



Hội thảo SGART lần thứ 5

Chọn lựa giao tử – phôi Nuôi cấy phôi nang

Khách sạn Equatorial, thứ bảy ngày 15/12/2012

Mọi sao chép, trích dẫn phải được sự đồng ý của HOSREM hoặc của tác giả.

© HOSREM 2012

CHƯƠNG TRÌNH

07:15 Đón tiếp đại biểu

08:00 Khai mạc

PHIÊN I. LÀM SAO CHỌN LỰA GIAO TỬ VÀ PHÔI TỐT NHẤT TRONG HỖ TRỢ SINH SẢN

08:15 Đánh giá hình thái và chất lượng noãn trong IVF

ThS. Hà Thanh Quế (IVFAS)

08:30 Lựa chọn tinh trùng theo hình dạng – Kỹ thuật IMSI

ThS. Huỳnh Gia Bảo (IVFAS)

08:45 Chọn lựa tinh trùng dựa trên hoạt động sinh lý:
vai trò của Hyaluronic acid

ThS. Lê Thụy Hồng Khả (IVFAS)

09:00 Thảo luận

09:30 Giải lao

10:00 The quality of gametes and embryos do matter in improving ART outcome

Chất lượng giao tử và phôi cải thiện kết quả ART

TS. Liow Swee Lian (Bệnh viện Gleneagles – Singapore)

10:30 Đánh giá phôi giai đoạn phân chia dựa vào các đặc điểm hình thái của phôi

ThS. Trương Thị Thanh Bình (IVFAS)

10:45 Đánh giá hình thái phôi nang

ThS. Nguyễn Ngọc Quỳnh (IVF Vạn Hạnh)

11:00 Đồng thuận của VSRM về “Đánh giá và phân loại noãn, phôi
trong hỗ trợ sinh sản”

ThS. Đặng Quang Vinh (CGRH)



11:15 Thảo luận

11:45 Tiệc trưa và giải lao

PHIÊN II. NUÔI CẤY PHÔI NANG: NÊN hay KHÔNG NÊN

* Nên

13:30 Blastocyst culture and transfer improves IVF outcome

Nuôi cấy và chuyển phôi nang giúp cải thiện kết quả IVF

TS. Liow Swee Lian (Bệnh viện Gleneagles – Singapore)

14:00 Tham luận về “Nuôi cấy phôi nang”

ThS. Nguyễn Ngọc Quỳnh (IVF Vạn Hạnh)

CN. Võ Thiện Ân (Bệnh viện Hạnh Phúc)

BS. Vũ Đình Tuấn (Bệnh viện Hùng Vương)

* Không nên

14:45 Tại sao cần cân nhắc khi triển khai nuôi cấy phôi nang ở Việt Nam hiện nay?

ThS. Hồ Mạnh Tường (CGRH)

15:00 Kết quả thai của chuyển phôi ngày 2 ở các trường hợp tiên lượng tốt

ThS. Lê Hoàng Anh (IVFAS)

15:45 Thảo luận về quan điểm và kinh nghiệm nuôi cấy phôi nang

16:00 Tổng kết và bế mạc

MỤC LỤC

Phần I. Báo cáo hội trường

	Lý lịch khoa học báo cáo viên.....	1
I.1.	Đánh giá hình thái và chất lượng noãn trong IVF.....	29
	Hà Thanh Quế	
I.2.	Lựa chọn tinh trùng theo hình dạng – Kỹ thuật IMSI	43
	Huỳnh Gia Bảo	
I.3.	Chọn lựa tinh trùng dựa trên hoạt động sinh lý: vai trò của Hyaluronic acid	55
	Đặng Quang Vinh	
I.4.	The quality of gametes and embryos do matter in improving ART outcome	63
	Chất lượng giao tử và phôi cải thiện kết quả ART	85
	Liow Swee Lian	
I.5.	Đánh giá phôi giai đoạn phân chia dựa vào các đặc điểm hình thái của phôi	107
	Trương Thị Thanh Bình	
I.6.	Đánh giá hình thái phôi nang	121
	Nguyễn Ngọc Quỳnh, Phạm Dương Toàn, Đặng Quang Vinh	
I.7.	Đồng thuận của VSRM về “Đánh giá và phân loại noãn, phôi trong hỗ trợ sinh sản”	133
	VSRM	
I.8.	Blastocyst culture and transfer improves IVF outcome	135
	Nuôi cấy và chuyển phôi nang giúp cải thiện kết quả IVF	149
	Liow Swee Lian	



I.9.	Kết quả bước đầu triển khai nuôi cấy phôi nang tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Quốc tế Hạnh Phúc	163
	Võ Thiện Ân, Nguyễn Thị Kim Phượng, Huỳnh Thị Thu Thảo	
I.10.	Tương quan giữa chất lượng phôi ngày 3 và sự hình thành phôi ngày 5	171
	Vũ Đình Tuấn, Mai Kim Châu, Tăng Kim Hoàng Văn	
I.11.	Tại sao cần cân nhắc khi triển khai nuôi cấy phôi nang ở Việt Nam hiện nay?	183
	Hồ Mạnh Tường	
I.12.	Kết quả thai của chuyển phôi ngày 2 ở các trường hợp tiên lượng tốt	189
	Lê Hoàng Anh, Lâm Anh Tuấn, Hồ Mạnh Tường	

Phần II. Báo cáo poster

Lý lịch khoa học báo cáo viên	195
Hình dạng tinh trùng và phân mảnh DNA	197
Tăng Kim Hoàng Văn, Lâm Sơn Bích Trâm, Lê Đăng Khoa, Vũ Đình Tuấn	

BÁO CÁO HỘI TRƯỜNG



HÀ THANH QUẾ

thanhque2007@yahoo.com

ĐƠN VỊ CÔNG TÁC

- Chuyên viên phôi học, IVFAS, Bệnh viện An Sinh
- Chuyên viên phôi học, IVF Mekong, Bệnh viện Phụ Sản Quốc tế Phương Châu
- Điều phối viên dự án, A.R.T. Consulting, Ltd.

QUÁ TRÌNH ĐÀO TẠO VÀ BẰNG CẤP CHUYÊN MÔN

2010-nay	Đang theo học Thạc sĩ Di truyền học, Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP HCM
2006	Cử nhân Sinh học, Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP HCM

CHỨNG CHỈ / CHỨNG NHẬN

11/2010	Clinical Embryology & Laboratory Management Embryonics International, Gleneagles Hospital, Singapore (khóa 1 tháng)
07-06/2009	Lớp Sơ bộ Hỗ trợ sinh sản, IVF Vạn Hạnh và IVFAS (khóa 6 tháng)
2008	Lớp Soạn thảo văn bản và giải quyết tranh chấp phát sinh trong các hợp đồng thương mại quốc tế, Đại học Luật TP HCM



KINH NGHIỆM VÀ QUÁ TRÌNH LÀM VIỆC

- | | |
|-----------------|--|
| 05/2009-nay | <ul style="list-style-type: none">▪ Chuyên viên phôi học, IVFAS, Bệnh viện An sinh▪ Chuyên viên phôi học, IVF Mekong, Bệnh viện Phụ Sản Quốc tế Phương Châu▪ Chuyên viên-giảng viên chuyển giao công nghệ, A.R.T. Consulting▪ Nghiên cứu viên, Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản, Đại học Quốc gia TP HCM |
| 04/2007-05/2009 | Trợ lý giám đốc OTC Group, Korea United Pharm. INC |
| 08/2006-04/2007 | Chuyên viên Phôi học, Đơn vị Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Phụ sản Quốc tế Sài Gòn |

BÀI ĐĂNG SÁCH, BÁO VÀ TẠP CHÍ KHOA HỌC

1. Tác giả và đồng tác giả tham gia viết sách Thụ tinh trong ống nghiệm (Nhà xuất bản Giáo Dục, 2011)
2. Tham gia nhóm biên dịch Cẩm nang của Tổ chức Y tế Thế giới cho Xét nghiệm chẩn đoán và xử lý tinh dịch người (Nhà xuất bản Y học, 2011)
3. Bài đăng trên tạp chí khoa học ARBS (Annual Conference Of Asian Reproductive Biotechnology Society, 2006)
4. Tác giả và đồng tác giả một số bài báo cáo poster và oral cho các hội nghị IVF experts meeting, Hội nghị Kỹ thuật Hỗ trợ sinh sản lần II, The Pacific Rim Society for Fertility and Sterility

CÁC HOẠT ĐỘNG CHUYÊN NGÀNH KHÁC

- Giảng viên và trợ giảng Lớp Đào tạo sơ bộ chuyên khoa Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện An Sinh
- Giảng viên Khóa tập huấn Tinh dịch đồ (2010)

- Tham gia cùng chuyển giao công nghệ và các kỹ thuật liên quan cho Bệnh viện Phụ Sản Bán công Bình Dương, Bệnh viện An Sinh
- Tham gia tổ chức các khóa huấn luyện đào tạo kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm cho các trung tâm trong nước (Bệnh viện Phụ Sản Hải Phòng, Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội) và các nước trong khu vực (Myanmar, Indonesia, Philippines)
- Phối hợp cùng Hội Nội tiết sinh sản và Vô sinh TPHCM (HOSREM) tổ chức các hội thảo thực hành về tinh dịch đồ, vitrification, hỗ trợ thoát màng, kỹ thuật vi thao tác
- Hội viên HOSREM
- Thành viên nhóm Vô sinh nam (MIG - HOSREM)



HUỖNH GIA BẢO

hgbao@artconsulting.vn

ĐƠN VỊ CÔNG TÁC

Chuyên viên phôi học, IVFAS, Bệnh viện An Sinh (Phó lab)

QUÁ TRÌNH ĐÀO TẠO VÀ BẰNG CẤP CHUYÊN MÔN

2010-2012	Thạc sĩ Di truyền, Đại học Khoa học tự nhiên TP HCM
2006	Cử nhân Công nghệ sinh học, Đại học Khoa học tự nhiên TP HCM

CHỨNG CHỈ / CHỨNG NHẬN

08/2012	Certificate of Attendance Asia Pacific Fertility Expert Meeting, Sydney, Australia
02/2012	Certificate of Achievement High Impact Presentation Program, Dale Carnegie Training, Vietnam
01/2012	Certificate of Attendance Asian IVF in the genomic era, Chiang Mai University, Faculty of Medicine
08/2011	Certificate of Training Clinical Embryology and Laboratory Management, Gleneagles Hospital, Singapore
06/2010	Certificate of Attendance Update on Assisted Reproduction, The University of Hong Kong, Faculty of Medicine
03/2010	Certificate of Participation Gleneagles - life art Workshop, Singapore
11/2009	Certificate of Achievement Excellent Customer Service, Leads Training Institute of Management, Vietnam
07-12/2009	Certificate of Achievement Assisted Reproductive Techniques, A.R.T. Consulting, Vietnam

KINH NGHIỆM VÀ QUÁ TRÌNH LÀM VIỆC

04/2011-nay	Chuyên viên phôi học hợp tác, IVF Mekong, Bệnh viện Phụ sản Quốc tế Phương Châu
05/2009-nay	Chuyên viên phôi học hợp tác, IVFAS, Bệnh viện An Sinh
05/2009-nay	Chuyên viên phôi học, Bệnh viện Hy Vọng
01/2009-nay	Nhân viên tư vấn, Công ty TNHH Tư vấn Trọ sinh (A.R.T. Consulting Ltd.)
06/2007-nay	Chuyên viên phôi học hợp tác, IVF Vạn Hạnh, Bệnh viện đa khoa Vạn Hạnh

BÀI ĐĂNG TẠP CHÍ, SÁCH VÀ BÁO CÁO KHOA HỌC

1. Tác giả và đồng tác giả bài báo trên Tạp chí Công nghệ sinh học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2005), Thời sự Y học (2011), Tạp chí phụ sản (2012), Y học sinh sản (2012)
2. Đồng tác giả các sách: Thụ tinh trong ống nghiệm (2011), Cẩm nang xét nghiệm chẩn đoán và xử lý tình dịch người (WHO 2010) (2011)
3. Nhóm tác giả các bài báo cáo poster tại các hội nghị chuyên ngành trong nước và quốc tế
4. Báo cáo viên Hội nghị PRSFS, Hồng Kông (2011)
5. Báo cáo viên các Hội nghị do HOSREM tổ chức: Giới thiệu Cẩm nang WHO 2010 (2010), Kỹ thuật Hỗ trợ sinh sản: Thành tựu và triển vọng (2011), Nam học và Vô sinh nam (2012), IVF Expert Meeting 8 (2012)



CÁC HOẠT ĐỘNG CHUYÊN NGÀNH KHÁC

- Cộng tác viên, Hội Nội tiết sinh sản và Vô sinh TPHCM (HOSREM)
- Giảng viên hợp tác, Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản, Đại học Quốc gia TPHCM (CGRH)
- Chuyên viên tư vấn thiết kế trung tâm Thụ tinh trong ống nghiệm, Công ty TNHH Tư vấn Trợ sinh (A.R.T. Consulting, Ltd.)

LÊ THỤY HỒNG KHẢ

lthkha@artconsulting.vn

ĐƠN VỊ CÔNG TÁC

Trưởng labo, IVF Vạn Hạnh

QUÁ TRÌNH ĐÀO TẠO VÀ BẰNG CẤP CHUYÊN MÔN

- | | |
|------|--|
| 2009 | Thạc sĩ Sinh học, Đại học Khoa học tự nhiên TP HCM |
| 2002 | Cử nhân Sinh học, Đại học Khoa học tự nhiên TP HCM |

CHỨNG CHỈ / CHỨNG NHẬN

- | | |
|----------|---|
| 2010 | <p>Chứng chỉ Năng lực quản trị cho quản lý cấp trung, Trường doanh nhân PACE, Dự án Nghiên cứu khoa học, Đại học Y Dược TP HCM</p> |
| 2009 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Certificate of Leadership and Teamwork, Công ty Cổ phần Dịch vụ và Tư vấn phát triển nguồn nhân lực BCC ▪ Certificate of Train the Trainer, Công ty Cổ phần Dịch vụ và Tư vấn phát triển nguồn nhân lực BCC ▪ Chứng chỉ Đào tạo Kiến thức tâm lý và Kỹ năng ứng dụng trong công việc và cuộc sống, Trung tâm Đào tạo và Ứng dụng khoa học tâm lý Hồn Việt |
| 2008 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Certificate of How to balance works and life, Trường Đào tạo nhân lực liên thông ▪ Certificate of Public speaking, Trung tâm văn hóa Thanh niên |
| 2006-nay | Tham dự hội nghị chuyên ngành tại nhiều nước (Mỹ, Hàn Quốc, Singapore, Thái Lan, Hungary...) |



KINH NGHIỆM VÀ QUÁ TRÌNH LÀM VIỆC

10/2010-nay	Nghiên cứu viên, Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản, Khoa Y, Đại học Quốc gia TP HCM
05/2009-nay	▪ Trưởng labo IVF Vạn Hạnh, Bệnh viện đa khoa Vạn Hạnh ▪ Chuyên viên Phôi học hợp tác, IVFAS, Bệnh viện An Sinh
01/2008-nay	▪ Chuyên viên đào tạo chuyển giao công nghệ, A.R.T. Consulting, Ltd. ▪ Chuyên viên phôi học, Tổ Chuyên gia Thụ tinh trong ống nghiệm, Bệnh viện Phụ Sản Quốc tế Sài Gòn
01/2008-05/2009	Chuyên viên phôi học, IVF Vạn Hạnh, Bệnh viện đa khoa Vạn Hạnh
07/2005-12/2007	Chuyên viên phôi học, Khoa Hiếm muộn, Bệnh viện Từ Dũ
03/2003-07/2005	Cử nhân Sinh học, Phòng Xét nghiệm Nam khoa, Khoa Hiếm muộn, Bệnh viện Từ Dũ

CÁC HOẠT ĐỘNG CHUYÊN NGÀNH KHÁC

- Tham gia triển khai thành công lần đầu tiên tại Việt Nam các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản mới (trữ lạnh trứng/phôi bằng thủy tinh hóa, IVM, hỗ trợ thoát màng bằng Tyrode và laser)
- Hướng dẫn chính Đào tạo Sơ bộ chuyên khoa Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Từ Dũ (2005-2007)
- Trợ giảng lớp Đào tạo Sơ bộ chuyên khoa Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Từ Dũ (2003, 2004)
- Tham gia chuyển giao công nghệ thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) cùng các kỹ thuật liên quan cho Bệnh viện Trung ương Huế, Bệnh viện Phụ Sản Bán công Bình Dương, Bệnh viện An Sinh

- Tổ chức các khóa huấn luyện đào tạo kỹ thuật TTON cho các trung tâm trong nước (Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội, Bệnh viện Phụ Sản Thanh Hóa, Bệnh viện Phụ Sản Hải Phòng, Trung tâm Công nghệ phôi-Học viện Quân y, Bệnh viện Phụ Sản Trung ương, Bệnh viện Phụ Sản Quốc tế Sài Gòn) và các nước trong khu vực (Myanmar, Thái Lan, Malaysia, Indonesia, Philipines, Singapore)
- Tham gia hướng dẫn các hội thảo thực hành về bơm tinh trùng vào buồng tử cung, hỗ trợ thoát màng, kỹ thuật vi thao tác
- Báo cáo chính tại các hội nghị chuyên ngành trong nước và ngoài nước (oral và poster)
- Tác giả và đồng giả của nhiều đề tài nghiên cứu
- Thành viên hội chuyên ngành: SGART (HOSREM)

BẰNG KHEN VÀ GIẢI THƯỞNG

Giấy khen của Sở Y tế TPHCM (cho công trình TTON) năm 2006



LIOW SWEE LIAN

ĐƠN VỊ CÔNG TÁC

- Giám đốc Science IVF Center, Novena Specialist Center
- Cố vấn chuyên môn, Embryonics International, O & G Partners Fertility Centre, Gleneagles Hospital, Singapore

QUÁ TRÌNH ĐÀO TẠO VÀ BẰNG CẤP CHUYÊN MÔN

- 2006 Tiến sĩ chuyên ngành Di truyền sinh học phân tử, Singapore
- 1995 Thạc sĩ chuyên ngành Sinh học sinh sản, Singapore
- 1990 Giấy phép về Phôi học lâm sàng do Bộ Y tế Singapore cấp
- 1986 Bác sĩ thú y, Malaysia

CHỨNG CHỈ / CHỨNG NHẬN

Được đào tạo chuyên môn trong và ngoài nước tại các trung tâm như:

- Wicell Research Institute, Wisconsin, Mỹ
Human Embryonic Stem Cell Culture Methods, Mỹ
- Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD), Đại học London, Anh
- Laser Micromanipulation, Đại học Heidelberg, Đức

KINH NGHIỆM VÀ QUÁ TRÌNH LÀM VIỆC

Có nhiều kinh nghiệm chuyên môn, là một trong những người tiên phong trong kỹ thuật SUZI, ICSI, AH và các kỹ thuật về thao tác laser

BÀI ĐĂNG SÁCH, BÁO VÀ TẠP CHÍ KHOA HỌC

1. Là tác giả và đồng tác giả với nhiều nghiên cứu được đăng trên các tạp chí quốc tế và xuất bản sách tham khảo. Các nghiên cứu bao gồm: sự phân mảnh DNA ở tinh trùng, trữ lạnh mô buồng trứng, trữ lạnh trứng và phôi bằng thủy tinh hóa, hệ thống nuôi cấy phôi, sinh học tế bào gốc, nhân bản vô tính phôi nang...
2. Được mời tham gia báo cáo nhiều hội nghị trong và ngoài nước



TRƯƠNG THỊ THANH BÌNH

tttbinh@artconsulting.vn

ĐƠN VỊ CÔNG TÁC

Chuyên viên phôi học-labo, IVFAS, Bệnh viện An Sinh

QUÁ TRÌNH ĐÀO TẠO VÀ BẰNG CẤP CHUYÊN MÔN

- | | |
|------|---|
| 2011 | Thạc sĩ Sinh học, Chuyên ngành Sinh lý Người và Động vật,
Đại học Khoa học tự nhiên TP HCM, Đại học Quốc gia TP HCM |
| 2009 | Cử nhân Công nghệ sinh học,
Chuyên ngành Công nghệ sinh học Y dược,
Đại học Khoa học tự nhiên TP HCM, Đại học Quốc gia TP HCM |

CHỨNG CHỈ / CHỨNG NHẬN

- | | |
|------|--|
| 2010 | Khóa đào tạo về Phôi học lâm sàng và quản lý labo thụ tinh trong ống nghiệm, Embryonics International, Bệnh viện Gleneagles, Singapore |
| 2008 | <ul style="list-style-type: none">Tham dự hội nghị và hội thảo thực hành PGD, Đại học Chiangmai, Thái LanKhóa đào tạo về PGD, Đại học Chiangmai, Thái Lan |
| 2006 | Khóa học Leadership and teamwork |

KINH NGHIỆM VÀ QUÁ TRÌNH LÀM VIỆC

- | | |
|----------|--|
| 2009-nay | Chuyên viên phôi học, IVFAS, Bệnh viện An Sinh |
| 2008-nay | Nhân viên tư vấn, A.R.T. Consulting, Ltd. |

- 2008-2009 Nhân viên hợp tác-Chuyên viên phôi học,
IVF Vạn Hạnh, Bệnh viện đa khoa Vạn Hạnh
- 2006-2008 Nhân viên labo xét nghiệm tinh trùng và labo thụ tinh trong
ống nghiệm, Khoa Hiếm muộn, Bệnh viện Từ Dũ

BÀI ĐĂNG SÁCH, BÁO VÀ TẠP CHÍ KHOA HỌC

1. Báo cáo poster và oral tại các hội nghị chuyên ngành Vô sinh và Hiếm muộn trong nước
2. Trữ lạnh mô tinh hoàn ở những trường hợp vô tinh bế tắc ở nam giới. Thời sự y học (2009), số 36, trang 3-6
3. Đồng tác giả Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ (PGD) trong thụ tinh trong ống nghiệm. Thời sự y học (2010), số 56, trang 3-8
4. Nghiên cứu thiết lập qui trình chẩn đoán di truyền tiền làm tổ trên phôi người. Y học TPHCM, tập 16, phụ bản số 1 (2012), trang 169-174
5. Đồng tác giả Hoạt hóa noãn bằng calcicum inophore sau tiêm tinh trùng vào bào tương noãn. Thời sự y học (2011), số 66, trang 3-6

CÁC HOẠT ĐỘNG CHUYÊN NGÀNH KHÁC

- Tham gia triển khai thành công lần đầu tiên tại Việt Nam các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản mới (trữ lạnh mô tinh hoàn, IVM, hỗ trợ thoát màng bằng Tyrode và laser)
- Tham gia hướng dẫn các khóa huấn luyện đào tạo kỹ thuật TTTON cho các trung tâm trong nước (Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội, Bệnh viện Phụ Sản Thanh Hóa, Bệnh viện Phụ Sản Hải Phòng, Bệnh viện Phụ Sản Trung ương) và các nước trong khu vực (Myanmar, Thái lan, Malaysia, Indonesia, Philipines, Singapore)
- Tham gia cùng Hội Nội tiết Sinh sản và Vô sinh TPHCM (HOSREM) tổ chức các hội thảo thực hành về hỗ trợ thoát màng, kỹ thuật vi thao tác, hội thảo thực hành tinh dịch đồ và bơm tinh trùng vào buồng tử cung
- Tham gia đợt chuyển giao công nghệ ICSI tại chỗ cho Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội



- Thành viên Tiểu ban Nghiên cứu khoa học, Hội Nội tiết sinh sản và Vô sinh TPHCM (HOSREM)

BẰNG KHEN VÀ GIẢI THƯỞNG

Giải nhất giải Thành tựu 2011 cho tập thể, đề tài “Thiết lập qui trình kỹ thuật trong chẩn đoán tiền làm tổ (PGD) các phôi thụ tinh trong ống nghiệm” do HOSREM trao tặng

NGUYỄN NGỌC QUỲNH

nnquynh@artconsulting.vn

ĐƠN VỊ CÔNG TÁC

Đơn vị Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện đa khoa Vạn Hạnh

QUÁ TRÌNH ĐÀO TẠO VÀ BẰNG CẤP CHUYÊN MÔN

2005 Cử nhân Sinh học, Chuyên ngành Vi sinh,
Đại học Khoa học tự nhiên TPHCM, Đại học Quốc gia TPHCM

CHỨNG CHỈ / CHỨNG NHẬN

2011 Tham gia hội nghị chuyên ngành tại Thái Lan, Singapore
2010 Tham gia hội nghị chuyên ngành tại Ý
2009 Tham dự các hội nghị chuyên ngành và tu nghiệp ngắn hạn
tại Singapore

KINH NGHIỆM VÀ QUÁ TRÌNH LÀM VIỆC

09/2009-nay Chuyên viên tư vấn-chuyển giao công nghệ,
A.R.T. Consulting Ltd.
08/2009-nay Chuyên viên phôi học, Đơn vị hỗ trợ sinh sản,
Bệnh viện đa khoa Vạn Hạnh
11/2006-04/2009 Chuyên viên phôi học, Đơn vị Hỗ trợ sinh sản,
Khoa Hiếm muộn, Bệnh viện Từ Dũ
09/2005-11/2006 Chuyên viên Phòng xét nghiệm Nam khoa, Khoa Hiếm muộn,
Bệnh viện Từ Dũ



BÀI ĐĂNG SÁCH, BÁO VÀ TẠP CHÍ KHOA HỌC

1. Đồng tác giả Thụ tinh trong ống nghiệm. Nhà xuất bản Giáo Dục (2011)
2. Báo cáo poster tại các hội nghị chuyên ngành trong nước

CÁC HOẠT ĐỘNG CHUYÊN NGÀNH KHÁC

- Trợ giảng phần lý thuyết và thực hành về labo, lớp Đào tạo sơ bộ chuyên khoa Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Từ Dũ (2007)
- Tham gia huấn luyện đào tạo các lớp ngắn hạn, dài hạn tại IVF Vạn Hạnh
- Phối hợp cùng Hội Nội tiết sinh sản và Vô sinh TPHCM (HOSREM) tham gia hướng dẫn thực hành các khóa tinh dịch đồ, bơm tinh trùng vào buồng tử cung, hỗ trợ thoát màng, kỹ thuật vi thao tác, trữ lạnh...
- Thành viên SGART, Hội Nội tiết sinh sản và Vô sinh TPHCM (HOSREM)
- Nghiên cứu viên hợp tác, Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản, Khoa Y, Đại học Quốc gia TPHCM

