào thời điểm 66 - 68 giờ sau ICSI, sau đó chia thành 2 nhóm nuôi cấy đến ngày 5, theo trình tự xen kẽ hai nhóm:

Nhóm 1 (môi trường được thay mới vào ngày 3)

và

Nhóm 2 (môi trường không thay mới vào ngày 3).

Đánh giá phôi và lựa chọn phôi để trữ lạnh:

Việc đánh giá và phân loại phôi ngày 3 và ngày 5 dựa trên đồng thuận Alpha. Kết quả điều trị được đánh giá dựa trên kết quả chuyển phôi trữ đầu tiên.

Phân loại phôi nang:

Loại 1: độ nở rộng ≥ 3 , ICM và TE : AA, AB, BA

Loại 2: độ nở rộng ≥ 3 , ICM và TE : BB; 2AA, 2AB, 2BA, 2BB

Loại 3: các phôi còn lại

Phôi nang hữu dụng: phôi nang xếp loại 1 và loại 2

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu sẽ được trình bày dưới dạng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn hay dưới dạng phần trăm. Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được kiểm định bằng Student's t-test cho dữ liệu theo luật phân phối chuẩn, giá trị phần trăm được kiểm định sự khác biệt bằng Chi-square test, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được xác định khi $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ

Từ tháng 8/2017 đến tháng 12/2017 có tổng cộng 200 bệnh nhân tham gia nghiên cứu chia thành hai nhóm, nhóm 1 (n = 97) và nhóm 2 (n = 103).

Bảng 1. Các chỉ số nền của bệnh nhân

	Nhóm 1 (n = 97)	Nhóm 2 (n = 103)	p
Tuổi vợ (năm)	31,20 ± 5,17	30,51 ± 4,73	0,331
BMI (kg/m ²)	20,77 ± 3,01	21,30 ± 2,32	0,163
AMH vợ (ng/ml)	5,21 ± 3,74	6,34 ± 4,26	0,055
Tổng liều FSH (IU)	2200,82 ± 586,16	2162,86 ± 609,56	0,655
P4 (ng/mL)	1,43 ± 0,98	1,60 ± 1,01	0,239
Loại vô sinh (n, %)			0,22
Nguyên phát	58 (60,4)	69 (67,6)	
Thứ phát	38 (39,6)	33 (32,4)	
Số chu kỳ điều trị TTTON, n (%)			0,84
1 chu kỳ	78 (80,4)	85 (82,5)	
2 chu kỳ	19 (19,6)	18 (17,5)	
Thời gian vô sinh (năm)	3,54 ± 2,60	3,82 ± 2,71	0,457
Chỉ định TTTON, n (%)			0,065
Vô sinh nam	24 (24,7)	18 (17,5)	
Tai vòi	11 (11,3)	20 (19,4)	
Chưa rõ nguyên nhân	15 (15,5)	14 (13,6)	
Rối loạn phóng noãn	20 (20,6)	34 (33,0)	
Giảm dự trữ buồng trứng	10 (10,3)	7 (6,8)	
Lạc nội mạc tử cung	4 (4,1)	0 (0)	
Nguyên nhân khác	13 (13,4)	10 (9,7)	

Các chỉ số nền của bệnh nhân tương đương nhau giữa 2 nhóm.

Bảng 2. Mô tả kết quả phôi học của hai nhóm

	Nhóm 1 (n = 97)	Nhóm 2 (n = 103)	p
Số trứng chọc hút được	23,21 ± 9,97	23,65 ± 9,93	0,753
Số trứng ICSI	19,69 ± 8,01	20,28 ± 8,57	0,616
Số trứng thụ tinh	17,40 ± 7,07	17,92 ± 7,55	0,616
Số phôi nang	9,96 ± 5,26	10,99 ± 5,68	0,185
Số phôi nang loại I + II	4,07 ± 2,56	3,86 ± 2,86	0,589
Tỷ lệ tạo phôi nang (%)	51,06 ± 18,66	55,51 ± 18,19	0,09
Tỷ lệ phôi nang hữu dụng (%)	22,06 ± 13,73	19,77 ± 11,66	0,205