ĐẶNG QUANG VINH

dqvinh@artconsulting.vn

ĐƠN VỊ CÔNG TÁC

Cán bộ giảng, Khoa Y, Đại học Quốc gia TP HCM

QUÁ TRÌNH ĐÀO TẠO VÀ BẰNG CẤP CHUYÊN MÔN

- | | |
|------|--|
| 2002 | Thạc sĩ Phôi học lâm sàng, Đại học Quốc gia Singapore |
| 1999 | Bác sĩ đa khoa, Trung tâm Đào tạo và Bồi dưỡng cán bộ y tế |

CHỨNG CHỈ / CHỨNG NHẬN

- | | |
|-----------------|---|
| 11/2010 | Khóa học Neuroendocrinology and Female reproduction, International School of Gynecological and Reproductive Endocrinology, Venice, Ý |
| 05/2010 | Chứng chỉ hoàn thành Khóa Y học chứng cứ, Đại học Y Dược TP HCM |
| 03/2010 | Chứng chỉ hoàn thành Khóa Sư phạm Y học nâng cao, Đại học Y Dược TP HCM |
| 10/2009-04/2010 | Khóa học Giám đốc chất lượng, Viện Nghiên cứu Kinh tế Phát triển, Đại học Kinh tế TP HCM |
| 2009 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Khóa học Leadership and Teamwork ▪ Chứng chỉ hoàn thành Khóa Sư phạm Y học cơ bản, Đại học Y Dược TP HCM |
| 2008 | Khóa How to balance works and life, Trường Đào tạo Nhân lực Liên Thông |
| 2007 | Khóa Managerial skills, Trường Đào tạo Nhân lực Liên Thông |



2006	Khóa Public Speaking, Trường Đào tạo Nhân lực Liên Thông
2005-nay	▪ Tham dự các hội nghị chuyên ngành tại Mỹ, Canada, Hàn Quốc, Pháp, Singapore, Thái lan... ▪ Tu nghiệp ngắn hạn tại Úc, Hàn Quốc, Nhật

KINH NGHIỆM VÀ QUÁ TRÌNH LÀM VIỆC

07/2010-nay	▪ Nghiên cứu viên, Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản (CGRH) ▪ Cán bộ giảng, Khoa Y, Đại học Quốc gia TP HCM
05/2005-nay	Bác sĩ hợp tác và cố vấn các bệnh viện và đơn vị: Bệnh viện Phụ Sản Quốc tế Sài Gòn, IVF Vạn Hạnh, IVFAS, IVF Mekong
01/2000-07/2007	Bác sĩ lâm sàng, Chuyên viên phôi học lâm sàng, Khoa Hiếm muộn, Bệnh viện Từ Dũ

ĐÀO TẠO VÀ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

- Tham gia triển khai thành công lần đầu tiên tại Việt Nam các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản mới
- Giảng viên chính, Lớp Đào tạo sơ bộ chuyên khoa Hỗ trợ Sinh sản, Bệnh viện Từ Dũ (2003-2007)
- Tham gia tư vấn thiết kế mới trung tâm TTTON, xây dựng quy trình hoạt động và chuyển giao công nghệ TTTON cùng các kỹ thuật liên quan cho các trung tâm TTTON tại Việt Nam
- Phối hợp cùng Hội Nội tiết sinh sản và Vô sinh TP HCM (HOSREM) tổ chức các hội thảo lý thuyết và thực hành trong TTTON

- Báo cáo tại các hội nghị chuyên ngành trong và ngoài nước
- Tham gia biên soạn 3 sách chuyên ngành (Nhà xuất bản Y học và Nhà xuất bản Tổng hợp)
- Tác giả và đồng giả của trên 30 đề tài nghiên cứu (1 đề tài nghiên cứu cấp Thành phố, 1 đề tài nghiên cứu cấp Bộ)

CÁC HOẠT ĐỘNG CHUYÊN NGÀNH KHÁC

- Thành viên Tiểu ban Nghiên cứu khoa học, Ủy viên Ban Chấp hành khóa II (2010-2015), Hội Nội tiết sinh sản và Vô sinh TPHCM (HOSREM)
- Thành viên Tổ chuyên viên dự án, Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản, Khoa Y, Đại học Quốc gia TPHCM
- Ủy viên Hội đồng đánh giá và nghiệm thu đề tài khoa học về Y-Sinh học, Sở Khoa học công nghệ TPHCM

BẰNG KHEN VÀ GIẢI THƯỞNG

- | | |
|------|---|
| 2006 | Giấy khen của Sở Y tế TPHCM (cho công trình TTTON) |
| 2005 | Giải thưởng Khoa học Công nghệ TPHCM (nhóm tác giả) |



VÕ THIỆN ÂN

thienan.khtn@gmail.com

ĐƠN VỊ CÔNG TÁC

Trung tâm Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Quốc tế Hạnh Phúc

QUÁ TRÌNH ĐÀO TẠO VÀ BẰNG CẤP CHUYÊN MÔN

2011 Cử nhân Công nghệ sinh học, Đại học Khoa học tự nhiên,
Đại học Quốc gia TP HCM

CHỨNG CHỈ / CHỨNG NHẬN

05/2012-08/2012 Chứng chỉ Kiến thức và Kỹ năng cơ bản trong labo hỗ trợ
sinh sản, Khoa Y, Đại học Quốc gia TP HCM

KINH NGHIỆM VÀ QUÁ TRÌNH LÀM VIỆC

05/2011-nay Chuyên viên phôi học, Trung tâm Hỗ trợ sinh sản,
Bệnh viện Quốc tế Hạnh Phúc

CÁC HOẠT ĐỘNG CHUYÊN NGÀNH KHÁC

Hội viên Hội Nội tiết sinh sản và Vô sinh TP HCM (HOSREM)

VŨ ĐÌNH TUÂN

drtuanvu1977@gmail.com

ĐƠN VỊ CÔNG TÁC

Bác sĩ điều trị, IVF Lab, Khoa Hiếm muộn, Bệnh viện Hùng Vương

QUÁ TRÌNH ĐÀO TẠO VÀ BẰNG CẤP CHUYÊN MÔN

2001 Bác sĩ đa khoa hệ dài hạn, Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

CHỨNG CHỈ / CHỨNG NHẬN

2012 Chứng chỉ Thực hành nghiên cứu lâm sàng tốt, HOSREM

2011 Chứng chỉ Thực hành sinh thiết phôi bào và cố định tế bào trong PGD, Bệnh viện Từ Dũ

2008 ▪ Chứng chỉ Kỹ thuật Hỗ trợ phôi thoát màng, HOSREM
 ▪ Chứng chỉ Y học Sư phạm, Đại học Y Dược TPHCM

2007 Chứng nhận Phẫu thuật nội soi trong Phụ khoa, Bệnh viện Từ Dũ

2005 Chứng nhận sơ bộ chuyên khoa Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Từ Dũ

2002 Chứng chỉ Kỹ thuật thụ tinh thân tạo, Bệnh viện Từ Dũ

KINH NGHIỆM VÀ QUÁ TRÌNH LÀM VIỆC

2011-nay Trưởng phòng IVF Lab, Khoa Hiếm muộn, Bệnh viện Hùng Vương

2008-2010 Bác sĩ Phó phòng Lab, phụ trách Ngân hàng tinh trùng, Khoa Hiếm muộn, Bệnh viện Phụ Sản Quốc tế Sài Gòn

2002-2007 Bác sĩ Khoa Hiếm muộn, Bệnh viện Phụ Sản Quốc tế Sài Gòn



BÁO CÁO KHOA HỌC

1. Hệ thống nuôi cấy phôi: một số quan điểm mới. Báo cáo poster tại Hội nghị Khoa học thường niên HOSREM lần VIII, 2012
2. Lựa chọn dạng trương phòng nào cho hiệu quả ICSI tối ưu?. Báo cáo hội trường Bệnh viện Hùng Vương. Hội nghị IVF Expert Meeting VIII, 2012
3. Đánh giá kết quả bước đầu thực hiện kỹ thuật hỗ trợ phôi thoát màng tại Bệnh viện Phụ Sản Quốc tế Sài Gòn. Báo cáo hội trường. Hội nghị IVF Expert Meeting V, 2009
4. Kết quả thực hiện ICSI kết hợp kỹ thuật chọc hút tinh trùng tại Bệnh viện Hùng Vương. Hội nghị Hiếm muộn toàn quốc lần II
5. Đánh giá kết quả bước đầu thực hiện phác đồ antagonist tại Bệnh viện Phụ Sản Quốc tế Sài Gòn. Hội nghị IVF Expert Meeting IV, 2008
6. Đồng tác giả 1 bài báo cáo poster và đồng tác giả 1 bài báo cáo hội trường

CÁC HOẠT ĐỘNG CHUYÊN NGÀNH KHÁC

- Hội viên Hội Nội tiết sinh sản và Vô sinh TPHCM (HOSREM)
- Thành viên Male Infertility Group (HOSREM)

HỒ MẠNH TƯỜNG

hmtuong@hcmvnu.edu.vn

ĐƠN VỊ CÔNG TÁC

- Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản (CGRH), Khoa Y, Đại học Quốc gia TP HCM
- Tổng Thư ký Hội Nội tiết sinh sản và Vô sinh TP HCM (HOSREM)

QUÁ TRÌNH ĐÀO TẠO VÀ BẰNG CẤP CHUYÊN MÔN

2008	Master of Business Administration, Maastricht School of Management, The Netherlands
1999	Master in Clinical Embryology, National University of Singapore, Singapore
1993	Bác sĩ Y khoa, Đại học Y Dược TP HCM

CHỨNG CHỈ / CHỨNG NHẬN

06/2012	Tập huấn về Quản lý chương trình TTON, Đại học Adelaid, Úc
03/2012	Tập huấn về Kỹ thuật hỗ trợ sinh sản, Đại học Stanford, Mỹ
11/2011	Tập huấn về Kích thích buồng trứng trong TTON, Đại học Lubeck, Đức
11/2011	Chứng nhận tập huấn GCP, Bộ Y tế
10/2010	Certificate of Neuroendocrinology and Female Reproduction, International School of Gynecological and Reproductive Endocrinology, Venice, Italy
03/2010	Chứng chỉ Sư phạm Y học nâng cao, Đại học Y Dược TP HCM



03/2006	Certificate Strategic Healthcare Management, Marcus Evans, Bangkok, Thailand
12/2003-01/2004	Chứng chỉ Sư phạm Y học, Đại học Y Dược TPHCM
01-09/2001	Chứng nhận Khóa huấn luyện Nghiên cứu khoa học về Sức khỏe sinh sản, Đại học Y Dược TPHCM và Population Council
03-05/1997	Chứng nhận đào tạo Thụ tinh trong ống nghiệm về lâm sàng và sinh học, Bệnh viện Đại học Clermont-Ferrand, Pháp

KINH NGHIỆM VÀ QUÁ TRÌNH LÀM VIỆC

10/2010-nay	▪ Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản (CGRH), Khoa Y, Đại học Quốc gia TPHCM ▪ Giảng viên Khoa Y, Đại học Quốc gia TPHCM
2010-nay	Giảng viên Bộ môn Giải phẫu học và Mô phôi, Khoa Y, Đại học Quốc gia TPHCM
05/2009-nay	Trưởng Đơn vị IVFAS, Bệnh viện An Sinh
2007-nay	Cố vấn chuyên môn cho nhiều đơn vị hỗ trợ sinh sản cả nước
2005-nay	Giảng viên thỉnh giảng Bộ môn Mô phôi và Di truyền, Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch
1993-2007	Bác sĩ Bệnh viện Từ Dũ

BÀI ĐĂNG BÁO VÀ BÁO CÁO KHOA HỌC

1. Tác giả và đồng tác giả 7 quyển sách về Y học
2. Tác giả và đồng tác giả hơn 70 báo cáo khoa học đăng tải trên các tạp chí Y học ở Việt Nam về vô sinh và các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản

3. Đồng tác giả 5 bài báo trên tạp chí chuyên ngành Y học quốc tế
4. Báo cáo viên tại nhiều hội nghị chuyên ngành Y học ở Việt Nam từ năm 2000
5. Trên 20 báo cáo (oral và poster) trình bày tại các hội nghị khoa học khu vực và quốc tế. Trong đó, được là khách mời báo cáo (invited speaker) tại nhiều hội nghị chuyên ngành khu vực và quốc tế

CÁC HOẠT ĐỘNG CHUYÊN NGÀNH KHÁC

- Thành viên Ban Chấp hành Hội Sinh sản Châu Á-Thái Bình Dương (ASPIRE)
- Phó Tổng thư ký và thành viên Ban Chấp hành Hội Phụ Sản khoa và Sinh đẻ có kế hoạch Việt Nam (VINAGOFPA)
- Phó Tổng thư ký-Ủy viên Ban Chấp hành Chi hội Y học sinh sản Việt Nam (VSRM)
- Phó Tổng biên tập, Tạp chí Phụ Sản (VINAGOFPA)
- Thành viên Ban Biên tập, Nội san Y học Sinh sản, Hội Nội tiết sinh sản và Vô sinh TPHCM (HOSREM)
- Ủy viên thư ký Hội đồng khoa học, Nhóm ngành Khoa học sức khỏe, Đại học Quốc gia TPHCM
- Ủy viên Hội đồng đánh giá và nghiệm thu cho nhiều đề tài khoa học về Y-Sinh học của Sở Khoa học công nghệ TPHCM
- Đồng chủ nhiệm đề tài nghiên cứu cấp Thành phố, Thiết lập quy trình chẩn đoán di truyền phôi người trước làm tổ (PGD), 2009
- Chủ nhiệm, đồng chủ nhiệm và nghiên cứu viên nhiều đề tài nghiên cứu khoa học cấp Đại học Quốc gia TPHCM và cấp Cơ sở
- Hội viên, Hội Sinh sản người và Phôi học Châu Âu (ESHRE)



LÊ HOÀNG ANH

eros2552@yahoo.com

ĐƠN VỊ CÔNG TÁC

Đơn vị Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện An Sinh

QUÁ TRÌNH HỌC TẬP VÀ BẰNG CẤP CHUYÊN MÔN

2007-2011 Thạc sĩ Sinh học, Đại học Khoa học tự nhiên TP HCM,
Đại học Quốc gia TP HCM

2002-2006 Cử nhân Sinh học, Đại học Khoa học tự nhiên TP HCM,
Đại học Quốc gia TP HCM

CHỨNG CHỈ / CHỨNG NHẬN

03-04/2011 Khóa cơ bản về Hỗ trợ sinh sản dành cho chuyên viên phôi học,
CREST, National University Hospital of Singapore, Singapore

QUÁ TRÌNH LÀM VIỆC VÀ NƠI CÔNG TÁC

2011-nay Chuyên viên phôi học, Bệnh viện An Sinh

2010-nay Nhân viên, A.R.T. Consulting Ltd.

2010-2011 Chuyên viên phôi học, Bệnh viện đa khoa Vạn Hạnh

2009-2010 Cán bộ phòng Công nghệ sinh học Y Dược,
Trung tâm Công nghệ sinh học TP HCM

BÀI ĐĂNG TẠP CHÍ, SÁCH VÀ BÁO CÁO KHOA HỌC

1. Mối tương quan giữa số lượng noãn chọc hút và tỉ lệ thành công trong điều trị hiếm muộn. Báo cáo poster hội nghị CAR 07/2011, Quy Nhơn.
2. Đồng dịch giả Cẩm nang của Tổ chức Y tế Thế giới cho xét nghiệm chẩn đoán và xử lý tình dục người, ấn bản lần V-2010.



ĐÁNH GIÁ HÌNH THÁI VÀ CHẤT LƯỢNG NOÃN TRONG IVF

Hà Thanh Quế

IVFAS

Đánh giá hình thái noãn trong thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) cho đến thời điểm hiện nay, vẫn được xem là một công cụ quan trọng trong lĩnh vực phôi học lâm sàng. Tiềm năng phát triển của phôi bị ảnh hưởng trực tiếp bởi quá trình trưởng thành noãn về nhân (phân bào giảm nhiễm) và tế bào chất giai đoạn trước khi rụng. Van Blerkom và Henry lần đầu tiên đề cập đến cụm từ “cytoplasmic dysmorphisms” vào năm 1992, đây là các dấu hiệu bất thường tế bào chất hoặc một số khiếm khuyết nhất định ở noãn, mà căn cứ vào đó có thể đánh giá tương đối tiềm năng phát triển của phôi giai đoạn sớm. Noãn mang các dấu hiệu “bất thường” này khi thất bại thụ tinh với IVF cổ điển, cũng sẽ thất bại khi tiến hành ICSI, chỉ một số trường hợp là có khả năng phát triển bình thường đến giai đoạn đầu của quá trình tiền làm tổ. Tuy nhiên, tần số phôi có thể đạt đến giai đoạn blastocyst rất thấp.

Việc xác định các đặc điểm hình thái noãn cung cấp nhiều thông tin cần thiết giúp đánh giá tiềm năng thành công trong TTTON, tuy nhiên vẫn còn quá ít thông tin về (i) nguồn gốc tạo nên các đặc điểm hình thái này, (ii) nếu có thể xác định được, thì khi nào và làm thế nào chúng có thể làm đảo lộn quá trình phát triển bình thường, và (iii) tác động của chúng có liên quan đến việc biểu hiện của các phân tử trong con đường truyền tín hiệu hay không. Vì vậy, ngày càng có nhiều nghiên cứu về những đặc điểm hình thái của noãn được tiến hành nhằm tìm ra mối liên quan giữa hình thái noãn với kết quả thụ tinh, chất lượng hợp tử và phôi nhằm ứng dụng vào quá trình điều trị.

Bên cạnh đó, đánh giá chất lượng noãn có thể sàng lọc được một số bất thường về di truyền để có hướng xử lý phù hợp. Tuy nhiên, việc xây dựng phương pháp đánh giá nhằm khai thác triệt để các giá trị thông tin giúp mang lại hiệu quả thực sự vẫn còn nhiều tranh cãi. Với mục đích cập nhật thông tin, cũng như cung cấp một số



nền tảng kiến thức dựa trên sự thống nhất của các chuyên gia phôi học lâm sàng, bài viết này sẽ khái quát một số yếu tố tác động cũng như ghi nhận một số đặc điểm hình thái noãn dựa theo “The Atlas of Human Embryology: From Oocytes to Pre-implantation Embryos” của Cristina Magli và cộng sự (2012) và đồng thuận về đánh giá noãn/phôi tổ chức ở Istanbul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

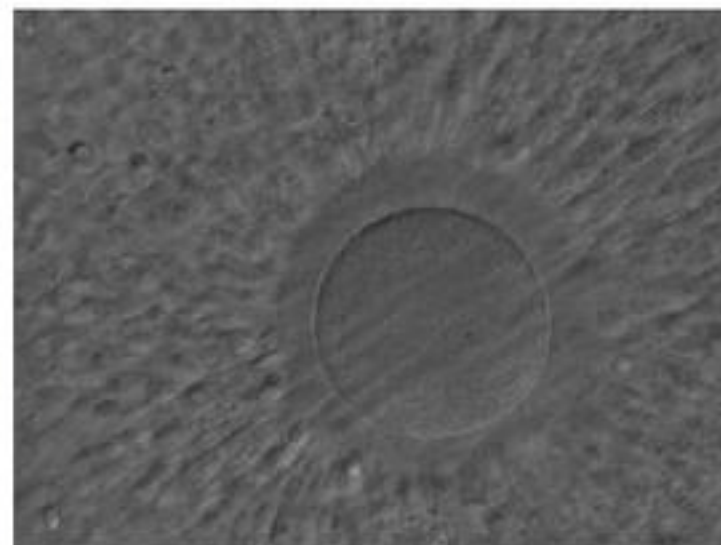
ĐÁNH GIÁ PHỨC HỢP TẾ BÀO NOÃN (OCC)

Ở các chu kỳ kích thích buồng trứng, khối phức hợp OCC thường được thu nhận sau 34-38 giờ gây rụng noãn, trạng thái điển hình của khối OCC được mô tả với lớp tế bào hạt và tế bào vành tia bao quanh một cách lỏng lẻo. Phần lớn khối OCC nở rộng thường là noãn MII, tuy nhiên một số noãn thu được vẫn ở giai đoạn GV hoặc metaphase I (MI).

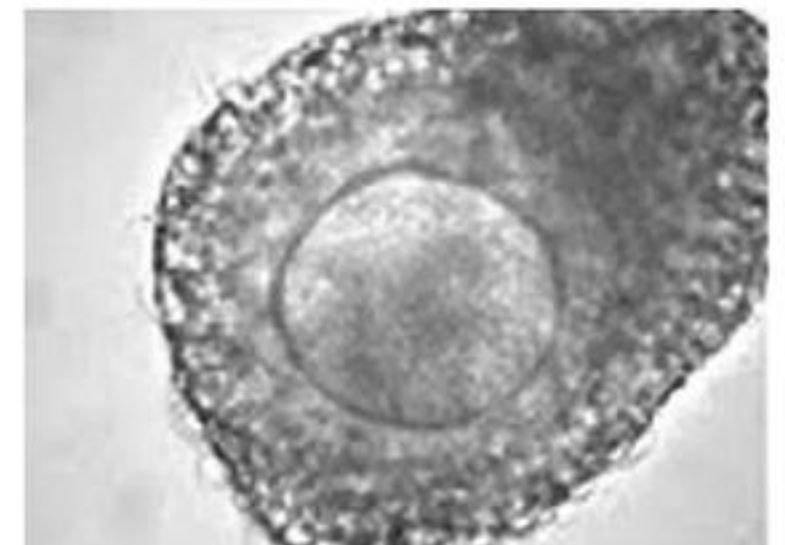
Theo đồng thuận của tổ chức Alpha-ESHRE, hiện nay chưa đủ cơ sở để khẳng định có sự tương quan giữa hình thái khối OCC với khả năng phát triển phôi, nhưng vẫn có thể sử dụng thang điểm nhị phân (0 hoặc 1) để đánh giá trạng thái của khối OCC, điểm số 1 cho khối OCC được xem là 'tốt' với khối cumulus và các tế bào vành tia mở rộng (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).



(a) OCC trưởng thành với các tế bào hạt (cumulus) và tế bào vành tia (corona) giãn rộng. PBI xuất hiện ở vị trí 1 giờ



(b) OCC trưởng thành với các tế bào hạt (cumulus) và tế bào vành tia (corona) giãn rộng. PBI chưa xuất hiện



(c) OCC chưa trưởng thành với các tế bào hạt và vành tia nén chặt

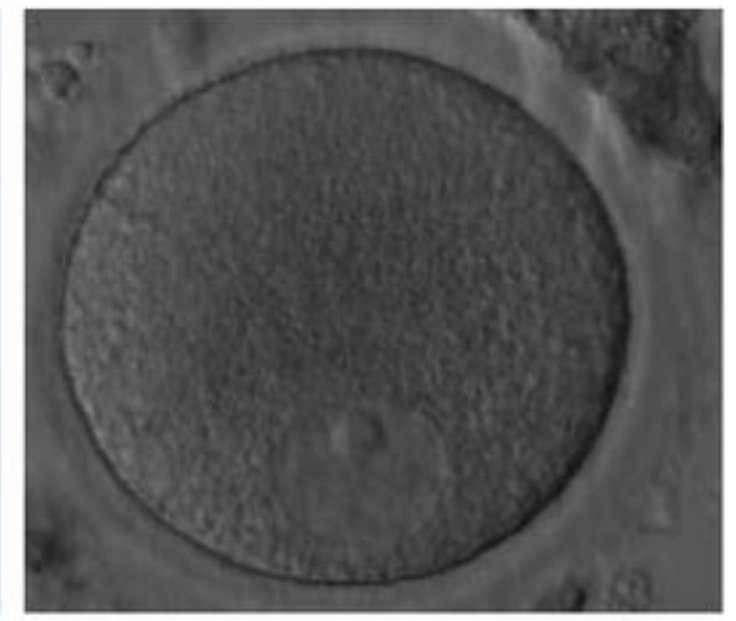
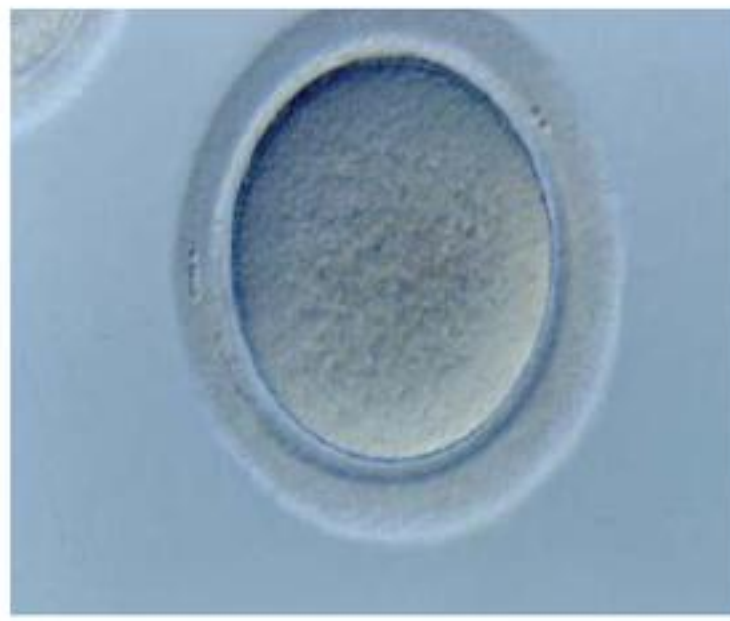
(Nguồn: The Atlas of Human Embryology)

ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ TRƯỞNG THÀNH NOÃN

Trưởng thành nhân

Trong chu kỳ tự nhiên tự nhiên, sự trưởng thành nhân luôn song hành với việc nở rộ (phụ thuộc FSH) của các tế bào cumulus và tế bào vành tia, trong khi đó tính đồng bộ này dường như không có trong các chu kỳ kích thích.

Khi đánh giá dưới kính hiển vi, noãn MII trưởng thành về nhân thường xuất hiện PBI trong khoang PVS. Giai đoạn MII được đặc trưng bởi việc sắp xếp các nhiễm sắc thể tương đồng trên mặt phẳng xích đạo trong quá trình phân bào của lần phân chia thứ hai. 85% noãn thu được xuất hiện PBI và được phân loại như noãn MII, trong khi đó noãn giai đoạn GV chiếm khoảng 10%. Khoảng 5% noãn không ở giai đoạn GV cũng như không xuất hiện PBI thường được phân loại như noãn MI.