Số trứng chọc hút (nhóm 1 là 23,21 ± 9,97; nhóm 2 là 23,65 ± 9,93), số trứng ICSI (nhóm 1 là 19,69 ± 8,01; nhóm 2 là 20,28 ± 8,57), số trứng thụ tinh (nhóm 1 là 17,40 ± 7,07; nhóm 2 là 17,92 ± 7,55) giữa hai nhóm đều tương đương nhau ($p > 0,05$). Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ tạo phôi nang hữu dụng (22,06% và 19,77%; $p = 0,205$) giữa 2 nhóm.

Tuy nhiên, tỷ lệ tạo phôi nang ở nhóm 2 có xu hướng cao hơn ở nhóm 1 (55,51% và 51,06%, $p = 0,09$) (bảng 2).

Bảng 3. Mô tả kết quả điều trị của hai nhóm

	Nhóm 1 (n = 82)	Nhóm 2 (n = 91)	p
Số phôi nang chuyển trung bình	1,90 ± 0,30	1,90 ± 0,30	0,977
Số phôi tốt chuyển loại 1+2	1,62 ± 0,61	1,70 ± 0,54	0,365
Nội mạc tử cung ngày chuyển phôi (mm)	11,54 ± 1,16	11,33 ± 1,16	0,234
Tỷ lệ β hCG (+), n (%)	74 (81,3)	68 (82,9)	0,939
Tỷ lệ thai lâm sàng, n (%)	62 (68,1)	60 (73,2)	0,576
Tỷ lệ đa thai, n (%)	30 (33,0)	33 (40,2)	0,588
Tỷ lệ làm tổ (%)	53,30 ± 42,03	59,15 ± 41,67	0,36
Tỷ lệ sẩy thai 12 tuần, n (%)	4 (4,4)	6 (7,3)	0,62
Tỷ lệ thai diễn tiến, n (%)	58 (63,7)	54 (65,9)	0,895
Tỷ lệ sẩy thai 24 tuần, n (%)	5 (5,5)	2 (2,4)	0,527
Tỷ lệ sinh sống, n (%)	53 (58,2)	52 (63,4)	0,589

Ở nhóm 1 có 82 bệnh nhân quay lại chuyển phôi trữ và nhóm 2 là 91 bệnh nhân. Số phôi nang chuyển trung bình của hai nhóm là (1,90 và 1,90; p = 0,977), kết quả cũng tương đương ở số phôi tốt được chuyển (1,62 và 1,70; p = 0,365). Kết quả cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm về tỷ lệ thai lâm sàng, tỷ lệ làm tổ và tỷ lệ sẩy thai (68,1% và 73,2%; p = 0,576; 53,3% và 59,1%; p = 0,36; 4,4% và 7,3%; p = 0,62).

4. BÀN LUẬN

Mục đích của nghiên cứu là để xác định việc nuôi cấy phôi trong môi trường đơn bước không thay mới môi trường vào ngày 3 có giúp tăng khả năng phát triển của phôi so với việc có thay mới môi trường hay không. Một đơn vị TTON khi tiến hành quy trình thay mới môi trường vào ngày 3 cần tuân thủ những yêu cầu nghiêm ngặt để đảm bảo điều kiện nuôi cấy khi đem phôi ra ngoài như sự thay đổi nhiệt độ, ánh sáng, nồng độ O₂ và CO₂ (Cohen và cộng sự, 1997) [4]. Cần đảm bảo các thành phần vật chất khác có thể ảnh hưởng đến phôi như các phân tử bụi, VOC và chất khử trùng. Nghiên cứu của Võ Nguyên Thức năm 2017 [5] kết quả về tỷ lệ tạo phôi nang giữa hai loại môi trường đơn bước và chuyển tiếp là tương đương nhau. Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam thực hiện so sánh hiệu quả tạo phôi nang khi nuôi cấy phôi trong môi trường đơn bước giữa thay mới và không thay mới môi trường vào ngày 3. Một nghiên cứu của Costa-Borges năm 2016 [6], tác giả thực hiện so sánh giữa việc thay mới và không thay mới môi trường từ trứng người cho và đánh giá trên hệ thống Timelapse (EmbryoScope), kết quả đạt được tỷ lệ tạo phôi nang giữa hai nhóm không có khác biệt cũng như tỷ lệ thai lâm sàng, tỷ lệ làm tổ không khác biệt có ý nghĩa thống kê [6]. Kết quả của chúng tôi cũng cho kết quả tương đồng. Nhiều tác giả cho rằng nuôi cấy phôi nang không làm gián đoạn môi trường ở ngày 3 cho tỷ lệ tạo