(a) Noãn MII
với thể cực thứ nhất
ở vị trí 6 giờ

(b) Noãn MI

(c) Noãn GV với túi nhân

(Nguồn: *The Atlas of Human Embryology*)

Trưởng thành tế bào chất

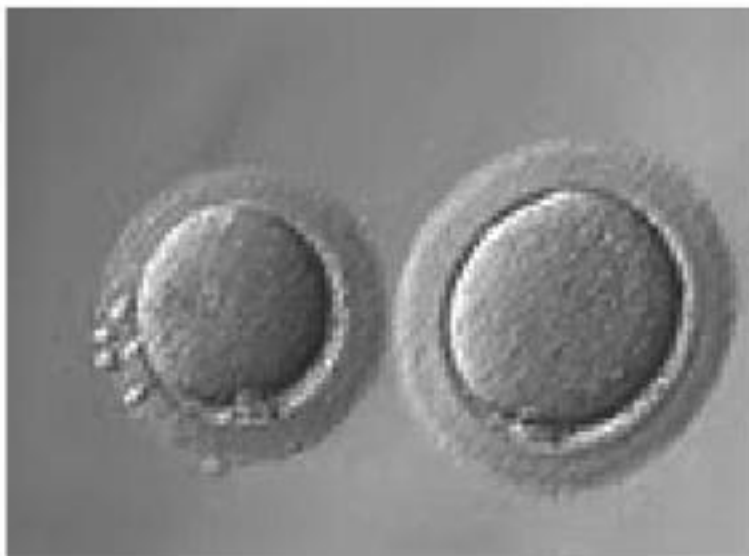
Những biến đổi trong quá trình trưởng thành của tế bào chất thường dễ dẫn đến việc làm sai hỏng chức năng tế bào chất. Vì vậy, sự trưởng thành về bào tương noãn đi kèm với việc không xuất hiện các hình thái bất thường trong bào tương noãn. Noãn được xem là trưởng thành về tế bào chất thường sẽ không xuất hiện các bất thường trong bào tương noãn.



ĐÁNH GIÁ KÍCH THƯỚC VÀ HÌNH DẠNG NOÃN

Kích thước noãn bào được xem là yếu tố cần thiết cho việc hoàn tất quá trình phân bào giảm nhiễm. Vào giai đoạn đầu của quá trình tăng trưởng noãn, kích thước noãn được quyết định nhờ vào liên kết chặt chẽ giữa màng noãn hoàng và bề mặt trong của lớp zona. Đường kính trung bình của buồng trứng chứa noãn MII có thể thay đổi đáng kể, nhưng lại không liên quan đến khả năng thụ tinh hoặc chất lượng phát triển của phôi ở giai đoạn phân chia.

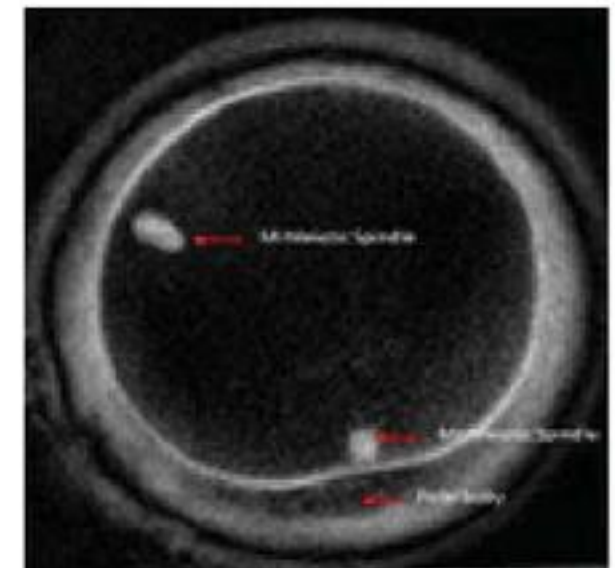
Tuy nhiên, đối với các noãn khổng lồ thì dường như lại khác. Các noãn khổng lồ này được hình thành do sự phân chia nhân, nhưng không phân chia đồng đều về tế bào chất trong quá trình nguyên phân của các noãn nguyên bào, hoặc do sự dung hợp của hai noãn nguyên bào tạo nên tế bào có bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội. Đó cũng là lí do giải thích sự hình thành noãn khổng lồ GV có hai nhân (Rosenbusch, 2002). Noãn khổng lồ giai đoạn GV lưỡng bội phát triển thành noãn MII khổng lồ lưỡng bội có khả năng thụ tinh với tinh trùng đơn bội tạo hợp tử tam bội. Vì vậy, trong các chu kì TTON, các noãn khổng lồ được khuyến khích không nên sử dụng để ICSI (T. Ebner, 2006).



(a) Noãn MII khổng lồ (giant)



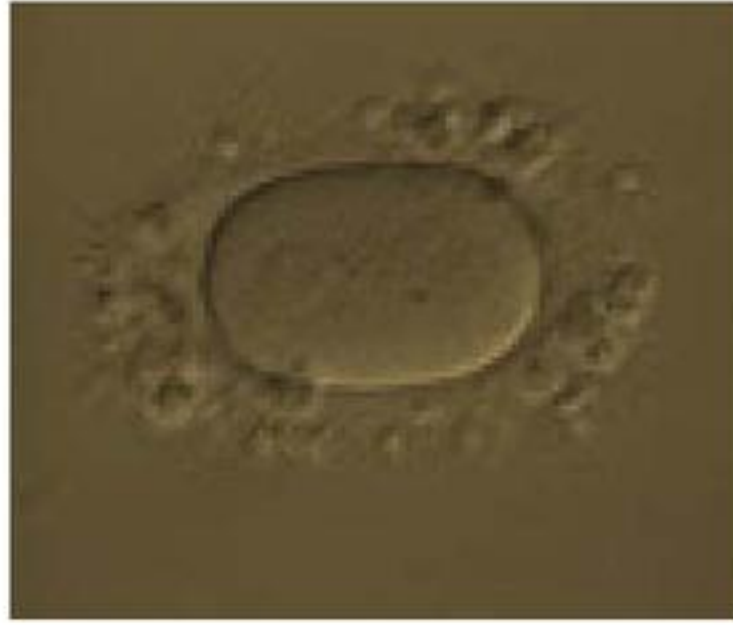
(b) Noãn GV khổng lồ
với 2 túi nhân



(c) Noãn MII khổng lồ
với 2 bộ thai vô sắc

(Nguồn: The Atlas of Human Embryology)

Riêng với các noãn có hình dạng bất thường như bị kéo dài (elongation) hay hình quả trứng (ovoid), Ebner và cộng sự (2008) cho biết không có mối tương quan nào giữa tỉ lệ thụ tinh cũng như chất lượng phôi ở noãn. Tuy nhiên, khi các noãn này phát triển đến giai đoạn phôi ngày 2 thì các phôi bào không sắp xếp theo kiểu truyền thống theo hình tứ diện, mà bị lệch trục phân cắt của phôi dẫn đến việc ngừng phát triển.



(a) Noãn MII dạng quả trứng
(ovoid) với PVS bình thường



(b) Noãn MII dạng quả trứng
(ovoid) với PVS bị kéo dài
ở 2 đầu cực

(Nguồn: *The Atlas of Human Embryology*)

ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG BÀO TƯƠNG

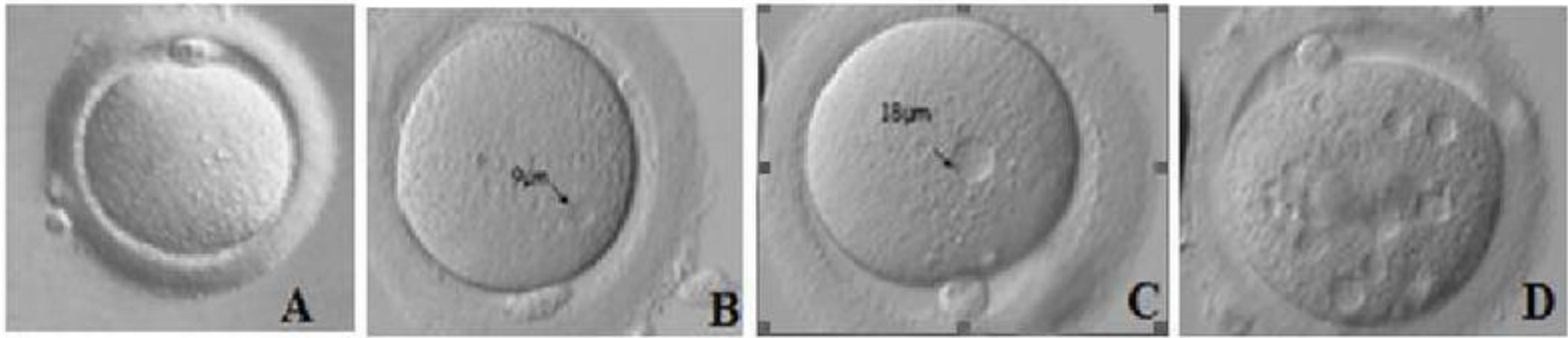
Không bào (vacuole)

Nghiên cứu của De Sutter và cộng sự vào năm 1996 cho thấy tỉ lệ thụ tinh ở noãn có không bào giảm (40%) so với noãn bình thường (69,6%) trong ICSI. Theo lý thuyết, sự hiện diện của một không bào lớn hoặc nhiều không bào sẽ gây ảnh hưởng bất lợi cho noãn hơn là các không bào nhỏ bởi vì phần lớn cấu trúc bộ xương tế bào (cytoskeleton) không thể thực hiện chức năng, ví dụ như vi ống.

Đặc biệt, các không bào lớn có thể thay đổi vị trí của thoi vô sắc so với thể cực của noãn nên tăng nguy cơ tiêm tinh trùng vào vị trí gây tổn thương thoi vô sắc. Điều này có thể dẫn đến sai hỏng trong thụ tinh và phân chia của phôi (Van Blerkom và cs., 1990). Nghiên cứu của Ebner và cộng sự vào năm 2005 cũng cho thấy có sự tương quan giữa đường kính không bào và sự xuất hiện hai tiền nhân trong hợp tử, không có trường hợp nào được thụ tinh ở noãn có không bào với đường kính trên 14 μ m.

Hầu hết đều kết luận không bào là một trong những yếu tố không tốt cho quá trình thụ tinh. Sự xuất hiện không bào với kích thước càng lớn sẽ dẫn đến giảm khả năng tạo hợp tử tốt.





(Nguồn: Thomas Ebner, 2008)

VAC 1: noãn không có không bào (A)

VAC 2: noãn có 1 không bào nhỏ (5-10µm) (B)

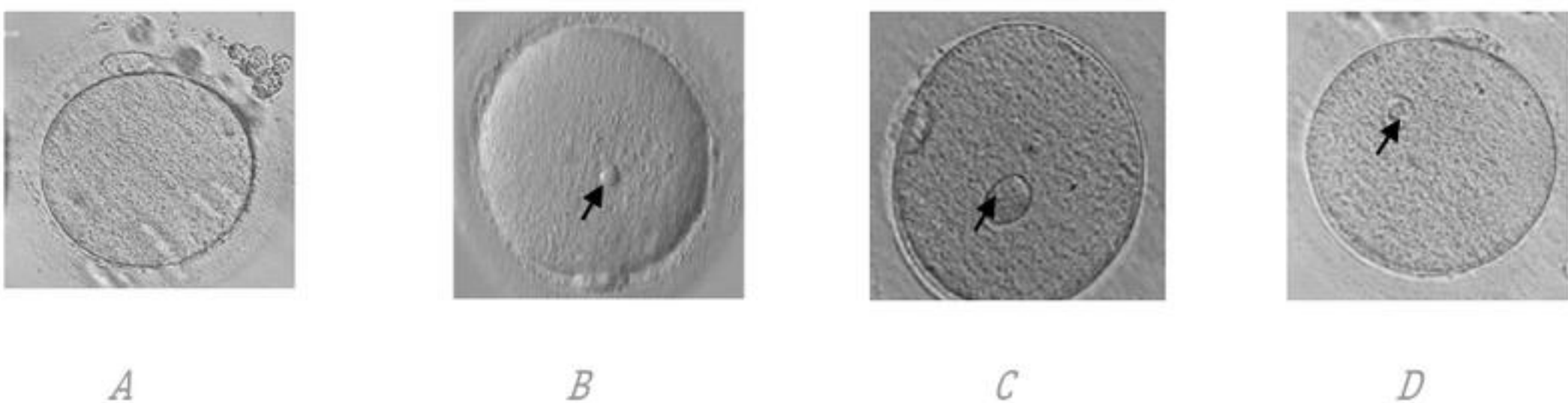
VAC 3: noãn có một không bào trung bình (10-14µm) (C)

VAC 4: noãn có một không bào lớn (>14µm) hay nhiều không bào nhỏ hoặc trung bình (D)

Thể vùi (inclusions)

Sự hiện diện của thể vùi thường đi đôi với việc giảm tỉ lệ thụ tinh thấp cũng như sự hình thành phát triển của phôi (Xia, 1997). Thể vùi còn được gọi là thể khúc xạ, do tính đặc trưng về hình dạng khi quan sát dưới kính hiển vi nền sáng, chứa chủ yếu là các lipid và các hạt vật chất dày đặc, có đường kính nhỏ (<10µm). Chúng thường xuất hiện ở noãn của bệnh nhân điều trị nhiều chu kỳ (Veeck, 1999).

Theo Wilding và cộng sự (2007), ngoài việc ảnh hưởng xấu đến tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ phát triển của phôi, thể vùi còn làm gia tăng tỉ lệ thể dị.



(Nguồn: IVFAS)

INC 1: không hiện diện thể vùi trong bào tương (A)

INC 2: bào tương có một thể vùi nhỏ ($\leq 2-3 \mu\text{m}$) (B)

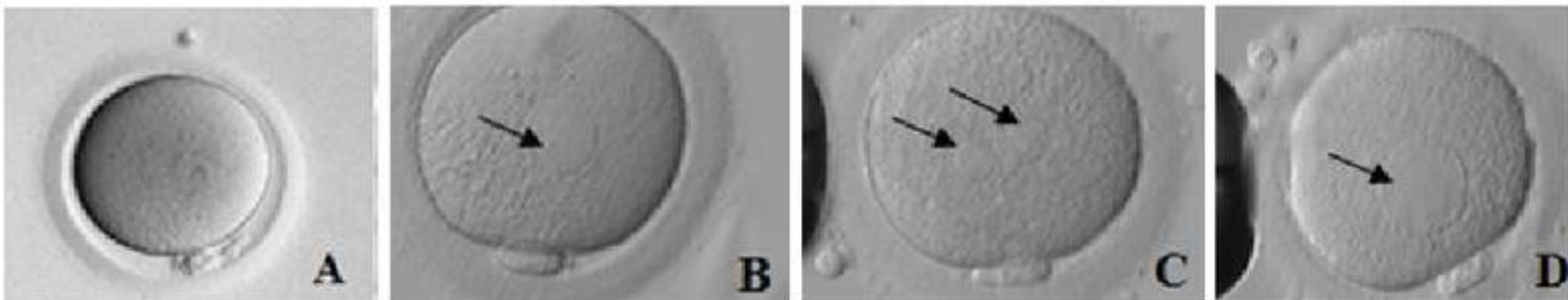
INC 3: bào tương có một thể vùi to hoặc nhiều thể vùi nhỏ ($>5\mu\text{m}$) (C)

INC 4: bào tương có từ hai thể vùi to trở lên và các dạng phức tạp (mắt bò, bull-eyed) (D)

Lưới nội chất trơn (SER)

Noãn bào có sự hiện diện của SER thường cho tỉ lệ thụ tinh thấp, đặc biệt là tỉ lệ sảy thai rất cao, cũng như chết non và nhẹ cân nếu chuyển phôi có nguồn gốc từ các noãn này (Ebner và cs., 2008). SER đặc biệt liên quan đến nhiều bất thường chưa rõ nguồn gốc, và hậu quả để lại được biết đến tương đối rõ ràng, chính vì vậy nên hạn chế hoặc tránh chọn phôi chuyển có nguồn gốc từ noãn mang SER (Jun ko Otsuki, 2009).

Mối liên hệ về mặt phân tử giữa hiện tượng thai lưu và các rối loạn trong việc in dấu di truyền ở các dạng noãn bất thường dạng này dường như có liên quan đến mức độ canxi nội bào được phóng thích ra từ quá trình hoạt hóa, đây được xem nguồn canxi đầu tiên với thời gian tồn tại và mức độ cao hơn đáng kể so với các noãn bình thường. Ngay sau đỉnh canxi ban đầu, mức độ tổng hợp ATP ở ti thể cao ít nhất 2-3 lần so với bình thường, nhưng sau đó dần dần sẽ trở lại mức bình thường sau khoảng 20 giờ.



(Nguồn: IVFAS)

SER 1: noãn không có SER (A)

SER 2: noãn có một SER nhỏ (B)

SER 3: noãn có nhiều hơn một SER nhỏ hoặc một SER trung bình (C)

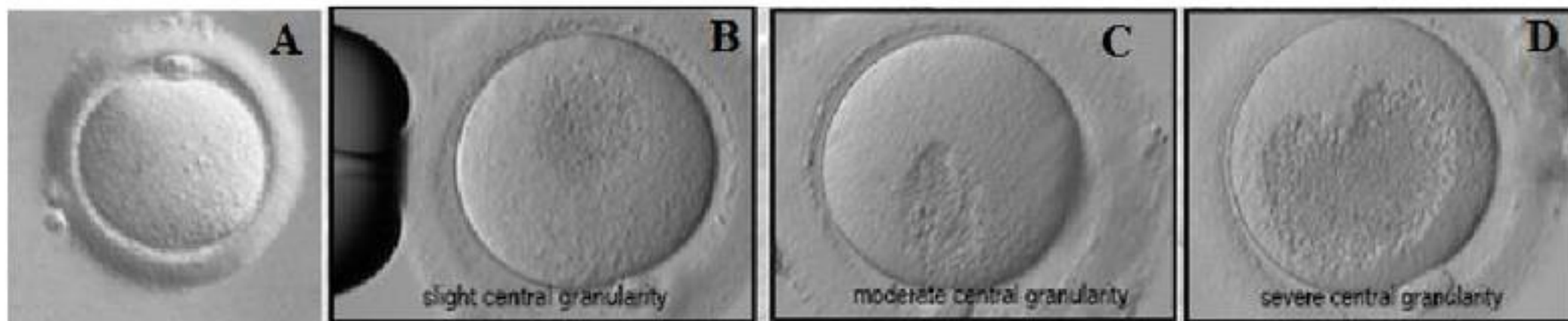
SER 4: noãn có nhiều SER trung bình hoặc một SER lớn (D)



Độ mịn của bào tương (granularity)

Đám hạt tập trung ở trung tâm bào tương (CLG)

Đám hạt ở vị trí trung tâm của bào tương noãn được đặc trưng bởi một vùng đậm, tối màu, giống như bột biển tập trung ở trung tâm bào tương noãn, và được phân biệt rõ ràng với những vùng bào tương noãn bình thường khác. Dựa vào sự xuất hiện của đám hạt ở vị trí trung tâm của bào tương noãn (kích thước, độ sâu), chia noãn thành 4 độ (T.Ebner, 2005).



(Nguồn: IVFAS)

CLG 1: không có CLG (A)

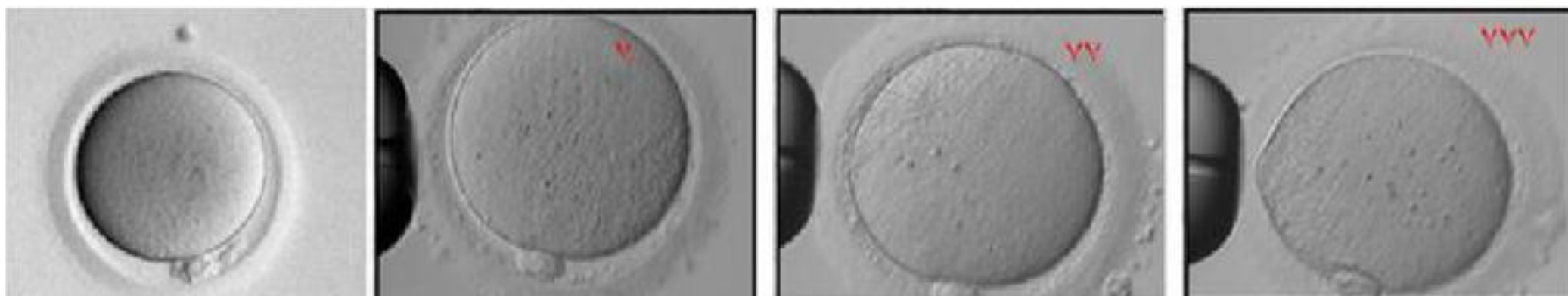
CLG 2: CLG chiếm 1/4 diện tích bề mặt (B)

CLG 3: CLG ở vị trí sâu, chiếm 1/2 diện tích bề mặt (C)

CLG 4: CLG chiếm từ 3/4 diện tích bề mặt trở lên (D)

Các hạt nâu trong bào tương (brown particles/incorporations)

Các hạt nâu trong tế bào chất (brown particles/incorporations – BPs) có thể phân bố rải rác khắp trong bào tương hoặc chỉ tập trung ở vùng trung tâm. Sự xuất hiện của các hạt nâu trong trong tế bào chất làm giảm tỉ lệ thụ tinh. Sutter (1996) cho biết noãn có BPs sẽ làm giảm tỉ lệ thụ tinh so với noãn “lí tưởng” (tương ứng là 68% và 72%).



(Nguồn: IVFAS)

Độ 1: noãn không có sự hiện diện của BPs (A)

Độ 2: noãn có các hạt nâu nhưng kích thước nhỏ và số lượng ít (B)

Độ 3: noãn có các hạt nâu to và ít (C)

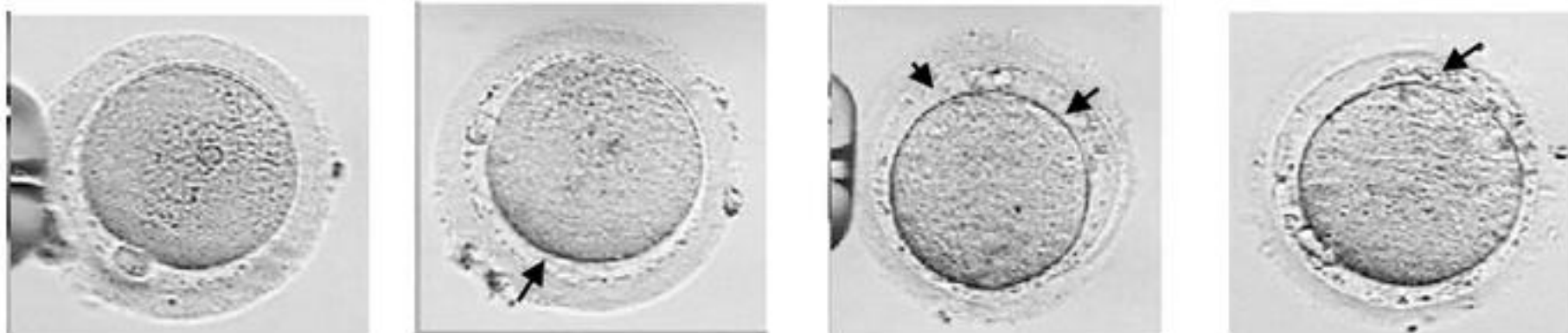
Độ 4: noãn có nhiều hạt (bất kể kích thước) (D)

ĐÁNH GIÁ CÁC YẾU TỐ NGOÀI BÀO TƯƠNG

Khoảng quanh noãn (PVS)

Theo Vutyavanich (2003) và Veeck (1999) thì noãn có khoảng không quanh noãn rộng đi kèm với các thể hạt sẽ làm tỉ lệ thụ tinh giảm đáng kể. Sự xuất hiện các thể hạt có thể là do kết quả của sự phóng thích sớm từ tế bào vỏ (cortical). Một số dữ liệu còn cho biết, PVS rộng có thể liên quan đến việc noãn quá trưởng thành (Mikkelsen và Lin-denbergh, 2001; Miao và cs., 2009).

Xia P (1997) và Hassan-Ali H (1998) cũng cho rằng tỉ lệ thụ tinh giảm sau khi tiến hành ICSI ở noãn có PVS rộng và có hạt.



(Nguồn: IVFAS)

PVS 1: bình thường, độ rộng vừa phải, không có hạt (A)

PVS 2: rộng ở một phần quanh noãn, không có hạt (B)

PVS 3: rộng hết toàn bộ chu vi quanh noãn (C)

PVS 4: rộng và xuất hiện hạt trong khoang PVS (D)

Thể cực (polar body – PB)

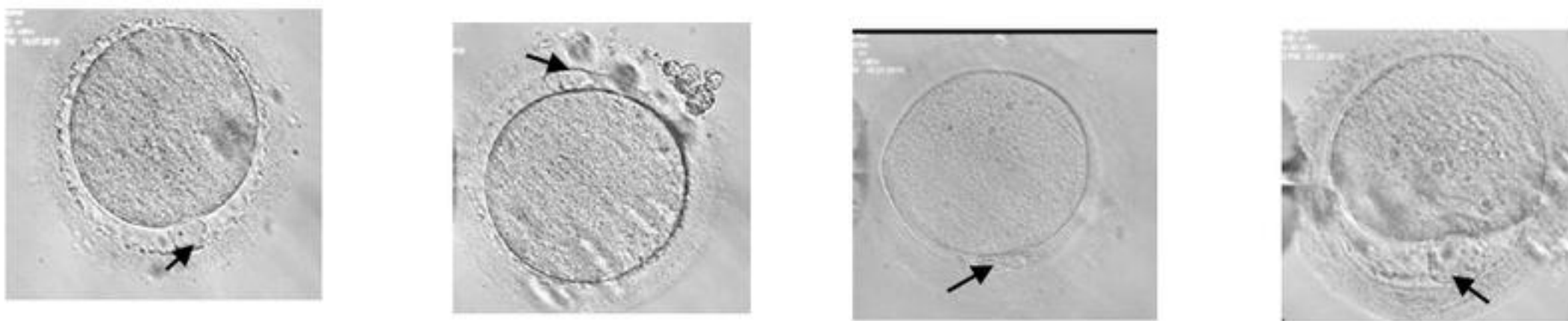
Hình thái PB là một trong những dấu hiệu giúp phản ánh mức độ trưởng thành của noãn. Tuy nhiên hình thái PB ảnh hưởng đến kết quả như thế nào vẫn còn gặp



nhiều tranh luận. Trong nghiên cứu của Ebner và cộng sự (2000) cho thấy có mối tương quan giữa hình thái của thể cực thứ I (bề mặt thể cực, kích cỡ và phân mảnh) với tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ phát triển thành phôi tốt.

Đối với noãn bào có thể cực nhỏ hoặc dẹp sẽ có xu hướng tạo phôi tam bội, vì phần nhiễm sắc thể có lẽ đã không được tổng xuất ra ngoài và vẫn còn bị giữ lại trong tế bào chất trong quá trình phân chia giảm phân (Vutyavanich, 2003; Veeck, 1999).

Thể cực phân mảnh là một trong những biểu hiện noãn đã quá trưởng thành, những noãn này thường có tỉ lệ thụ tinh thấp, kết quả phôi và tỉ lệ làm tổ của phôi thấp hơn so với noãn có thể cực bình thường (Veeck, 1999; Kahrama, 2000).



(Nguồn: IVFAS)

PB 1: dạng tròn hoặc oval, bề mặt trơn láng (A)

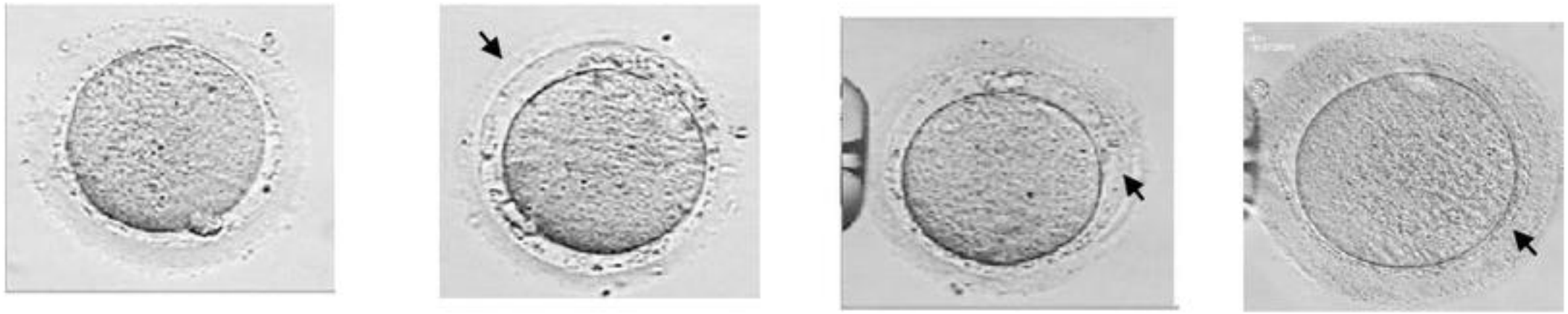
PB 2: dạng tròn hoặc bầu dục, bề mặt nhăn (B)

PB 3: thể cực phân mảnh (C)

PB 4: to, bất thường, thoái hóa hoặc có nhiều hơn hai thể cực (D)

Màng trong suốt (zona pellucida – ZP)

Nếu có bất kỳ thay đổi nào ở ZP thì nguyên nhân có thể do sự chế tiết hoặc việc hình thành chất nền glycoprotein gặp một số vấn đề. Độ dày mỏng của ZP dường như không có bất kỳ ảnh hưởng đến kết quả. Tuy nhiên, nên lưu ý quan sát về màu sắc hay độ dày của màng zona ở một số bệnh nhân đặc biệt.



(Nguồn: IVFAS)

ZP 1: độ dày và màu sắc bình thường (13-15 μ m) (A)

ZP 2: màng trong suốt mỏng (B)

ZP 3: dày, hai lớp hoặc dày mỏng không đều (C)

ZP 4: dày và sậm màu hoặc bất thường (D)

THOI VÔ SẮC

Tỉ lệ noãn lệch bội gia tăng dẫn đến làm suy giảm đáng kể tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ làm tổ ở phụ nữ lớn tuổi (Munne S và cs., 1995; Benadiva CA và cs., 1996). Tại các trung tâm TTON, bất thường này cũng được phát hiện ở phụ nữ trẻ tuổi, đặc biệt là những người có bệnh lý buồng trứng. Các bất thường như vậy có thể phát sinh từ các bất thường của các vi ống hoặc các yếu tố khác của khung xương tế bào, dẫn đến hình thành các bất thường trong hệ thống thoi vô sắc. Hơn nữa, tuổi của người mẹ đóng vai trò quan trọng liên quan đến những biến động trong hoạt động bất thường của thoi vô sắc. Ngày nay, khi được hỗ trợ bởi nhiều phương tiện kỹ thuật, việc đánh giá hệ thống thoi vô sắc trong noãn trưởng thành đã thu hút sự quan tâm của giới khoa học.

So với noãn từ các động vật khác, thì noãn người thường nhạy cảm hơn với các biến động về nhiệt độ (Aman RR và cs., 1994;). Cấu trúc thoi vô sắc dễ dàng bị phá vỡ ngay khi noãn tiếp xúc với nhiệt độ thấp hơn 37°C trong một thời gian ngắn (Pickering SJ và cs., 1990). Chính vì vậy, việc đánh giá và quan sát sự tồn tại hay không tồn tại, cũng như trạng thái bình thường hay bất thường của thoi vô sắc giúp tiên lượng tốt cho ICSI. Theo kết quả nghiên cứu của Wei-Hua Wang và cộng sự (2001), tỉ lệ thụ tinh ở các noãn có thoi vô sắc bình thường cao hơn so với noãn không có hoặc có thoi vô sắc bất thường.



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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. Hum Reprod; 26:1270-1283.
2. Aman RR, Parks JE. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. Biol Reprod 1994; 50:103-10.
3. Benadiva CA, Kligman I, Munne S. Aneuploidy 16 in human embryos increases significantly with maternal age. Fertil Steril 1996; 66:248-55.
4. Cristina Magli, Gayle M. Jones, Kersti Lundin, and Etienne van den Abbeel (2012). The Atlas of Human Embryology: From Oocytes to Pre-implantation Embryos. Hum Reprod, 27(S1):i50-i71.
5. De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1996; 11(3), pp.595-7.
6. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 2000; 15(2):427-30.
7. Ebner T, Moser M, Shebl O, Sommergruber M, Tews G. Prognosis of oocytes showing aggregation of smooth endoplasmic reticulum. Reprod Biomed Online. 2008 Jan; 16(1):113-8.
8. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, Tews G. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. Fertil Steril. 2005; 83:1635-1640.
9. Ebner T, Moser M, Tews G. Is oocyte morphology prognostic of embryo potential after ICSI? Reproductive BioMedicine Online 12. 2006; 517-512.
10. Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J. Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. Human Reproduction. 1998; vol.13 no.12 pp.3425-3430.
11. Junko Otsuki (2009). Mini review - Intracytoplasmic Morphological Abnormalities in Human Oocytes. J. Mamm. Ova Res, 26, pp.26-31.
12. Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. Fertil Steril 1995; 64:382-91.
13. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption the meiotic spindle in the human oocytes. Fertil Steril 1990; 54:102-8.

14. Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microsc Technol.* 1990; 16:324-346.
15. Van Blerkom J, Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1992; 7:379-390.
16. Vutyavanich T. Laboratory management of A.R.T. In: Vutyavanich T, editor. *Assisted Reproduction technology*. Chiang Mai: Nopburi, 2003; 57-75.
17. Veeck LL. *An atlas of human gametes and conceptuses*. New York: The Parthenon Publishing Group, 1999; 15-24,32-68.
18. Wilding M, Di ML, D'Andretti S, Montanaro N, Capobianco C, Dale B. An oocyte score for use in assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24:350-358.
19. Wei-Hua Wang, Li Meng, Rickard J. Hackett, Rudolf Odenbourg, and David L. Keefe. The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertil Steril.* 2001. Vol. 75, No.2.
20. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Human Reproduction.* 1997; vol.12 no.8 pp.1750-1755.



LỰA CHỌN TINH TRÙNG THEO HÌNH DẠNG – KỸ THUẬT IMSI

Huỳnh Gia Bảo

IVFAS, Bệnh viện An Sinh

TỔNG QUAN

Louise Brown ra đời vào 07/1978 đã cho thấy IVF (In Vitro Fertilization) có hiệu quả trong điều trị các trường hợp vô sinh do người vợ, đặc biệt là nguyên nhân từ tai vòi (Edwards và cs., 1980). Vài năm sau đó, IVF cũng được áp dụng thành công cho các cặp vợ chồng vô sinh chưa rõ nguyên nhân, vô sinh nam và lạc nội mạc tử cung (Mahadevan và cs., 1983). Tuy nhiên, với những trường hợp vô sinh do chất lượng tinh trùng (mật độ ít, di động yếu, dị dạng) thì hiệu quả của IVF vẫn còn thấp do tỉ lệ thụ tinh thấp, dẫn đến số lượng phôi tốt ít.

Vào cuối thập niên 80, một số phương pháp hỗ trợ thụ tinh đã được phát triển và áp dụng cho các cặp vợ chồng không thực hiện được IVF. Kỹ thuật đầu tiên là tạo lỗ thủng trên màng trong suốt – PZD (Partial Zona Dissection) cho phép tinh trùng tiếp xúc trực tiếp đến màng bào tương noãn, kỹ thuật tiêm tinh trùng vào khoang noãn – SUZI (Sub Zonal Insemination). Nhìn chung với kỹ thuật PZD và SUZI thì tỉ lệ noãn được thụ tinh vẫn còn thấp, chỉ có một hoặc hai phôi được chuyển cho bệnh nhân do đó tỉ lệ thai thấp và số em bé ra đời ít nên khó có thể xem PZD và SUZI là phương pháp điều trị thông thường.

Năm 1992, Palermo đã báo cáo trường hợp thai đầu tiên sau kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn – ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection), một phương pháp hỗ trợ sinh sản mới. Trong ICSI, một tinh trùng đã được bất động sẽ được tiêm vào bên trong bào tương noãn sau khi đi xuyên màng trong suốt. ICSI giúp đạt được tỉ lệ thụ tinh cao cũng như tỉ lệ thai cao hơn mà không cần quan tâm đến các yếu tố mật độ, di động của tinh trùng. ICSI giúp cho các bệnh nhân bất thường tinh trùng nặng, dị dạng, không có tinh trùng, hay tinh trùng từ phẫu thuật, có thể được làm bố. Do đó, nó trở thành một cuộc cách mạng



mới trong công cuộc điều trị vô sinh nam (Devroey và Van Steirteghem, 2004).

Việc lựa chọn tinh trùng tốt nhất để tiêm vào bào tương noãn dựa vào hình dạng tinh trùng ở độ phóng đại 200-300 lần vẫn là phương pháp sử dụng chủ yếu từ trước đến nay trong kỹ thuật ICSI. Chất lượng của tinh trùng được sử dụng có thể ảnh hưởng đến tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ phân chia, chất lượng phôi, tỉ lệ làm tổ và tỉ lệ có thai sau đó (Boitrelle và cs., 2011; Said và Land, 2011; Ortega và cs., 2011; De Vos và cs., 2003). Do đó, để góp phần gia tăng tỉ lệ thành công cho việc chọn lựa tinh trùng trong ICSI, kỹ thuật tiêm tinh trùng có chọn lọc hình dạng vào bào tương noãn – IMSI (Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection) được đưa ra bởi Bartoov và cộng sự (2002) giúp chọn lựa tinh trùng với hình dạng bình thường và không có không bào ở độ phóng đại cao hơn 6.600 lần dựa theo tiêu chuẩn MSOME (Motile Sperm Organellar Morphology Examination) (Watanabe và cs., 2011; Boitrelle và cs., 2011). Cùng với sự phát triển của kỹ thuật IMSI thì tiêu chuẩn chọn tinh trùng trong IMSI cũng nghiêm ngặt hơn, ngoài tiêu chuẩn về hình dạng bên ngoài (đầu, cổ, giữa, đuôi) thì thành phần của đầu tinh trùng cũng được quan tâm và được đưa vào làm tiêu chuẩn của một tinh trùng bình thường. Bartoov và cộng sự (2002) lần đầu tiên miêu tả tiêu chuẩn MSOME, và tiêu chuẩn này cho phép lựa chọn hình dạng tinh trùng di động một cách dễ dàng ở độ phóng đại cao trên 6.000 lần. Với MSOME, bất thường của hình dạng bên ngoài có thể dễ dàng quan sát ở độ phóng đại thấp, tuy nhiên những bất thường như trung tử, không bào và sự hiện diện của những hốc nhỏ ở đầu tinh trùng không thể nhận thấy ở độ phóng đại thấp. Những bất thường này chỉ có thể được phát hiện ở độ phóng đại cao. Dựa trên những tiêu chí này nên tiêu chuẩn MSOME được áp dụng để lựa chọn tinh trùng trong IMSI. Hiệu quả của IMSI liên quan tới sự phát triển của phôi tiếp theo sau đang trở thành chủ đề của những nghiên cứu gần đây trên thế giới (Boitrelle và cs., 2011). Bên cạnh đó, cơ chế giải thích cách chọn lựa tinh trùng theo tiêu chuẩn MSOME vẫn là chủ đề tranh luận (Watanabe và cs., 2011; Perdrix và cs., 2011).

Theo Bartoov và cộng sự (2002), không bào được coi là lớn khi nó chiếm trên 4% thể tích vùng nhân khu vực đầu và được coi là bất thường (Berkovitz và cs., 2006; Peer và cs., 2007; Sermondade và cs., 2007; Vanderzwalmen và cs., 2008). Tuy nhiên Franco và cộng sự (2008) lại cho rằng không bào được coi là lớn khi nó chiếm trên 50% tổng thể tích vùng đầu. Trong những năm gần đây đã có những nghiên cứu sâu hơn về không bào và những ảnh hưởng của nó đến vật chất di truyền.

Wantanabe và cộng sự (2008) đã nghiên cứu ảnh hưởng của không bào đến bất

Năm 2011, Perdrix và cộng sự khi khảo sát trên 20 cặp bệnh nhân có bất thường hình dạng tinh trùng, kết quả cho thấy các không bào nhỏ không ảnh hưởng đến bất thường ADN, còn tinh trùng có không bào lớn, tỉ lệ phân mảnh ADN cao hơn so với tinh trùng nhóm chứng (77,6% so với 70,6%), bất thường acrosome và sự cô đặc nhiễm sắc thể cũng cao hơn, lần lượt là (77,6% so với 70,6%) và (50,4% so với 26,5%). Từ những nghiên cứu trên cho thấy không bào ở tinh trùng là đặc điểm phổ biến và không ảnh hưởng đến tổn thương ADN. Tuy nhiên, sự hiện diện của các không bào lớn có thể làm tăng tỉ lệ tổn thương ADN của tinh trùng.

IMSI hệ thống

[illegible]

$$R = \frac{1,22\lambda}{(NA_{cond} + NA_{obj})}$$

(Độ phân giải) NA_{cond} : Độ mở của tụ quang
 NA_{obj} : Độ mở của vật kính



(Research Instruments IMSI User Manual)

IMSI cải tiến

Qui trình tiêm tinh trùng vào bào tương noãn có chọn lựa tinh trùng ở độ phóng đại cao sử dụng vật kính 40x (IMSI cải tiến) tương tự như qui trình ICSI, chỉ khác ở chỗ việc chọn lựa và bất động tinh trùng được thực hiện ở độ phóng đại cao hơn (600x), sau đó chuyển về độ phóng đại 200x thông thường và thực hiện ICSI. Tiêu chuẩn về hình dạng để chọn lựa tinh trùng được dựa theo tiêu chuẩn WHO 2010 và không có không bào.



CÁC BẰNG CHỨNG Y HỌC VỀ HIỆU QUẢ CỦA IMSI

Mặc dù đã được giới thiệu trên 10 năm, cho đến nay, y văn có rất ít nghiên cứu ngẫu nhiên có đối chứng so sánh hiệu quả của IMSI và ICSI, đồng thời đối tượng

ngiên cứu và phương pháp đánh giá không đồng nhất. Chúng tôi xin trình bày một số các nghiên cứu quan trọng về hiệu quả của IMSI cho đến nay.

Những nghiên cứu đồng thuận

Kỹ thuật IMSI được phát triển đầu tiên bởi nhóm nghiên cứu của giáo sư Bartoov từ Israel. Năm 2002, nhóm của ông đã sử dụng một kính hiển vi có độ phóng đại cao được hỗ trợ để xác định đặc điểm hình thái của tinh trùng có thể ảnh hưởng đến kết quả ICSI. Họ cho rằng tỉ lệ mang thai của ICSI có thể bị ảnh hưởng bởi bất thường trong hình dạng hạt nhân của tinh trùng mà chuyên viên phôi học không thể phát hiện được trong quá trình lựa chọn tinh trùng bình thường trong ICSI.

Năm 2003, Bartoov và cộng sự đã công bố một số nghiên cứu về việc lựa chọn tinh trùng bằng kỹ thuật IMSI, đã cải thiện tỉ lệ mang thai ở các cặp vợ chồng thất bại trong ICSI lặp lại nhiều lần. Nghiên cứu so sánh 50 cặp vợ chồng trong mỗi nhóm. Họ nhận thấy rằng các cặp vợ chồng trải qua IMSI có được tỉ lệ mang thai cao hơn những bệnh nhân thực hiện ICSI (66% so với 33%).

Những phát hiện này được lặp lại khi Berkovitz và cộng sự (2006) nghiên cứu so sánh 80 cặp vợ chồng trải qua IMSI với 80 cặp vợ chồng trải qua ICSI. Kết quả cho thấy tỉ lệ mang thai ở nhóm IMSI cao hơn so với nhóm ICSI (60% so với 25%) và tỉ lệ sẩy thai cũng thấp hơn (14% so với 40%). Cùng năm này, Hazout và cộng sự cũng tìm thấy những cải thiện trong tỉ lệ đậu thai, mang thai và sinh bé bằng cách sử dụng IMSI ở những bệnh nhân đã thất bại ICSI nhiều lần.

Theo Antinori và cộng sự (2008), khi so sánh kết quả lâm sàng của hai nhóm IMSI và ICSI trên 446 cặp bệnh nhân, thì thấy rằng những cặp vợ chồng sử dụng IMSI có tỉ lệ mang thai cao hơn nhóm ICSI thường qui (39,2% so với 26,5%), và tỉ lệ sẩy thai ở nhóm IMSI cũng thấp hơn (17,4% so với 37,5%).

Phần lớn các nghiên cứu trên được thực hiện tại Israel, Ý và Pháp. Kết quả của các nghiên cứu cho thấy rằng IMSI làm tăng tỉ lệ mang thai và giảm tỉ lệ sẩy thai sớm so với ICSI.

Những nghiên cứu không đồng thuận

Tuy nhiên bên cạnh những nghiên cứu cho thấy kỹ thuật IMSI đem lại sự thành công hơn trong ICSI, thì những nghiên cứu gần đây lại cho rằng không có



sự cải thiện về tỉ lệ thai trong ICSI khi sử dụng IMSI.

Trong một nghiên cứu thực hiện trên 30 bệnh nhân cho thấy rằng tỉ lệ thụ tinh ở hai nhóm IMSI và ICSI tương đương nhau (70,9% so với 70,4%), cũng như tỉ lệ phôi phân chia (66,9% so với 60,4%) và tỉ lệ phôi tốt (57,8% so với 52,2%) không có sự khác biệt (Mauri và cs., 2010).

Năm 2010, Setti và cộng sự đã tổng hợp và phân tích những nghiên cứu về ảnh hưởng của IMSI đến quả trong ICSI. Kết quả đã tìm được 5 nghiên cứu so sánh IMSI và ICSI, chọn được 3 nghiên cứu tương đối đủ điều kiện để phân tích, 2 nghiên cứu so sánh không ngẫu nhiên và 1 nghiên cứu ngẫu nhiên.

Nghiên cứu của João Batista A Oliveira và cộng sự (2011) cũng đã so sánh kết quả thụ tinh, tỉ lệ thai lâm sàng của hai nhóm IMSI và ICSI trên 200 cặp bệnh nhân, kết quả đạt được không có sự khác biệt giữa hai nhóm IMSI và ICSI về tỉ lệ thụ tinh (65,4% so với 62%), tỉ lệ phôi làm tổ (13,6% so với 9,8%), và tỉ lệ thai lâm sàng (26% so với 19%).

Năm 2011, Banlaban và cộng sự cũng đã khảo sát ảnh hưởng của IMSI đến kết quả lâm sàng trong ICSI trên 168 cặp bệnh nhân. Và kết quả cho thấy không có sự cải thiện về tỉ lệ phôi tốt được chuyển ở nhóm IMSI so với ICSI (2,72% so với 2,76%) cũng như tỉ lệ trẻ sinh ra (43,7% so với 38,3%). Cùng năm 2011, nhóm tác giả De Vos và cộng sự cũng đã nghiên cứu về sự ảnh hưởng của IMSI đến hiệu quả của ICSI, kết quả thu được một lần nữa khẳng định không có sự khác biệt về tỉ lệ thụ tinh cũng như tỉ lệ phôi tốt giữa hai nhóm IMSI và ICSI (81,9% so với 79,7%) và (34,8% so với 35,4%).

Nghiên cứu trong nước

Hiện nay, chi phí đầu tư cho một hệ thống phóng đại hình ảnh kỹ thuật số trong kỹ thuật IMSI còn khá cao ở Việt Nam đồng thời sự tương thích về mặt quang học cho kỹ thuật này vẫn đang còn tranh cãi (hình ảnh không rõ, khoảng không làm việc giảm, bổ sung đĩa thủy tinh và vật kính dầu, tăng thời gian ICSI), ngoài ra hiệu quả của kỹ thuật chưa được chứng minh rõ ràng (bảng 4). Điều này có thể dẫn đến sự đầu tư lãng phí theo trào lưu chung trên thế giới mà không mang lại hiệu quả thật sự cho bệnh nhân và các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON).

Nói chung, các vấn đề lớn của kỹ thuật IMSI đi kèm với hệ thống hình ảnh kỹ thuật số là:

- Chi phí đầu tư rất cao mà có thể chỉ có hiệu quả trên một số ít trường hợp.
- Sử dụng hệ thống đánh giá hình dạng khác với tiêu chuẩn quen thuộc của Tổ chức Y tế Thế giới.
- Kỹ thuật phức tạp, thời gian thực hiện kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) kéo dài.
- Hiệu quả điều trị và chỉ định chưa rõ ràng.

Trước tình hình đó, nhóm nghiên cứu thuộc CGRH đã phối hợp với Đơn vị Hỗ trợ sinh sản (IVFAS) thuộc Bệnh viện An Sinh triển khai áp dụng kỹ thuật IMSI cải tiến nhằm khắc phục được các khuyết điểm trên mà vẫn đảm bảo hiệu quả chọn lọc tinh trùng trong điều trị.

Về thực chất, khái niệm IMSI là kỹ thuật tiêm tinh trùng có chọn lọc kỹ về hình dạng để tiêm vào bào tương noãn, dựa vào việc chọn lọc tinh trùng ở độ phóng đại cao. Việc chọn lựa tinh trùng về hình dạng không nhất thiết phải sử dụng hệ thống phóng đại cao kỹ thuật số, chi phí cao trên thị trường hiện nay. Về cơ bản, kỹ thuật IMSI cải tiến, sử dụng vật kính tương phản pha 40X, kết hợp hệ thống phóng đại phụ có sẵn và chọn lựa tinh trùng bình thường theo hình dạng và sự hiện diện của không bào, theo tiêu chuẩn WHO 2010 (World Health Organization, 2010) dưới độ phóng đại 600 lần, dựa trên hệ thống quang học chuẩn của kính hiển vi đảo ngược.

Bảng 1. So sánh giữa 2 tiêu chuẩn WHO 2010 và MSOME

	WHO 2010	MSOME
Hình dạng tổng quát	Láng, cân đối và hình ovan	Láng, cân đối, hình ovan
Chiều dài	3,7-4,7 μ m	4,75 $\pm$ 0,28 μ m
Chiều rộng	2,5-3,2 μ m	3,28 $\pm$ 0,20 μ m
Không bào	Không có không bào lớn hoặc không nhiều hơn 2 không bào nhỏ và nhỏ hơn 20% thể tích vùng đầu	Không nhiều hơn 1 không bào và nhỏ hơn 4% thể tích vùng nhân



Nhóm nghiên cứu thiết lập một qui trình chọn lọc tinh trùng bằng cách phóng đại tối đa kích thước tinh trùng bằng hệ thống quang học tiêu chuẩn của các kính hiển vi đảo ngược thông thường, dựa trên điều kiện hiện có tại các trung tâm ở Việt Nam. Mục tiêu của qui trình IMSI cải tiến là giúp chọn lựa tinh trùng tốt hơn, chi phí thấp, phù hợp với hầu hết trung tâm và thuận tiện cho người thực hiện, cũng như giảm thiểu thời gian thực hiện nhằm tăng chất lượng phôi. Mục tiêu nghiên cứu là đánh giá hiệu quả của kỹ thuật IMSI về tạo phôi (tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ phát triển phôi và tỉ lệ phôi tốt), đồng thời tính tỉ lệ làm tổ của phôi và tỉ lệ có thai của các chu kỳ chuyển phôi từ kỹ thuật IMSI cải tiến.

Đây là một nghiên cứu ngẫu nhiên có nhóm chứng với 1.336 noãn trưởng thành của 85 cặp vợ chồng vô sinh do tinh trùng dị dạng thực hiện TTON tại Đơn vị IVFAS, Bệnh viện An Sinh từ 04/2012 đến 06/2012. Nghiên cứu do CGRH quản lý và triển khai thực hiện.

Các kết quả chính của nghiên cứu được trình bày dưới đây.

Bảng 2. So sánh các chỉ số tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ phân chia, tỉ lệ phôi tốt giữa 2 nhóm

Các chỉ số đánh giá	Hình dạng tinh trùng 0%			Hình dạng tinh trùng >0% (tỉ lệ không bào $42,8 \pm 17,3\%$)		
	IMSI (n=454)	ICSI (n=424)	Giá trị P	IMSI (n=242)	ICSI (n=216)	Giá trị P
Tỉ lệ thụ tinh	76,0%	75,9%	NS	74,7%	72,1%	NS
Tỉ lệ phân chia	97,7%	95,1%	NS	96,5%	97,2%	NS
Tỉ lệ phôi tốt	36,9%	39,6%	NS	37,6%	33,6%	NS

Số liệu chi tiết so sánh giữa 2 nhóm IMSI cải tiến và ICSI thông thường trong nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt ý nghĩa ở tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ phân chia, tỉ lệ phôi tốt. Kết quả này cũng tương tự như những báo cáo lớn có độ tin cậy gần đây của các nhóm nghiên cứu uy tín khác trên thế giới.