phôi nang cao hơn (Reed và cộng sự, 2009; Vermilyea và cộng sự, 2012) [7,8]. Kết quả của chúng tôi cũng cho thấy việc không thay mới môi trường vào ngày 3 cho tỷ lệ tạo phôi nang có xu hướng cao hơn nhóm có thay mới, mặc dù không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, việc không thay mới môi trường không làm giảm chất lượng phôi nang và kết quả chuyển phôi.

Ứng dụng phương pháp nuôi cấy phôi nang không thay mới môi trường không chỉ không làm giảm chất lượng phôi mà còn giúp ngăn cản sự thay đổi đột ngột của môi trường nuôi cấy đến quá trình phát triển của phôi như nhiệt độ và độ pH.

5. KẾT LUẬN

Dữ liệu từ nghiên cứu cho thấy việc thay mới và không thay mới môi trường vào ngày 3 cho khả năng tạo phôi nang hữu dụng tương đương nhau, đồng thời khi đánh giá kết quả điều trị trong lần chuyển phôi trữ đầu tiên cho thấy không có sự khác biệt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bigger JD, Racowsky C. The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM(AA) medium: is a two-step protocol necessary? *Reprod Biomed Online*. 2002 Sep-Oct; 5(2): 133-40.
2. Macklon NS, Pieters MH, Hassan MA, Jeucken PH, Eijkemans MJ, Fauser BC. A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in-vitro human blastocyst development. *Hum Reprod*. 2002;17:2700-05
3. Swain J.E., et al. Microdrop preparation factors influence culture-media osmolality, which can impair mouse embryo preimplantation development. *Reproductive Bio-Medicine Online*. 2012; 24(2): 142-7.
4. Cohen J, Gilligan A, Esposito W, Schimmel T, Dale B.

Ambient air and its potential effects on conception in vitro. *Hum Reprod.* 1997; 12:1742-47.

5. Võ Nguyên Thức, Nguyễn Ngọc Quỳnh, Phạm Dương Toàn, Huỳnh Gia Bảo, Đặng Quang Vinh. So sánh hiệu quả tạo phôi nang giữa hai loại môi trường nuôi cấy đơn bước và nuôi cấy chuyển tiếp. *Tạp Chí Phụ sản.* 2017; 14(4):97-101.

6. Nuno Costa-Borges, Ph.D., Marta Belles, M.Sc., Marcos Meseguer, Ph.D., Daniela Galliano, M.D., Agustin Ballesteros, M.D., and Gloria Calderon, Ph.D. Blastocyst development in single medium with or without renewal

on day 3: a prospective cohort study on sibling donor oocytes in a time-lapse incubator. *Fertility and Sterility.* 2016; 105(3): 707-13.

7. Reed ML, Hamic A, Thompson DJ, Caperton CL. Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study. 2009; 92(5):1783-6.

8. Vermilyea M, Anthony J, Graham J, Tucker M. Op-3 Clinical Outcomes from an Uninterrupted Culture Medium Protocol. *Reprod BioMed Online.* 2012; 24:S2-S2.