Bảng 3. Kết quả có thai của IMSI cải tiến

	IMSI cải tiến (sử dụng vật kính 40X)
Tỉ lệ β -hCG	47/85 (55,3%)
Tỉ lệ thai lâm sàng	39/85 (45,9%)
Tỉ lệ thai sinh hóa	8/85 (9,4%)
Tỉ lệ sảy thai	1/39 (2,6%)
Tỉ lệ làm tổ	69/337 (20,5%)

Tỉ lệ có thai của kỹ thuật IMSI là khá cao so với tỉ lệ có thai chung của TTON. Điều này cho thấy IMSI cải tiến, thông qua việc chọn lọc tinh trùng, có thể giúp tăng chất lượng và khả năng phát triển của phôi. Kinh nghiệm cho thấy IMSI cải tiến cho hình ảnh tinh trùng với độ phóng đại khá cao, hình ảnh rõ nét và thuận tiện cho người sử dụng.

Việc áp dụng thành công kỹ thuật IMSI cải tiến và đạt tỉ lệ có thai lâm sàng cao là một ví dụ cho sự năng động, áp dụng các quan điểm mới trong lĩnh vực TTON trên thế giới vào thực tế lâm sàng ở Việt Nam, nhằm theo kịp các tiến bộ trên thế giới và không ngừng cải thiện tỉ lệ thành công. Một trong những vấn đề cần được ghi nhận là khả năng áp dụng các quan điểm mới một cách sáng tạo để làm giảm chi phí đầu tư, đơn giản hóa qui trình mà vẫn giúp tăng hiệu quả trong điều trị.

Bảng 4. So sánh giữa hệ thống IMSI cải tiến và hệ thống IMSI kèm hệ thống kỹ thuật số

	IMSI cải tiến sử dụng vật kính 40X	IMSI kèm hệ thống kỹ thuật số
Thời gian ICSI	Đơn giản, bình thường	Phức tạp, chậm
Chi phí đầu tư	Thấp (<50 triệu đồng)	Cao (800 triệu đến >1 tỉ đồng)
Hiệu quả	Tương đương	Tương đương



KẾT LUẬN

Ảnh hưởng của kỹ thuật IMSI được áp dụng cho những cặp vợ chồng vô sinh do yếu tố nam nặng và có những chu kỳ điều trị vô sinh thất bại nhiều lần hiện nay trên thế giới cho thấy được những vấn đề như sau:

- Việc lựa chọn tinh trùng trong ICSI đóng vai trò quan trọng.
- Không bào trong tinh trùng là hiện tượng phổ biến. Mối liên quan đến chất lượng tinh trùng thể hiện rõ hơn ở những trường hợp bất thường tinh trùng nặng và không bào kích thước lớn.
- Lựa chọn tinh trùng dựa vào hình dạng dưới độ phóng đại cao IMSI là một bước tiến nhanh và phù hợp với xu hướng hiện nay.
- Chưa đủ dữ liệu để chứng minh IMSI có hiệu quả cải thiện kết quả ICSI nói chung.
- IMSI có thể có hiệu quả trên tinh trùng bất thường nặng.
- Khi thực hiện ICSI nên loại bỏ những tinh trùng có không bào lớn.
- Cần có thêm những nghiên cứu về hiệu quả cũng như giải thích cơ chế hiệu quả của IMSI và ảnh hưởng của không bào đến bất thường ADN.
- Hiện nay kỹ thuật IMSI cải tiến cũng mang lại kết quả tốt trong ICSI và chi phí cho kỹ thuật này thấp hơn so với IMSI hệ thống rất nhiều.
- Kỹ thuật IMSI cải tiến không làm tăng hiệu quả tạo phôi dựa trên các tỉ lệ thụ tinh, phân chia, phôi tốt.
- Kỹ thuật IMSI cải tiến có thể cải thiện tỉ lệ thai, tỉ lệ làm tổ của phôi.
- Kỹ thuật IMSI cải tiến đơn giản, tiết kiệm chi phí đầu tư và có thể giúp cải thiện tỉ lệ thành công trong hỗ trợ sinh sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, Antinori S. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reproductive BioMedicine Online* 2008; 6(6):835-841.
2. Balaban B, Yakin K, Alatas C, Oktem O, Isiklar A, Urman B. Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study. *Reproductive BioMedicine Online* 2011; 22:472-476.
3. Bartoov B, A Berkovitz, F Eltes, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y (2002). Good real-time morphology of the cells of the human sperm is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl*; 23:1-8.
4. Berkovitz et al. (2006). How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection *Reproductive BioMedicine Online* 12(5):634-8.
5. Boitrelle F, Ferfour F, Petit JM, Segretain D, Tourain C, Bergere M, Bailly M, Vialard F, Albert M, Selva J. Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: under thumbprints linked to failure of chromatin condensation. *Human Reproduction* 2011; 0:1-9.
6. De Vos A, De Velde HV, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Steirteghem AV. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 2003; 79(1):42-49.
7. Mauri AL, Peterson CG, Oliveira JBA, Massaro FC, Baruffi RLR, Franco JG. Comparison of day 2 embryo quality after conventional ICSI versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) using sibling oocytes. *European J of Obst & Gyn and Rep Bio* 2010. 150(1):42-46.
8. Ortega C, Verheyen G, Raick D, Camus M, Devroey P, Tournaye H. Absolute asthenozoospermia and ICSI: whar are the option? *Human Reproduction Updates* 2011; 17(5):684-692.
9. Perdrix A, Travers A, Chelli MH, Escalier D, Do Rego JL, Milazzo JP, Mousset – Simeon N, Mace B, Rives N. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Human Reproduction* 2011; 26(1):47-58.
10. Said TM and Land JA. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Human Reproduction Update* 2011; 0:1-15.
11. Setti AS, Ferreira RC, Braga DPA, Figueira RCS, Iaconelli A, Borges D. Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta-analysis. *Reproduction BioMedicine Online* 2010; 21:450-455.
12. Setti AS, Figueira RCS, Braga DPAF, Iaconelli A, Borges D. Intracytoplasmic morphological selected



sperm injection benefit for patients with oligo-astheno-zoospermia according to the 2010 World Health Organization reference values. *Fertility and Sterility* 2011; 95(8):2711-2714.

13. Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Fourth Edition, Volume 1: Laboratory Perspectives.
14. Watanabe S, Tanaka A, Fujii S, Mizunuma H, Fukui A, Fukuhara R, Nakamura R, Yamada K, Tanaka I, Awata S, Nagayoshi M. An investigation of the potential effect of vacuoles in human sperm on DNA damage using a chromosome assay and the TUNEL assay. *Human Reproduction* 2011; 26(5):978-986.
15. WHO (2010). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition, New York: Cambridge University Press.

CHỌN LỰA TINH TRÙNG DỰA TRÊN HOẠT ĐỘNG SINH LÝ: VAI TRÒ CỦA HYALURONIC ACID

Đặng Quang Vinh

CGRH

VAI TRÒ CỦA CHỌN LỌC TINH TRÙNG TRONG ICSI

Trong môi trường *in vivo* hay với thụ tinh trong ống nghiệm cổ điển (IVF), tinh trùng phải trải qua một số phản ứng thay đổi về cấu trúc cũng như khả năng di động như phản ứng hoạt hóa (capacitation), phản ứng cực đầu (acrosome reaction) và tăng động (hyperactivation). Tinh trùng sẽ phải đi xuyên qua lớp tế bào quanh trứng (cumulus và corona radiata cells) để bám vào màng trong suốt (zona pellucida – ZP). Từ đây, chỉ một tinh trùng duy nhất có thể xuyên qua màng bào tương của trứng để thụ tinh có thể xảy ra. Do đó, trong thụ tinh bình thường, có hai hiện tượng chọn lọc xảy ra để đảm bảo chỉ những tinh trùng bình thường và có khả năng thụ tinh cao nhất mới vào được bào tương trứng để hoàn tất quá trình thụ tinh. Hai rào cản đó chính là lớp tế bào quanh noãn và màng trong suốt. Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy chỉ những tinh trùng đã hoàn toàn trưởng thành mới có thể xuyên qua lớp tế bào quanh noãn này, và có mối liên hệ mật thiết giữa chỉ số gắn kết tinh trùng: zona pellucida (sperm: zona binding assay) và tỉ lệ thụ tinh trong *in vitro*.

Về mặt kỹ thuật, ICSI được xem là một kỹ thuật mang tính “xâm lấn”, khi một tinh trùng được đưa trực tiếp vào bào tương trứng đã trưởng thành, mà không trải qua các giai đoạn của thụ tinh tự nhiên. Trước khi tiến hành tiêm tinh trùng, các tế bào quanh trứng sẽ được tách bỏ và với sự hỗ trợ của hệ thống vi thao tác, một tinh trùng sẽ được tiêm trực tiếp vào bào tương trứng. Như vậy, các “hàng rào” sinh học tự nhiên đã hoàn toàn bị vượt qua. Do đó, trong ICSI, việc lựa chọn tinh trùng để đưa vào sử dụng đóng vai trò rất quan trọng. Hiện nay, công đoạn này chủ yếu dựa vào kinh nghiệm của người thực hiện, thông qua việc quan sát đánh giá hình dạng và di động của tinh trùng dưới kính hiển vi.



Phân mảnh tinh trùng là tình trạng tổn thương chuỗi DNA của tinh trùng, có thể xảy ra trên một hay cả hai chuỗi. Đây được xem là hậu quả của nhiều yếu tố tác động như hiện tượng chết theo chu trình, bất thường quá trình sinh tinh, tiếp xúc các tác nhân oxi hóa, hóa trị/xạ trị. Trong một nghiên cứu phân tích gộp trên 11 nghiên cứu bao gồm 1.549 chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) vào năm 2008, kết quả cho thấy phân mảnh DNA tinh trùng có thể làm tăng nguy cơ sảy thai lên 2,48 lần. Kết quả này cũng được tìm thấy trong một nghiên cứu phân tích gộp gần đây. Các tác giả đề nghị rằng nguy cơ sảy thai sau TTTON có thể được giảm thiểu bằng cách tầm soát, lựa chọn những tinh trùng có tỉ lệ phân mảnh DNA thấp trước khi TTTON. Ngoài ra, Nars-Esfahani và cộng sự cũng cho thấy có mối liên hệ giữa bất thường hình dạng tinh trùng và tỉ lệ DNA phân mảnh ($r=0,36$ với $p=0,008$). Như vậy, những tinh trùng có thể sẽ không được lựa chọn trong tự nhiên lại được thụ tinh với trứng thông qua kỹ thuật vi thao tác.

Tinh trùng có bất thường về di truyền (lệch bội, DNA phân mảnh) nếu được thụ tinh với trứng có thể gây ra một số nguy cơ. Mối liên hệ mật thiết giữa bất thường di truyền hay DNA phân mảnh (DNA fragmentation) với tỉ lệ sảy thai đã được chứng minh qua một nghiên cứu tổng quan hệ thống (systematic review). Nghiên cứu này, tổng kết số liệu từ 11 bài báo cáo với 1.549 chu kỳ TTTON, cho thấy phân mảnh DNA có tương quan có ý nghĩa thống kê với tỉ lệ sảy thai (OR là 2,48; với khoảng tin cậy 95% là 1,52-4,04; $p=0,0001$). Do đó, việc lựa chọn được tinh trùng trưởng thành, có khả năng thụ tinh cao và không bất thường về di truyền đóng vai trò quan trọng trong ICSI, nhất là trong các trường hợp số lượng trứng có hạn.

Thống kê trên thế giới cho thấy số chu kỳ TTTON bằng kỹ thuật ICSI đang có xu hướng tăng cao với chỉ định ngày càng được mở rộng. Xu hướng này cũng được ghi nhận tại Việt Nam. Vào năm 2011, có khoảng 7.000 chu kỳ TTTON được thực hiện, trong đó, số chu kỳ ICSI chiếm trên 80%. Do đó, việc lựa chọn tinh trùng phù hợp, không bất thường về di truyền đang là một yếu tố cần quan tâm để tăng tính an toàn và hiệu quả của kỹ thuật.

CHỌN LỌC TINH TRÙNG BẰNG HYALURONIC ACID

Lựa chọn tinh trùng bằng Hyaluronic acid (HA) dựa trên cơ sở hiểu biết về phân tử và tế bào của quá trình trưởng thành tinh trùng, đặc biệt những yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình chọn lọc tinh trùng trong thụ tinh trong tự nhiên. Một số chỉ số sinh học (biomarker) đã được sử dụng để tiên đoán khả năng thụ tinh của tinh trùng, hoàn toàn độc lập với các giá trị của tinh dịch đồ, trong đó, đáng chú ý là

creatinine kinase (CK). Người ta ghi nhận nồng độ CK trong tinh trùng những người thuộc nhóm vô sinh thường cao hơn hẳn so với nhóm đã từng có con. Gia tăng nồng độ CK được cho là hậu quả của tăng lượng protein có trong bào tương, một biểu hiện của sự bất thường trong quá trình trưởng thành của tinh trùng. Dữ liệu nghiên cứu cũng cho thấy bất thường của quá trình loại bỏ bào tương và tái cấu trúc màng tinh trùng gây ảnh hưởng xấu đến sự toàn vẹn DNA và bất thường nhiễm sắc thể (NST).

Có mối tương quan giữa nồng độ CK trong tinh trùng với chỉ số gắn kết HA trong mẫu tinh dịch. Trong một khảo sát trên 56 bệnh nhân, được chia làm 3 nhóm, nhóm 1 gồm những bệnh nhân có chỉ số gắn kết $\geq 80\%$, nhóm 2 có chỉ số gắn kết trong khoảng 60-80% và nhóm 3 có chỉ số gắn kết $\leq 60\%$. Nồng độ CK trung bình ở ba nhóm lần lượt là $0,18 \pm 0,02$ CK IU/ 10^8 tinh trùng, $0,5 \pm 0,06$ CK IU/ 10^8 tinh trùng và $2,8 \pm 0,1$ CK IU/ 10^8 tinh trùng (giá trị bình thường là $<0,25$). Ngoài ra, còn có mối liên quan giữa chỉ số CK và kết quả thành công của IUI và IVF.

HA là một hoạt chất sinh học, có mặt ở nhiều cơ quan trong cơ thể người phụ nữ, bao gồm trong các tế bào bao quanh trứng. Chỉ những tinh trùng hoàn toàn trưởng thành mới có thụ thể với HA, bên cạnh thụ thể để gắn kết trên màng trong suốt. Do đó, người ta thấy rằng nếu tinh trùng có khả năng gắn kết HA thì cũng sẽ có thụ thể với ZP. Đây là cơ sở lý luận cho việc sử dụng HA để khảo sát khả năng gắn kết của tinh trùng với ZP một cách gián tiếp. Yagci và cộng sự cho thấy tinh trùng trong mẫu tinh dịch có khoảng 50% bắt màu đỏ dưới kính hiển vi huỳnh quang, một dấu hiệu cho thấy có tổn thương DNA. Trong khi đó, tinh trùng có gắn kết với HA, 100% tinh trùng đều bắt màu xanh, cho thấy sự toàn vẹn của DNA bên trong.

Nhiều chứng cứ cho thấy các thụ thể với HA chỉ xuất hiện ở những tinh trùng đã qua giai đoạn trưởng thành thông qua quá trình sắp xếp lại cấu trúc của màng tế bào tinh trùng, và do đó, chỉ những tinh trùng trưởng thành mới có khả năng gắn kết chặt với HA. Cho đến hiện nay, thử nghiệm gắn kết của tinh trùng vào màng trong suốt vẫn được xem là một xét nghiệm giúp sàng lọc các tinh trùng trưởng thành, có khả năng thụ tinh cao và có thể giúp tiên lượng khả năng thành công của IVF cổ điển. Khả năng chọn lọc tinh trùng của HA đã được chứng minh là tương đương với màng trong suốt. Trong khảo sát khả năng gắn kết với HA (Hyaluronan Binding Assay – HBA), sự gắn kết với HA của tinh trùng xảy ra ổn định trong khoảng thời gian 8-10 phút. Vị trí gắn kết xảy ra ở phần đầu của tinh trùng. Chỉ những tinh trùng nào gắn kết chặt với HA thì mới có đạt độ trưởng thành cao, không còn giọt bào tương, có cấu trúc thể cực đầu toàn vẹn. Trong một nghiên cứu năm 2010, Parmegiani và cộng sự đã cho thấy tinh trùng gắn kết với HA có tỉ lệ



phân mảnh DNA thấp hơn so với tinh trùng trong tinh dịch và tinh trùng sau khi đã lọc rửa. Do đó, tác giả đã đề nghị chỉ nên sử dụng HA để chọn lọc tinh trùng trước khi ICSI để hướng tới một điều trị gần với sinh lý tự nhiên.

CHỌN LỌC TINH TRÙNG BẰNG HA TRONG TIÊM TINH TRÙNG VÀO BÀO TƯƠNG NOÃN

Các nghiên cứu gần đây cho thấy kết quả của một chu kỳ ICSI có thể được cải thiện khi sử dụng tinh trùng có gắn kết với HA so với sử dụng PVP. Kết quả cũng cho thấy khi sử dụng những tinh trùng gắn kết HA để tiêm vào bào tương trứng trong ICSI có thể gia tăng tỉ lệ phôi có chất lượng tốt, tỉ lệ thai lâm sàng có khuynh hướng tăng và giảm tỉ lệ sẩy thai. Trong khi đó, kết quả một báo cáo loạt ca cho thấy có mối tương quan nghịch giữa tỉ lệ gắn kết HA với thiếu hụt protamine và phân mảnh DNA với hình dạng bất thường của tinh trùng ($p < 0,05$). Ngoài ra, tỉ lệ thụ tinh trong nhóm sử dụng tinh trùng gắn kết HA cao hơn ($p < 0,05$), trong khi tỉ lệ thai lâm sàng và làm tổ của phôi tăng nhưng không có ý nghĩa thống kê (Nasr-Esfahani và cs., 2008).

Trong một nghiên cứu hồi cứu trên số lượng lớn hơn (331 chu kỳ ICSI sử dụng HA), khi so sánh với 97 chu kỳ ICSI dùng PVP, nhóm tác giả này cho thấy tỉ lệ phôi chất lượng tốt và tỉ lệ làm tổ ở nhóm sử dụng HA cao hơn so với PVP (lần lượt là 32,3% so với 21,6%, $p = 0,011$ và 17,1% và 10,3%, $p = 0,047$; Parmegiani và cs., 2010b). Cho đến nay, có hai nghiên cứu với thiết kế chặt chẽ nhằm đánh giá hiệu quả của HA đã được báo cáo. Với thiết kế là ngẫu nhiên có nhóm chứng (RCT) trên 232 bệnh nhân, Parmegiani và cộng sự kết luận sử dụng những tinh trùng gắn kết HA để tiêm vào bào tương trứng trong ICSI giúp tỉ lệ phôi tốt tăng cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm sử dụng PVP (35,8% so với 24,1% với $p = 0,046$). Ngoài ra, các tác giả cũng ghi nhận tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ làm tổ có xu hướng cao hơn ở nhóm sử dụng HA, mặc dù không có ý nghĩa thống kê. Một nghiên cứu ngẫu nhiên có nhóm chứng khác, được thực hiện trên đối tượng là 407 trứng lại cho thấy sử dụng tinh trùng gắn kết HA không làm thay đổi chất lượng phôi ở giai đoạn hợp tử so với sử dụng PVP. Tuy nhiên, các tác giả vẫn khuyến cáo HA nên là một lựa chọn thay thế cho PVP trong ICSI vì có nguồn gốc tự nhiên (Van der Bergh, 2009). Một nghiên cứu RCT khác thực hiện trên 215 bệnh nhân lại cho thấy các phôi có nguồn gốc từ tinh trùng gắn kết với HA có khả năng phát triển thành phôi nang cao hơn có ý nghĩa so với sử dụng tinh trùng từ PVP (Worilow và cs., 2007). Các nghiên cứu khác, đa số là thiết kế so sánh, cho thấy sử dụng tinh trùng gắn kết với HA có thể cải thiện tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ phôi tốt, tỉ lệ thai lâm sàng và làm giảm tỉ lệ sẩy thai

(WorriLOW và cs., 2007) hay làm tăng tỉ lệ phôi tốt và tỉ lệ làm tổ của phôi (Parmegiani và cs., 2010a).

Tại Việt Nam, cho đến nay, PVP vẫn được sử dụng một cách thường qui tại đa số các trung tâm TTON. Chúng tôi đã tiến hành một nghiên cứu so sánh nhằm đánh giá hiệu quả của sử dụng tinh trùng gắn kết với HA trên tỉ lệ thai diễn tiến trong các chu kỳ ICSI. Đây là đề tài nghiên cứu cấp Đại học Quốc gia, do Khoa Y quản lý và được thực hiện dưới sự chủ trì của Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản (CGRH), phối hợp thực hiện với IVF Vạn Hạnh.

Nghiên cứu này được thực hiện trên 700 chu kỳ ICSI, gồm hai nhóm bệnh nhân sử dụng tinh trùng gắn kết với HA (HA-ICSI) và nhóm sử dụng tinh trùng với PVP như thường qui (PVP-ICSI). Đặc điểm bệnh nhân ở hai nhóm là tương đồng (bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm chung của bệnh nhân

	HA-ICSI n=350	PVP-ICSI n=350	p
Tuổi trung bình của bệnh nhân (năm)	32,3 ± 3,7	32,7 ± 3,4	0,95
Thời gian vô sinh trung bình (năm)	4,1 ± 2,3	3,9 ± 2,8	0,46
Số chu kỳ điều trị trung bình	1,7 ± 1,1	1,6 ± 1	0,21
Tổng liều FSH trung bình (IU)	2.271 ± 874,3	2.707,5 ± 975,2	0,49
Thời gian KTBT trung bình (ngày)	10,8 ± 1,9	10,9 ± 1,9	0,72
NMTC trung bình (mm)	11,2 ± 2,2	10,9 ± 2,1	0,37

Ghi chú: KTBT: kích thích buồng trứng, NMTC: nội mạc tử cung

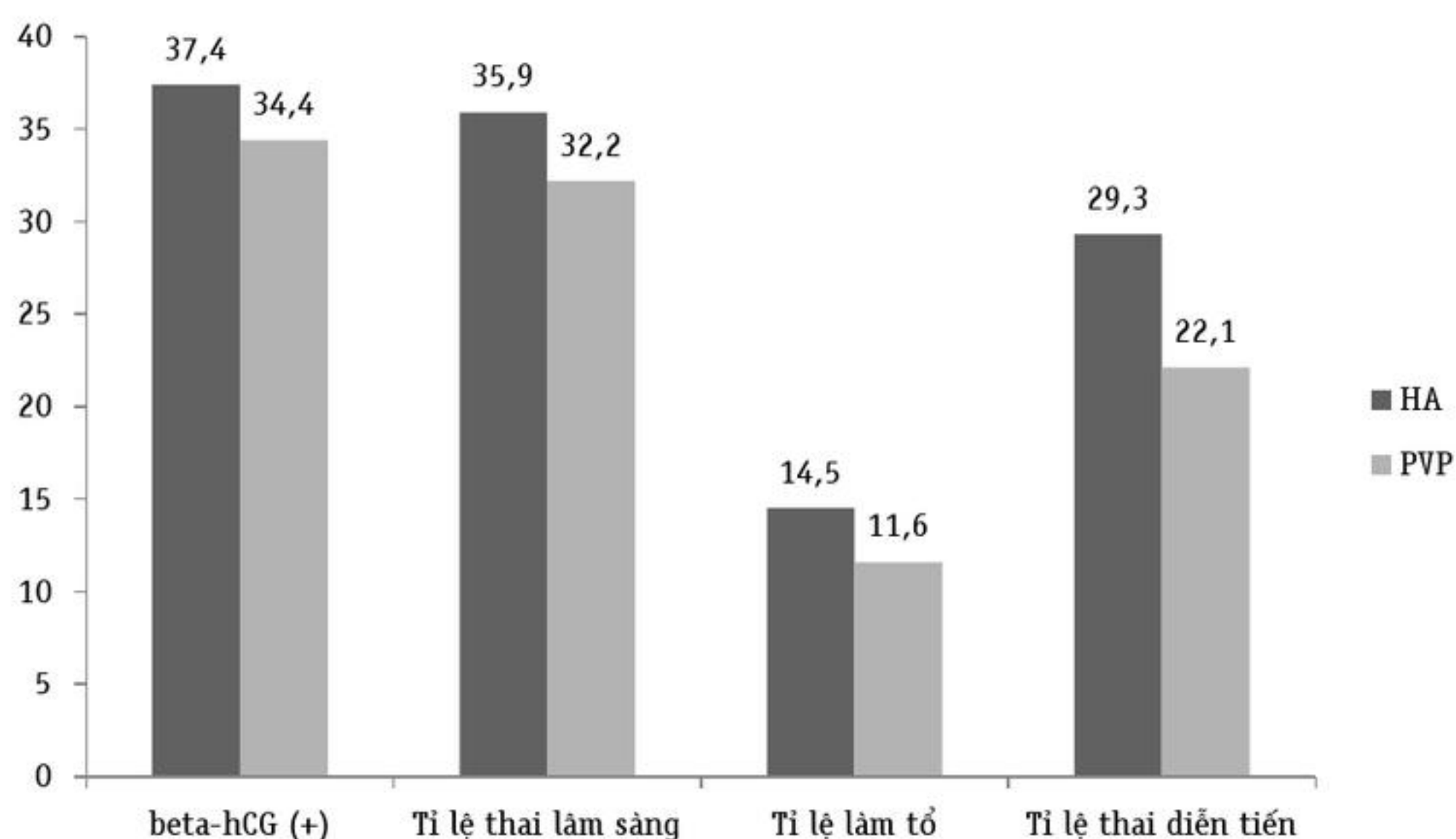
Trong chu kỳ điều trị, số trứng chọc hút và số phôi tạo thành ở nhóm HA-ICSI cao hơn so với nhóm PVP-ICSI. Tuy nhiên, tỉ lệ thụ tinh và các yếu tố khác không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (bảng 2). Như đã đề cập, sử dụng HA được ghi nhận có thể giúp cải thiện tỉ lệ thụ tinh (WorriLOW và cs., 2007; Nars-Esfahani và cs., 2008), tỉ lệ phôi chất lượng tốt (WorriLOW và cs., 2007; Parmegiani và cs., 2010b), tỉ lệ thai và làm tổ của phôi (Parmegiani và cs., 2010b, WorriLOW và cs., 2011). Tuy nhiên, các kết quả này không được tìm thấy trong nghiên cứu của chúng tôi. Tỉ lệ thụ tinh ở hai nhóm HA-ICSI và PVP-ICSI là tương đương, do đó, sự khác biệt về số phôi trung bình ở hai nhóm có thể do sự không tương đồng về số trứng chọc hút



giữa hai nhóm (bảng 1). Khi đánh giá về tỉ lệ phôi chất lượng tốt, kết quả cho thấy không có sự khác biệt giữa hai nhóm. Kết quả này phù hợp với một nghiên cứu phân tích gộp, trong đó, tác giả kết luận rằng không có mối liên hệ giữa tình trạng phân mảnh DNA tinh trùng và chất lượng phôi (Zini và cs., 2011). Kết quả này ủng hộ giả thuyết cho rằng các bất thường trong tinh trùng thường bắt đầu có ảnh hưởng sau giai đoạn phôi đã được hoạt hóa bộ gen, cũng như sau giai đoạn làm tổ (Shoukir và cs., 1998).

Bảng 2. Kết quả điều trị

	HA-ICSI n=350	PVP-ICSI n=350	p
Số trứng chọc hút trung bình	12,8 ± 6,2	11,9 ± 6,4	0,040
Tỉ lệ thụ tinh (%)	79,5	78,1	0,150
Tỉ lệ thoái hóa (%)	9,1	7,8	0,020
Số phôi trung bình	7,5 ± 4,4	6,7 ± 4,6	0,005
Số phôi tốt trung bình	3,6 ± 3,2	3,7 ± 3,3	0,690
Số phôi chuyển trung bình	3,2 ± 1	3,4 ± 0,9	0,090
Số phôi trữ trung bình	2,4 ± 3,1	2,6 ± 3,4	0,480



Biểu đồ 1. Kết quả có thai

Kết quả có thai được trình bày trong biểu đồ 1. Tỷ lệ beta hCG dương tính ở nhóm HA-ICSI và PVP-ICSI lần lượt là 37,4% và 34,4% với $p=0,19$. Không có sự khác biệt về tỷ lệ thai lâm sàng cũng như tỷ lệ làm tổ của phôi giữa hai nhóm, mặc dù các tỷ lệ này đều có khuynh hướng cao hơn ở nhóm HA. Khi đánh giá tỷ lệ thai diễn tiến ở thời điểm 20 tuần, có tổng cộng 31 trường hợp mất dấu ở cả hai nhóm, trong đó, 9 trường hợp thuộc nhóm HA-ICSI (2,6%) và 22 trường hợp thuộc nhóm PVP-ICSI (6,3%). Kết quả cho thấy những bệnh nhân sử dụng HA có tỷ lệ thai diễn tiến cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm sử dụng PVP (29,3% so với 22,1% với $p=0,009$). Điều này có nghĩa rằng cứ 14 cặp vợ chồng được thực hiện ICSI với tình trạng chọn lọc bằng HA thì sẽ có thêm 1 trường hợp có thai diễn tiến đến 20 tuần. Trong năm 2011, ước tính Việt Nam có khoảng 6.000 chu kỳ ICSI. Nếu tất cả được thực hiện bằng HA thì sẽ có thêm trên 400 cặp vợ chồng có thai đến thời điểm 20 tuần. Đây là một con số có ý nghĩa rất lớn về mặt nhân văn, xã hội cũng như kinh tế khi ở Việt Nam, toàn bộ chi phí điều trị TTTON đều do bệnh nhân chi trả. Kết quả này cũng phù hợp với những nghiên cứu khác khi ghi nhận tỷ lệ sảy thai có khuynh hướng giảm (Worilow và cs., 2007; Parmegiani và cs., 2010a). Gần đây nhất, trong một nghiên cứu đa trung tâm, tiến cứu, ngẫu nhiên, mù đôi, các tác giả ghi nhận tình trạng sảy thai thấp hơn đáng kể ở nhóm HA-ICSI so với nhóm PVP-ICSI (2% so với 16,8% với $p=0,02$, Worilow và cs., 2011). Kết quả này có thể lý giải bởi một trong những cơ chế của HA là chọn lựa tinh trùng với ít tổn thương DNA, và do đó, làm giảm nguy cơ sảy thai.

Ở các trung tâm TTTON có các quy trình điều trị ổn định và duy trì hiệu quả tốt, việc tiếp tục cải tiến từng bước các khâu kỹ thuật sẽ góp phần tăng tỷ lệ thành công. Số chu kỳ thực hiện ICSI ngày càng tăng ở các trung tâm TTTON trên thế giới, cũng như ở Việt Nam. Chọn lọc tinh trùng để ICSI hiện nay là một vấn đề được quan tâm hàng đầu trong điều trị TTTON. Nhiều kỹ thuật được áp dụng rộng rãi trong thời gian gần đây như chọn lựa tinh trùng dựa vào phóng đại hình dạng tinh trùng (IMSI) và sử dụng HA để chọn lựa tinh trùng một cách sinh lý hơn (PICSI, SpermSlow). Trong các biện pháp phổ biến được sử dụng để tăng cường chọn lọc tinh trùng, sử dụng SpermSlow là biện pháp có chi phí thấp nhất. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chứng minh việc sử dụng SpermSlow để chọn lọc tinh trùng sinh lý là khả thi và hiệu quả trong điều kiện cụ thể Việt Nam và trên đối tượng bệnh nhân Việt Nam. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về vấn đề này và góp phần cho thấy hiệu quả của việc chọn lọc tinh trùng trong việc cải thiện tỷ lệ thành công của kỹ thuật ICSI.



TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. Lê Thụy Hồng Khả, Nguyễn Ngọc Quỳnh, Nguyễn Hữu Duy, Nguyễn Ngọc Bích, Nguyễn Thị Mai, Đặng Quang Vinh (2012). Sử dụng Hyaluronic acid thay thế PVP làm tăng tỉ lệ thai diễn tiến trong các chu kỳ tiêm tinh trùng vào bào tương noãn. Tạp chí Phụ Sản 10:51-57.
2. Parmegiani L, Cognigni G, Ciampaglia W et al (2010b). Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. J Assist Reprod Genet; 27:13-6.
3. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M (2010a). "Physiologic ICSI": Hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. Fertil Steril; 93:598-604.
4. Robinson L, Gallos I, Conner S, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, Kirkman-Brown J, Coomarasamy A (2012). The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod; 27:2908-17.
5. Sakkas D, Alvarez JG (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. Fertil Steril; 93:1027-36.
6. Worilow KC, Eid S, Woodhouse D, Witmyer J, Liebermann J (2011). Increased clinical pregnancy rates (CPR) and statistically significant decrease in loss rates using hyaluronan in sperm selection: prospective, multi-center, double-blind, randomized clinical trial. Fertil Steril; 96:S179.

THE QUALITY OF GAMETES AND EMBRYOS DO MATTER IN IMPROVING ART OUTCOME

Liow Swee Lian DVM, PhD
Sincere IVF Center
Novena Specialist Center
Singapore

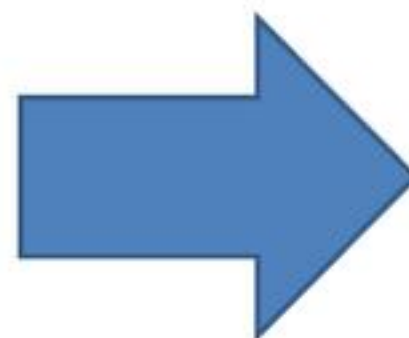
1

Responsibilities of Reproductive Failure

80%



10%



UTERUS

10%

Adapted from D. Sakkas

2



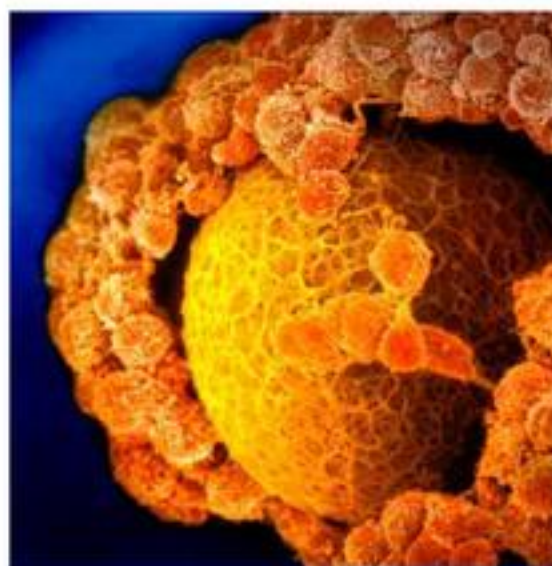
OVARIAN STIMULATION

- GnRH agonist + FSH
- GnRH antagonist + FSH
- HMG
- Minimal stimulation

3

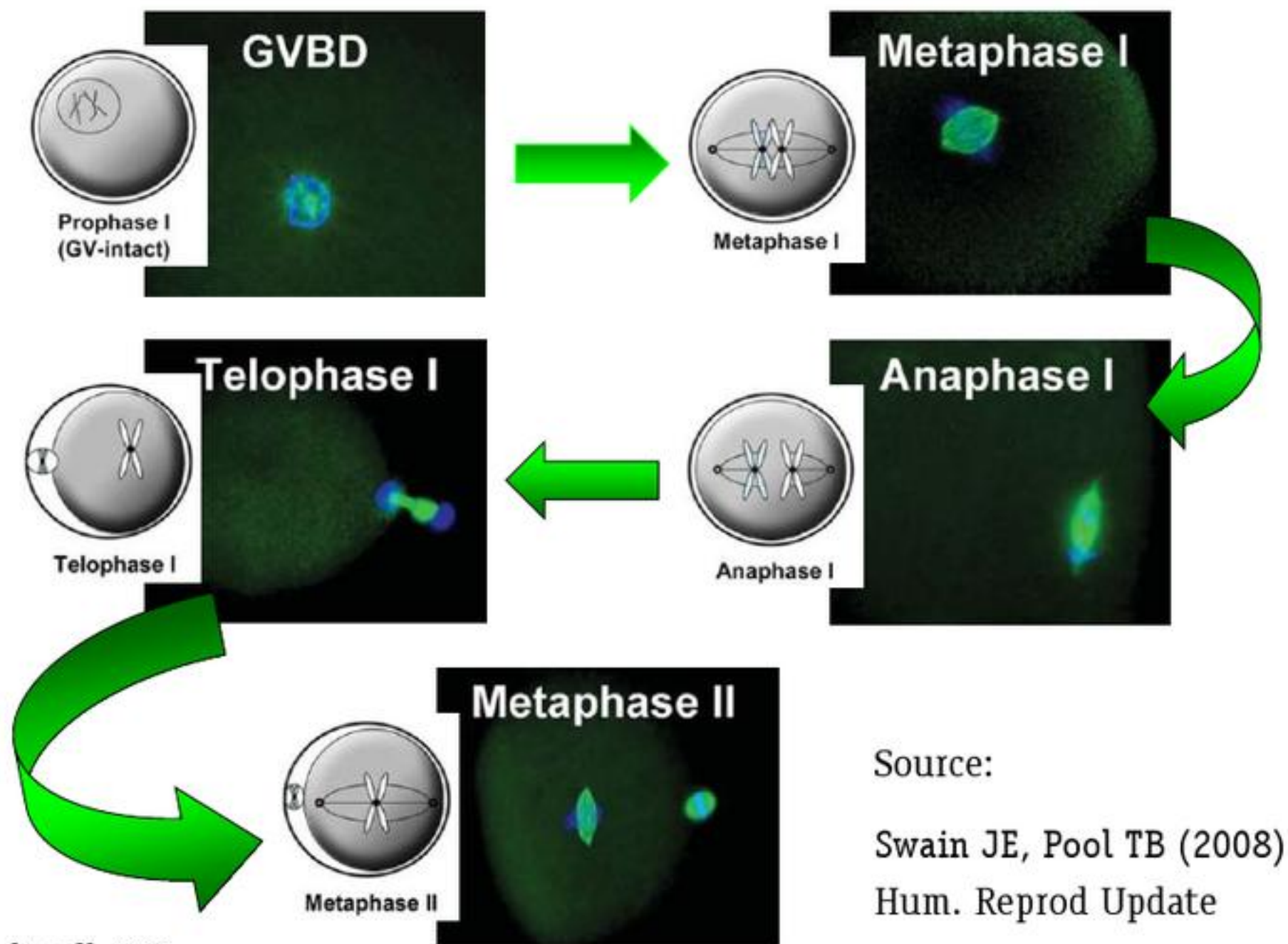
FACTORS THAT AFFECT FERTILIZATION, EMBRYO DEVELOPMENT AND IMPLANTATION

1. Oocyte maturation
2. Oocyte competence
3. Oocyte morphology



4

Stages of Oocyte Maturation



Liow SL, 2008

5

FACTORS THAT AFFECT EMBRYO DEVELOPMENT

Oocyte competence

Four levels of oocyte competence:

1. Ability to resume meiosis
2. Ability to cleave following fertilization
3. Ability to develop to blastocyst stage
4. Ability to induce a pregnancy and bring it to term

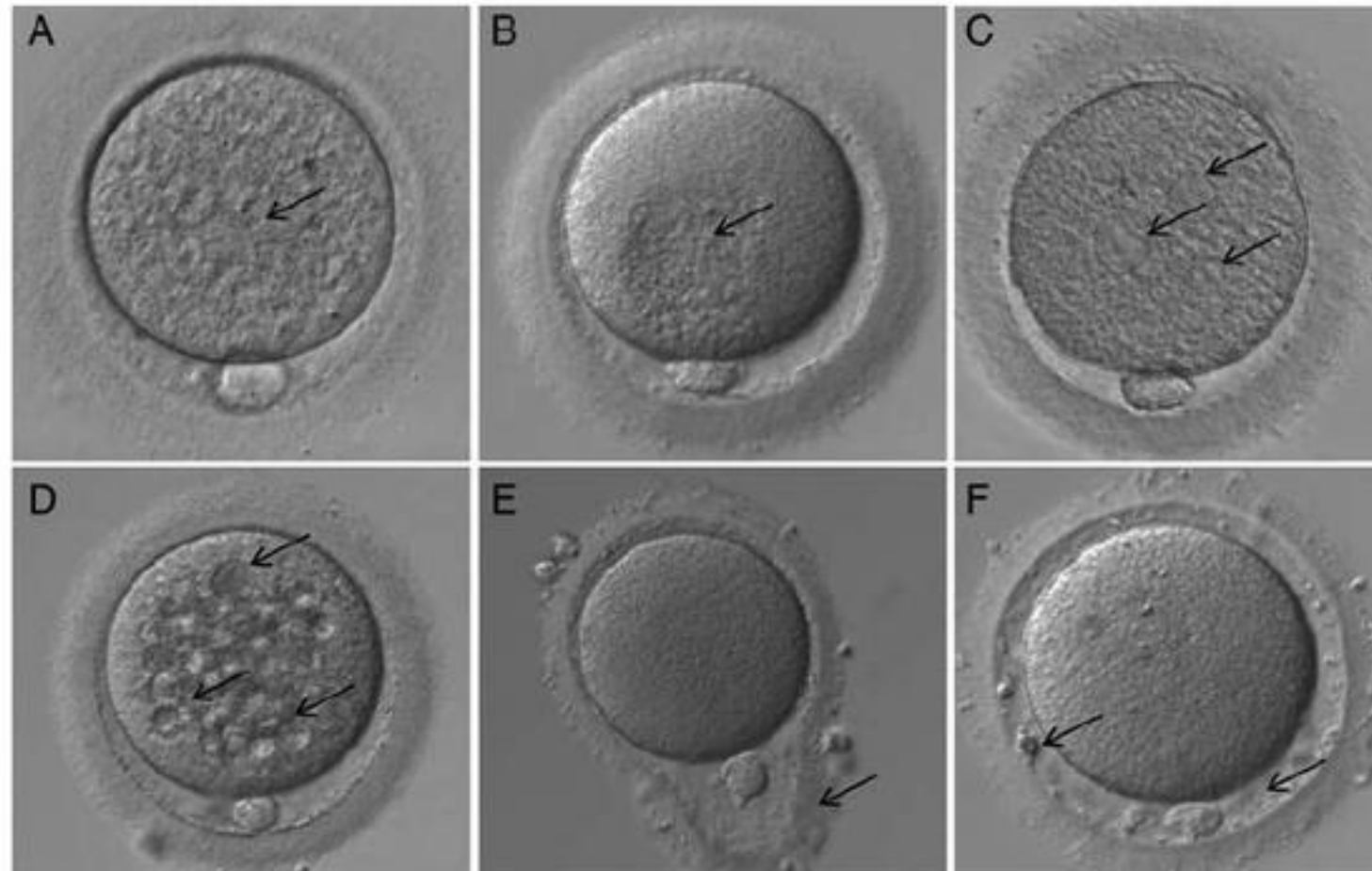
Liow SL, 2008

6



Predictive value of oocyte morphology

Human oocyte morphological abnormalities

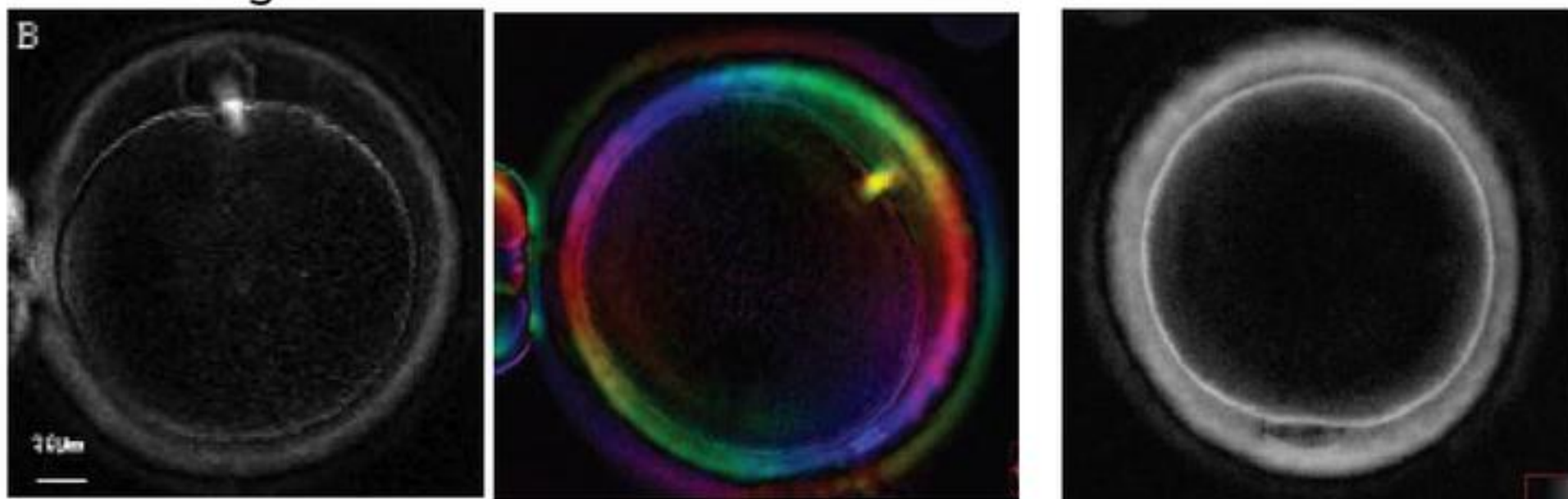


Rienzi L et al. (2011). Hum. Reprod Update 17(1):34-45

7

Oocyte maturation: meiotic spindle

- Meiotic Spindle is a more accurate indicator of nuclear stage.



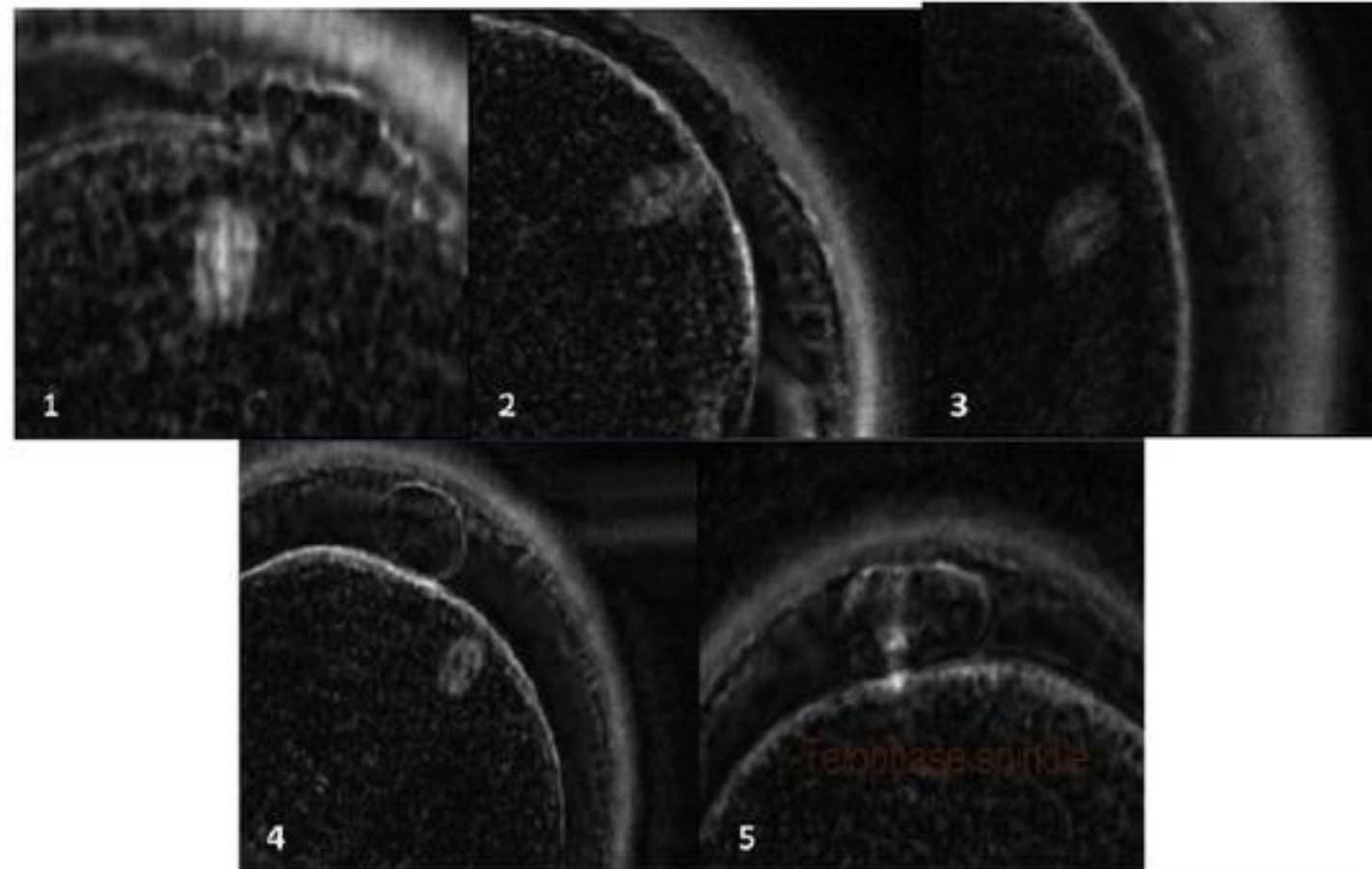
Early telophase 1: Ooplasm and PB is still continuous

Interphase 2: PB extruded but MS not formed yet

- Meiotic Spindle can also be affected by suboptimal culture conditions, temperature fluctuations, chemical stress during manipulation.

8

Human oocyte: meiotic spindle abnormalities under polarized light microscopy



1: Normal spindle
2-5: Abnormal spindle

Kilani S et al. (2011). Fertil Steril

9

Human Oocyte: Outcome of normally and abnormally shaped spindle

	Normally shaped spindles	Abnormally shaped spindles
Oocytes with a visible spindle	205 (29%) ^a	506 (71%) ^a
Fertilization	185 (90%) ^a	366 (72%) ^a
Blastulation	140 (76%) ^a	115 (31%) ^a
Utilization	100 (71%) ^a	52 (45%) ^a
Blastocysts transferred	68	32
Clinical pregnancy rate	37/68 (54%) ^a	0/32 ^a
Implantation	28 singleton live birth, 2 sets of monozygotic twins, 7 miscarriages 37 (54%) ^a	0 ^a

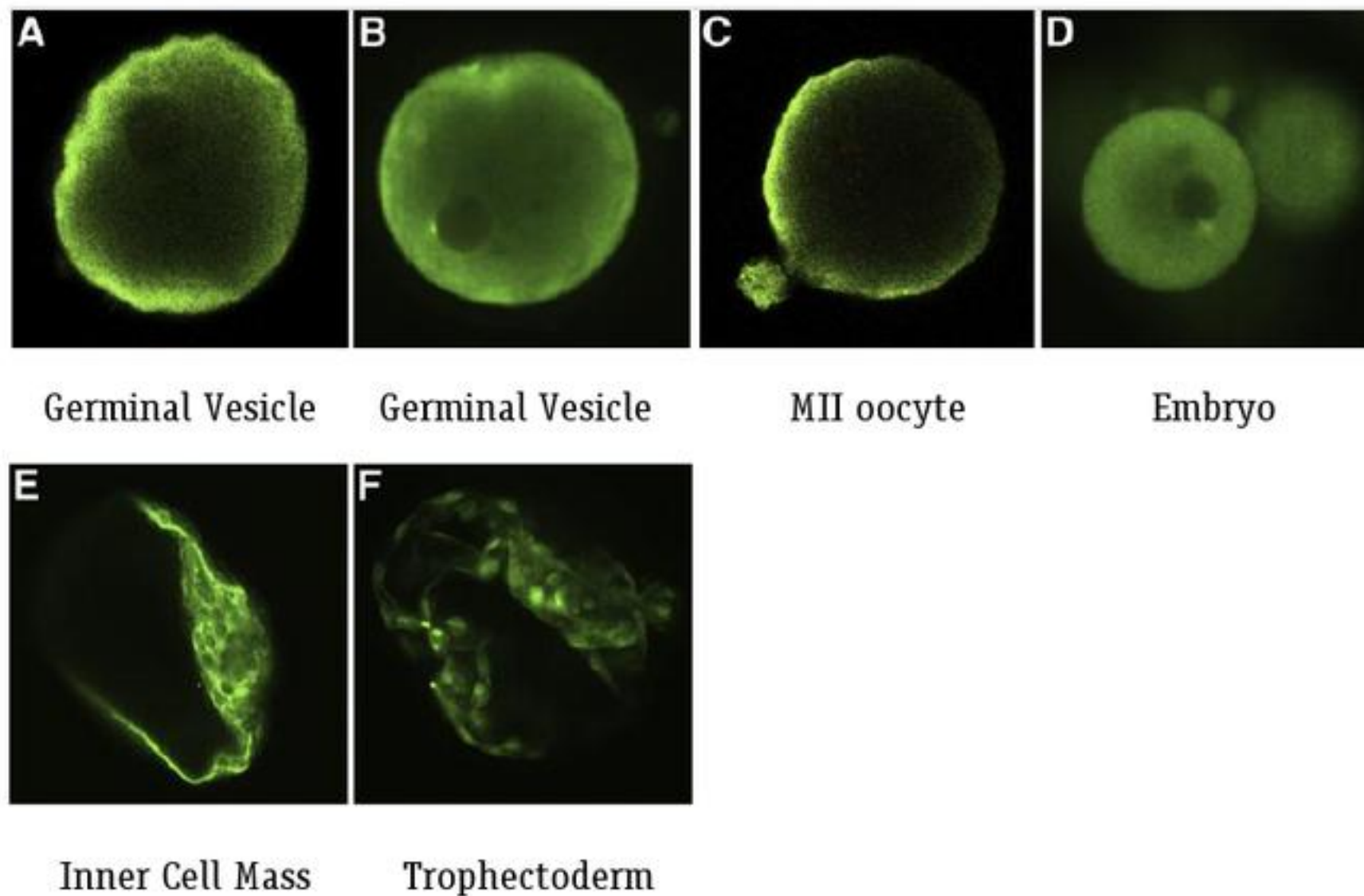
^a $P < .001$ (chi-square test).

Kilani. Meiotic spindle normality. Fertil Steril 2011.

10



Survivin in human oocytes and embryos



Balakier et al. (2012), Fertil Steril

11

CAUSES OF EMBRYO LOSS



- Maternal effects:
 - Oocyte quality
 - Endometrial receptivity
 - Chromosomal aneuploidy
- Paternal effects:
 - Chromosomal aneuploidy
 - Numerical
 - Structural
 - DNA fragmentations

12

PATERNAL EFFECTS

– Early paternal effects:

Associated with sperm cytoplasmic deficiencies:

- Poor zygote and early embryo morphology
- Low cleavage speed

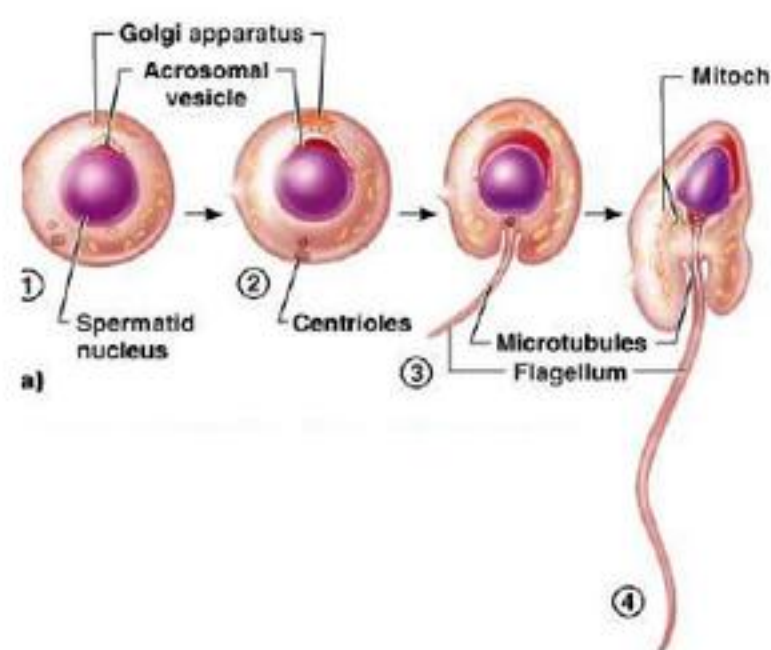
– Late paternal effects:

Associated with sperm DNA fragmentations:

- Poor developmental competence
- Implantation failure

13

SPERMATID INJECTION



- First baby born in 1995 (Fishel et al., 1995).
- 35 pregnancies reported, 1995-1998.
- Better outcome can be obtained from injecting elongating and elongated spermatids.

Liow SL, 2010

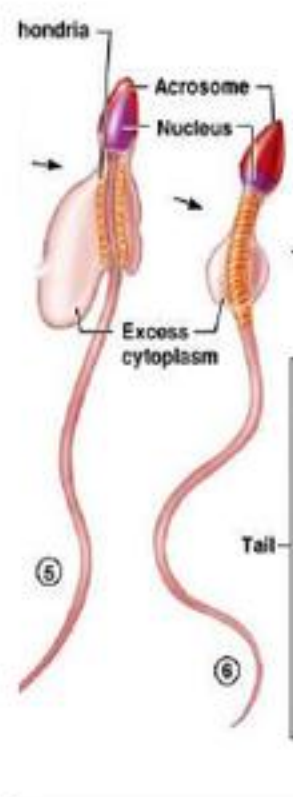
14



Testicular sperm injection

Obstructive vs Non-obstructive Azoospermia:

- Better outcome from Obstructive azoospermia
- Mostly congenital abnormalities and maturation arrest in Non-obstructive azoospermia

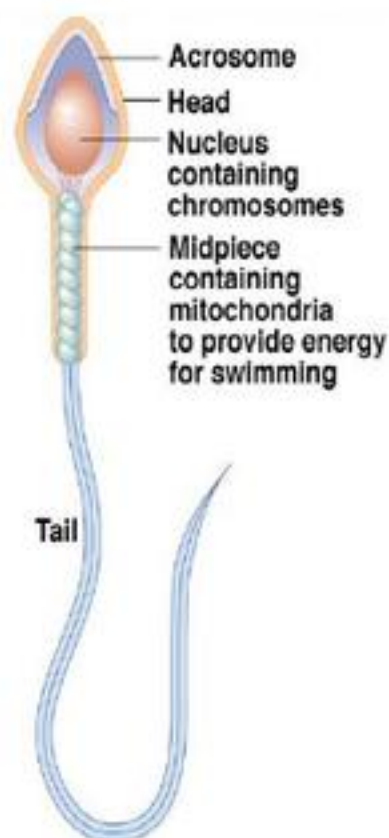


Fresh vs frozen testicular sperm:

- Similar results

(Devroey et al., 1995; Tournaye et al., 1999)

15

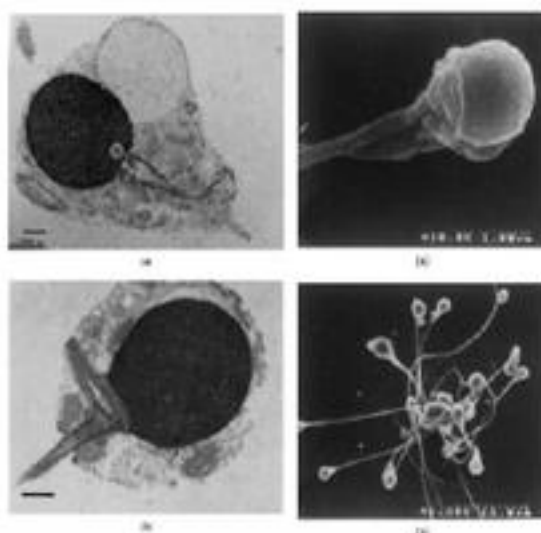


Mature spermatozoa

- Fertilization rate: 75%
- Pregnancy rate: 35-45%

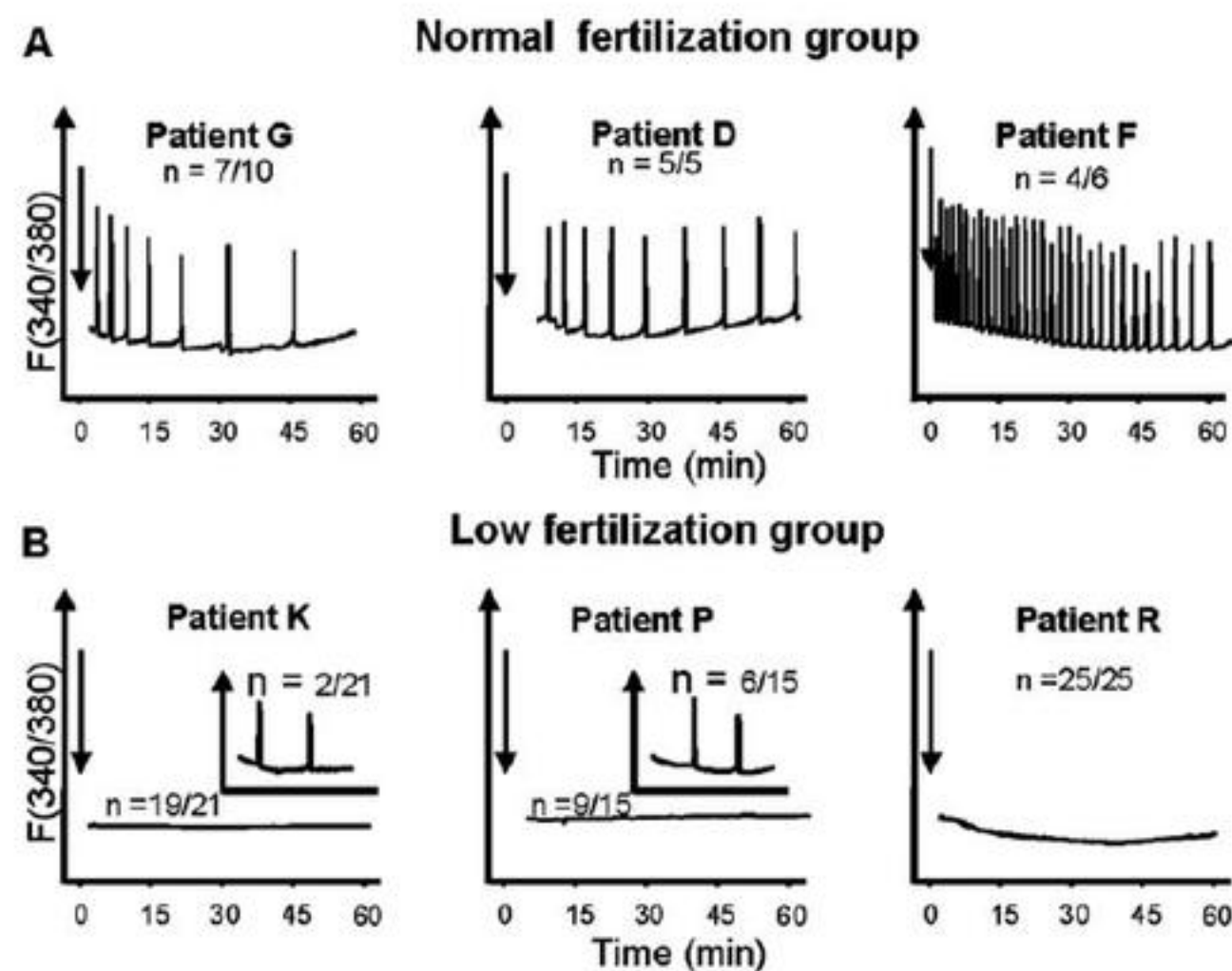
Poor outcome:

- Globospermia – acrosomeless sperm
- Karteganer syndrome – ciliary dyskinesia, total immotile sperm



16

Calcium inducing ability between fertile and infertile sperm

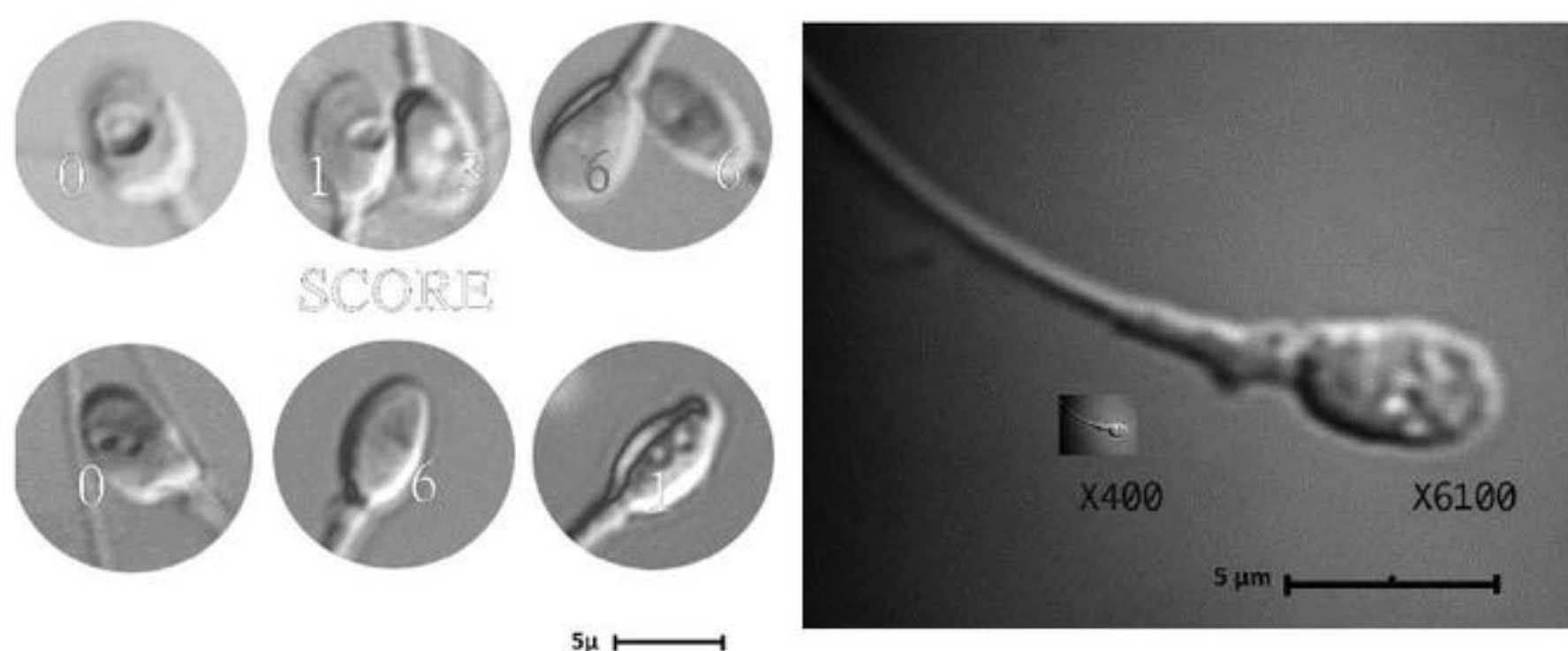


Kashir et al. (2010). Hum. Reprod Update

17

High magnification contrast microscopy

Vacuoles in sperm head



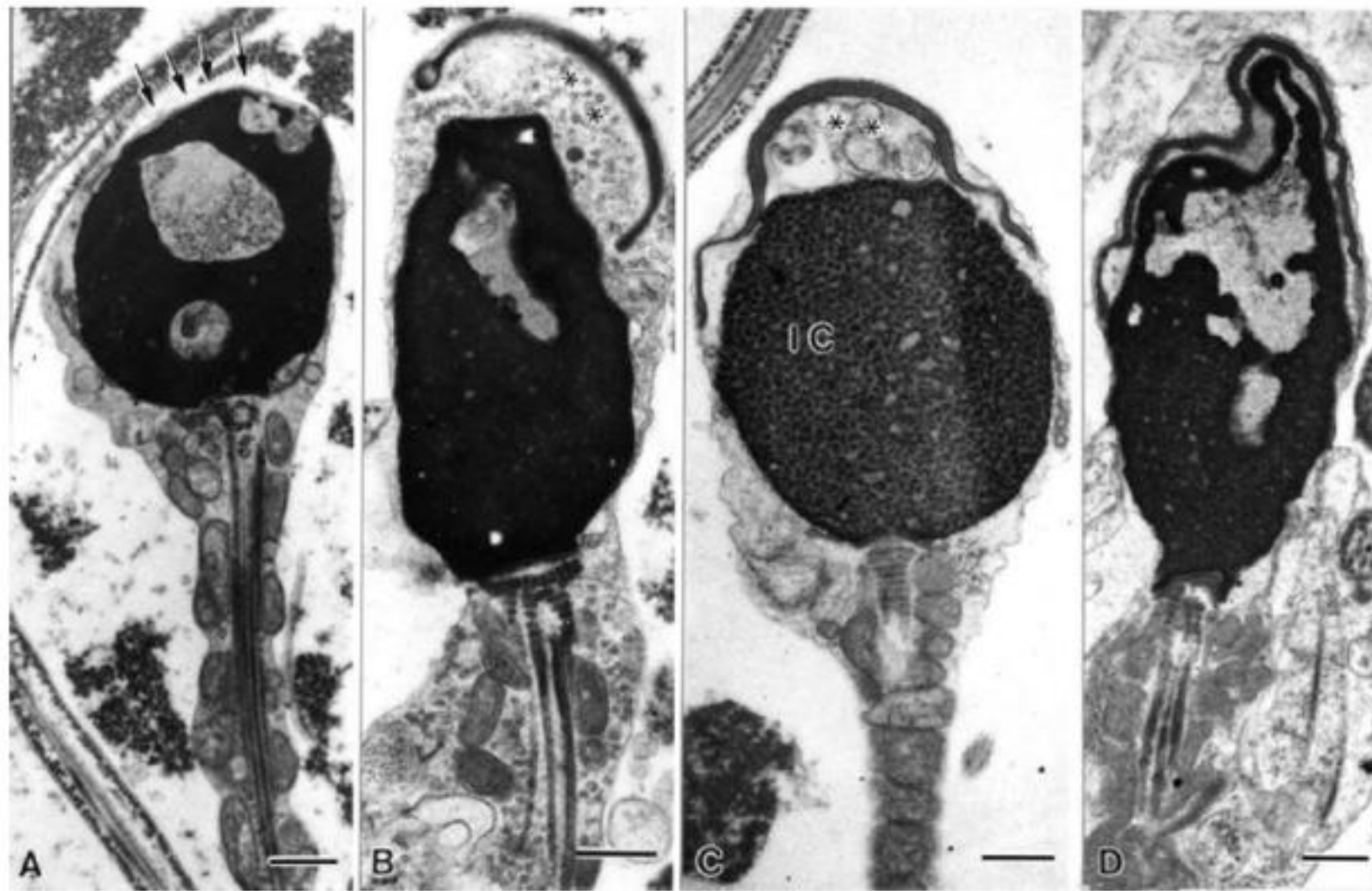
Cassuto et al. (2011). RBM Online 10.1016/j.rbmo.2011.10.006

18



Sperm Abnormalities

Chromatin defects



Liow SL, 2010

19

Systems Biology in Reproductive Medicine, 2011, 0: 1–6
Copyright © 2011 Informa Healthcare USA, Inc.
ISSN 1939-6368 print/1939-6376 online
DOI: 10.3109/19396368.2011.553984

informa
healthcare

RESEARCH ARTICLE

Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization *in vitro*?

Luke Simon and Sheena E. M. Lewis

Centre for Public Health, Reproductive Medicine, Institute of Clinical Science, Queens University of Belfast, Northern Ireland, UK

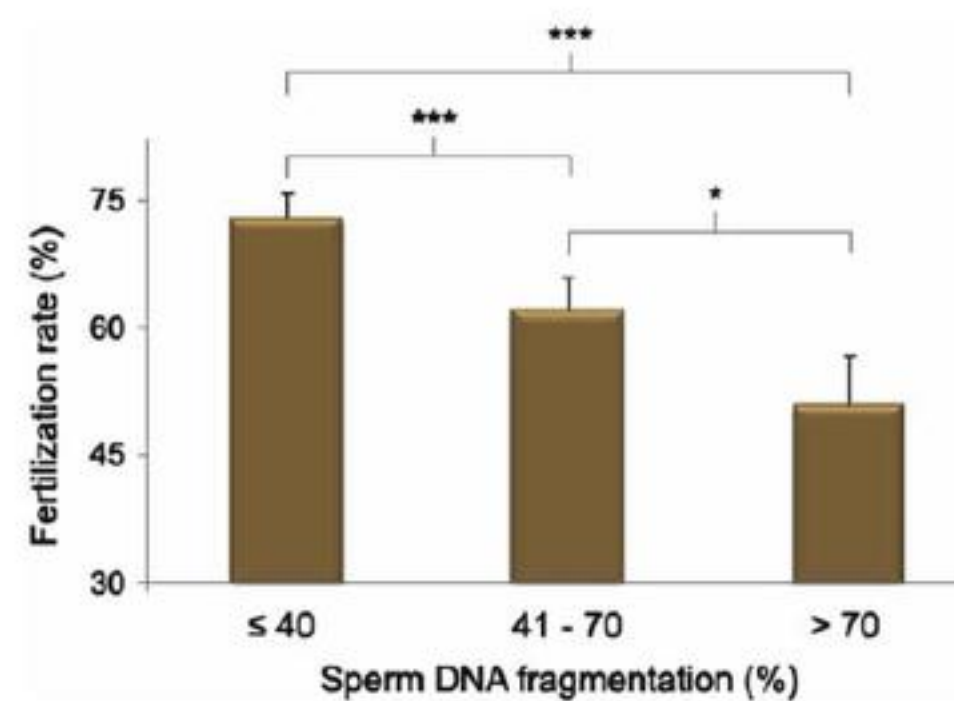


Figure 1. Relationship between sperm DNA fragmentation and fertilization rate. Bar chart showing decrease in fertilization rate with increase in DNA fragmentation in the native system. Significance at * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

20

Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis

Denny Sakkas, Ph.D.,^{a,b} and Juan G. Alvarez, M.D., Ph.D.^{c,d,e}

TABLE 2

Pregnancy outcome in patients with high levels of sperm DNA fragmentation when treated with ejaculated compared with testicular sperm.

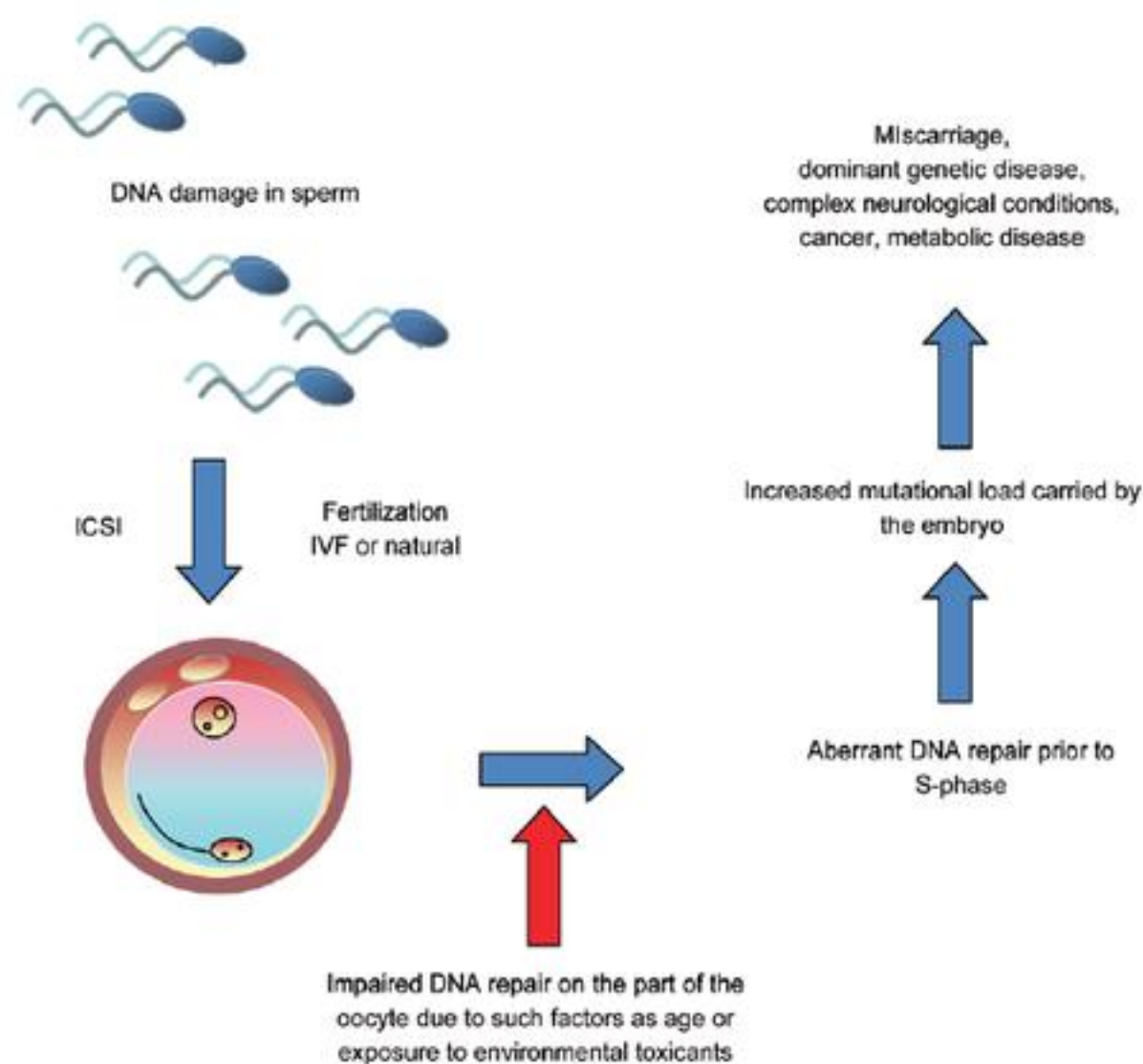
Sperm	Biochemical pregnancy rate (%)	Clinical pregnancy rate (%)	Implantation rate (%)	Miscarriage rate (%)
Ejaculated (n = 42)	6.90	13.79	6.56	75.0
Testicular (n = 30)	2.5	40.0	28.09	6.25
P value	NS	.035	.0021	.017

Note: All patients included in the study had a DNA fragmentation index value in semen by TUNEL >20%; statistical analysis by χ^2 test.

Sakkas. Sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2010.

21

Sperm DNA Damage

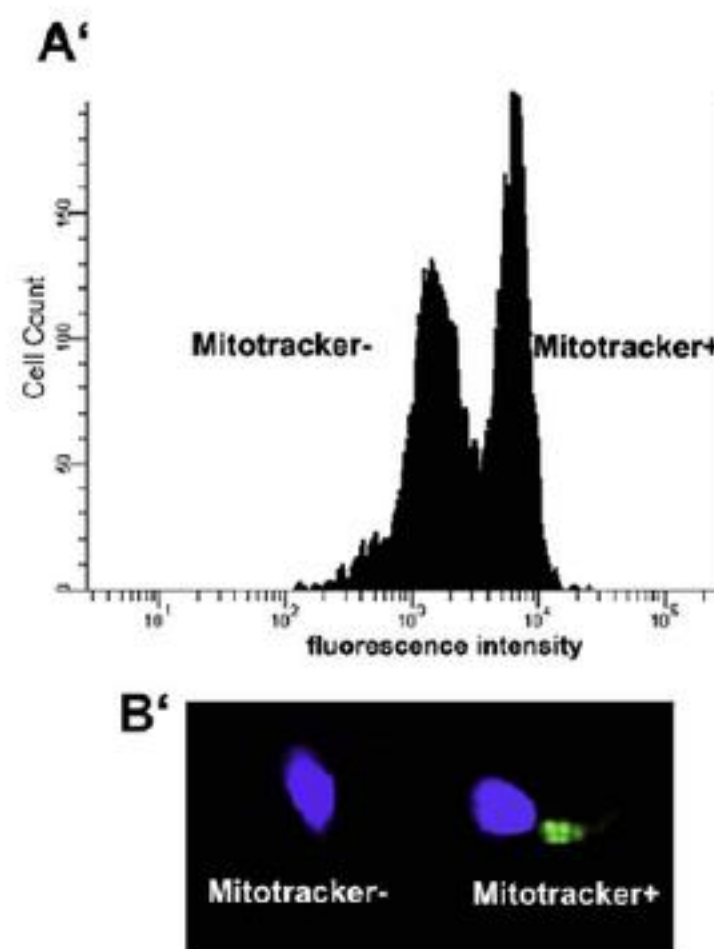


Aitken & Koppers (2010). *AJA*

22



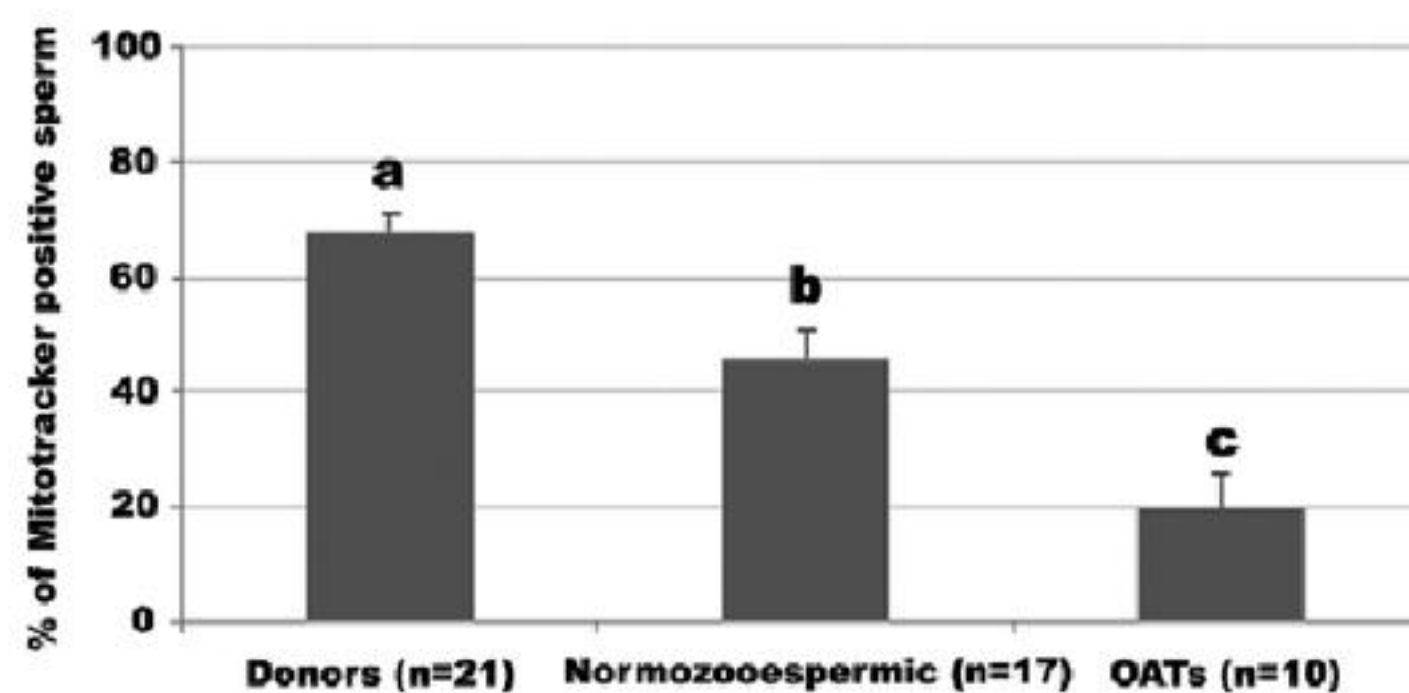
Sub-populations of sperm with and without functional mitochondria



Sousa AP et al. (2011). PLOS One

23

Percentages of sperm with functional mitochondria

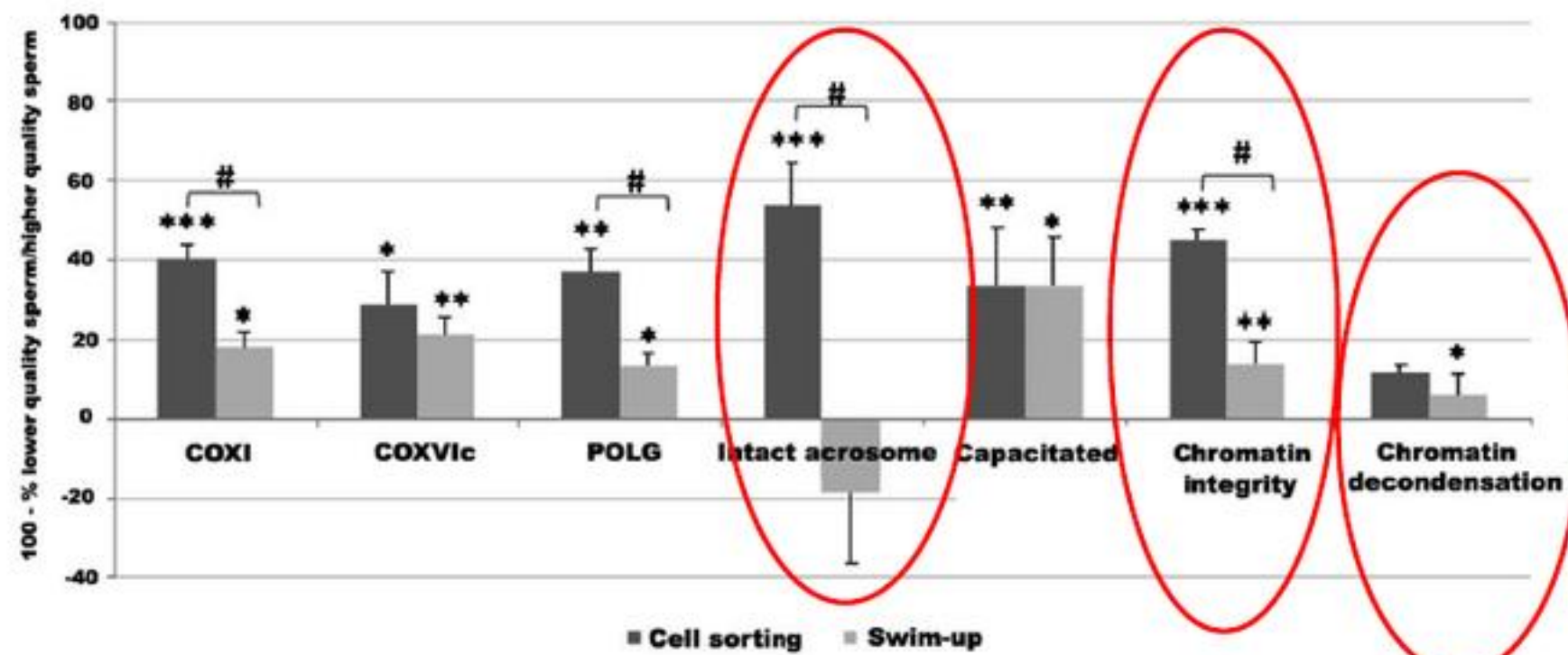


Sperm samples were stained with **MitoTracker Green**

Sousa AP et al. (2011). PLOS One

24

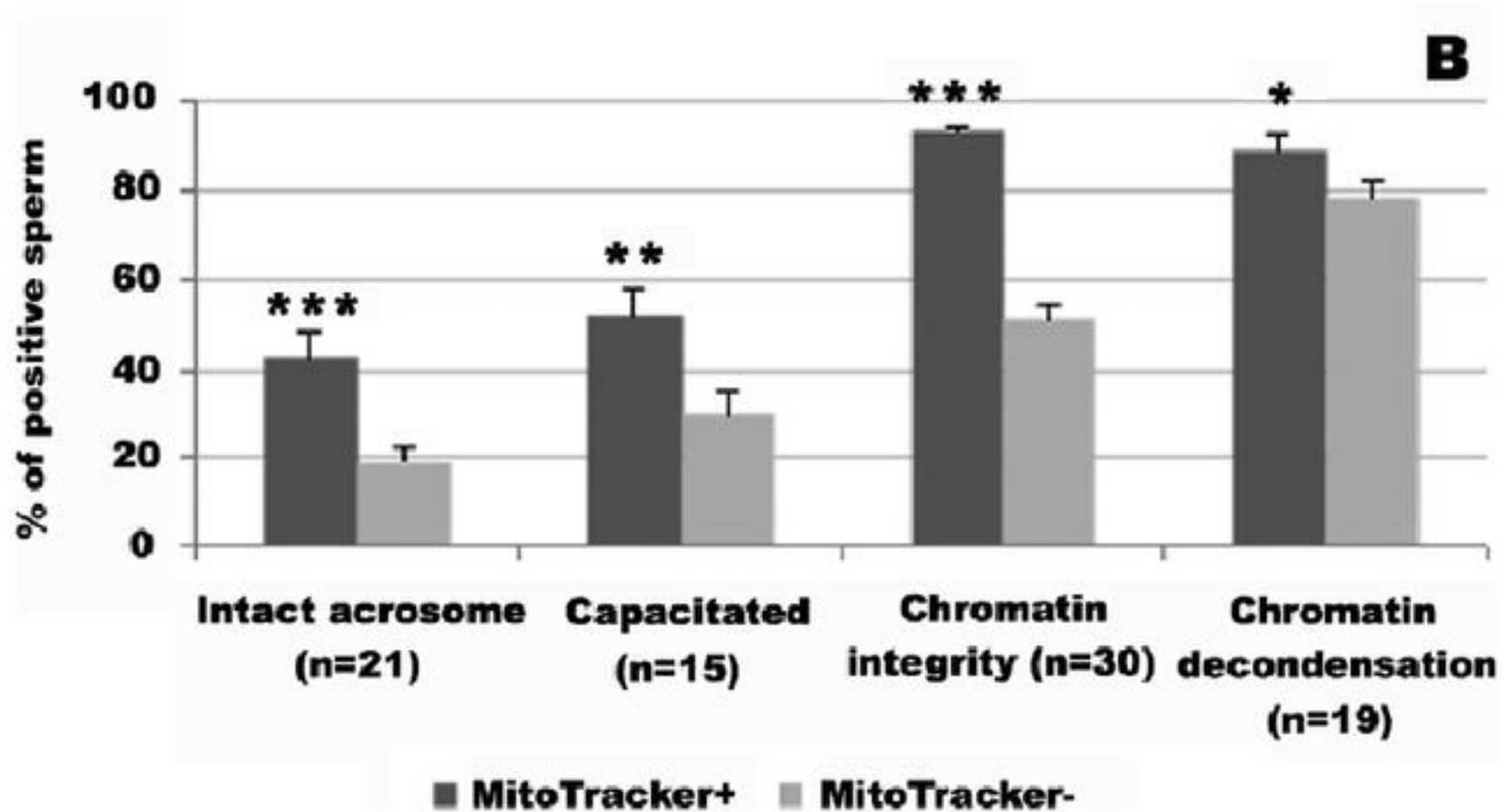
Cell sorting after MitoTracker Green staining versus Swim-up



Sousa AP et al. (2011). PLOS One

25

Comparison between sperm with and without functional mitochondria



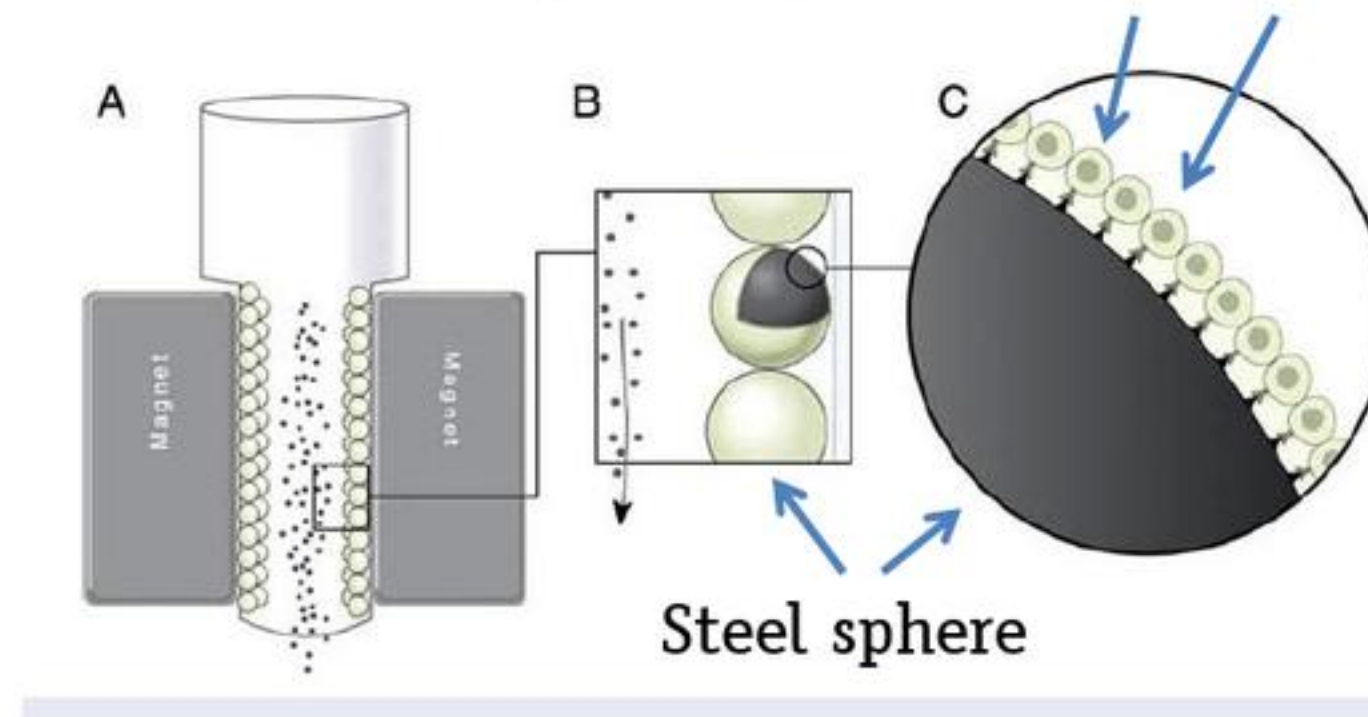
Sousa AP et al. (2011). PLOS One

26



MiniMACS magnetic cell separation column

Immuno-magnetically labeled (Annexin V) cells

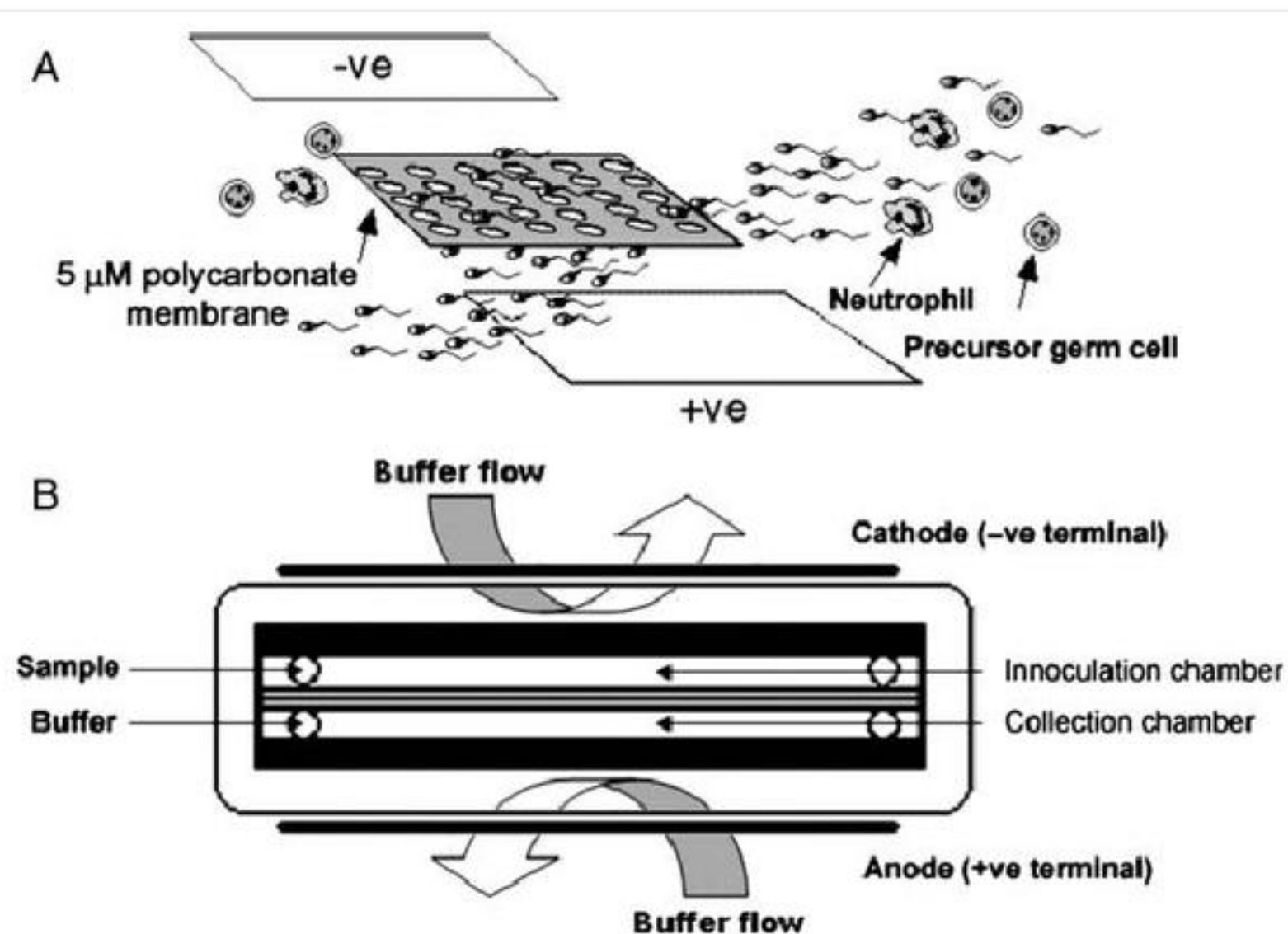


Separation of non-apoptotic cells

Said TM and Land JE (2011). Hum. Reprod Update

27

Electrophoretic system for sperm selection

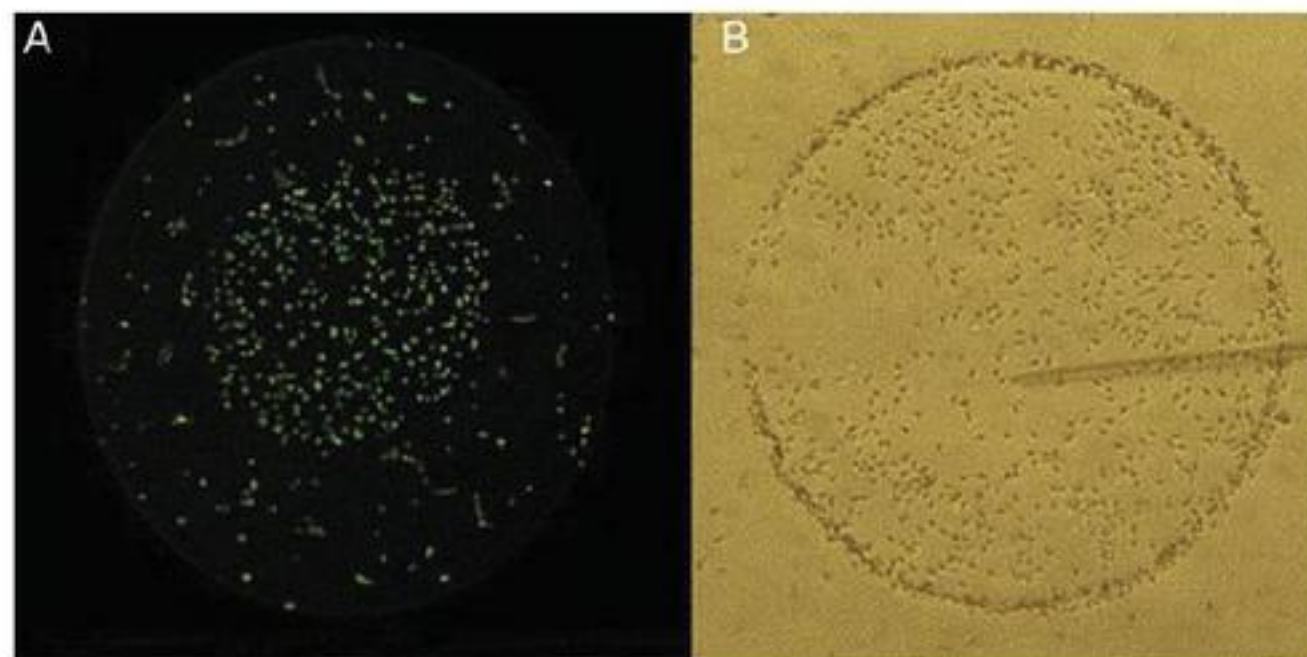


Ainsworth C et al. Hum. Reprod 2005, 20:2261-2270

28

Sperm selection using PICSI dish

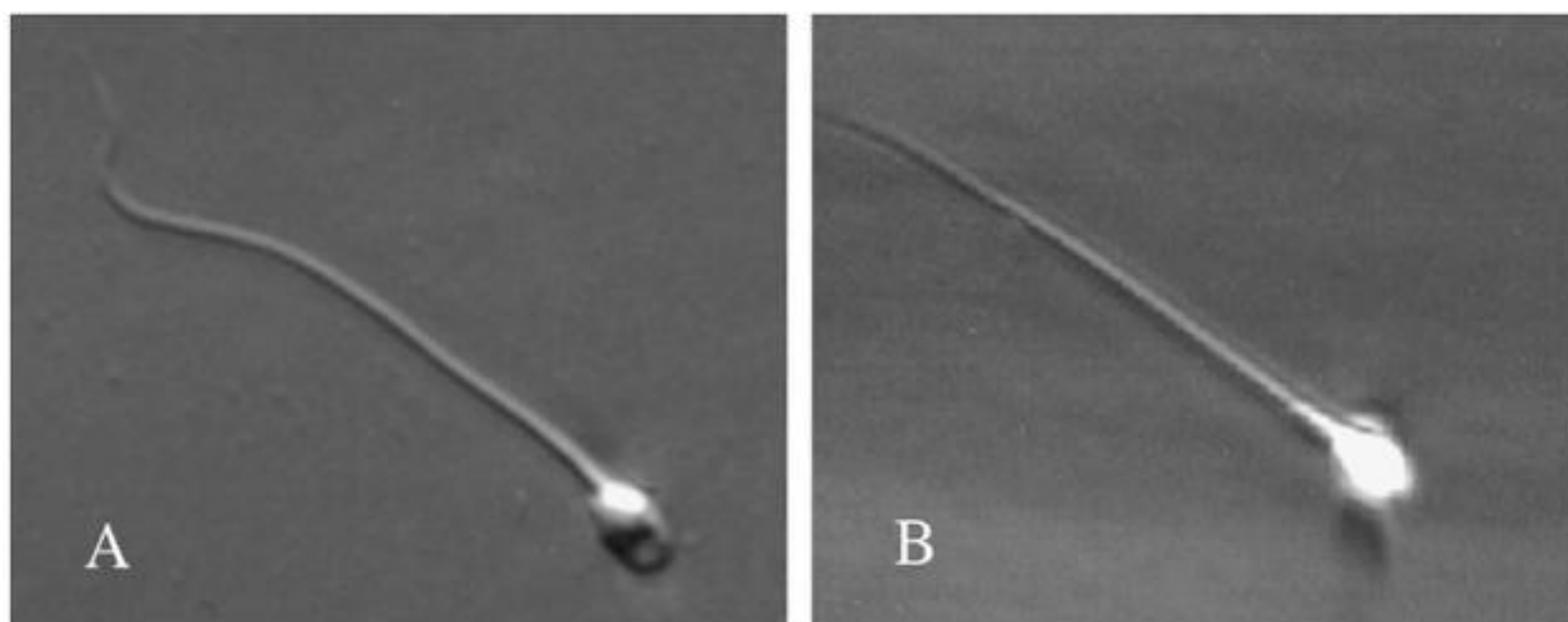
- Selection of “normal” sperm prior to ICSI using petri-dishes coated with Hyaluronic acid (HA).
- Membrane of good sperm has a receptor for HA.



Jakab et al. (2005). Fertil Steril 84:1665-1673

29

BIREFRINGENCE IN SPERM HEAD



Acrosome-reacted
spermatozoon

Acrosome intact
spermatozoon

Gianaroli L et al. Fertil Steril 2010

30



Solutions to improve outcome of poor sperm factors

1. Sperm preparation

Gradient separation (90-70-45)

- Reduce number of sperm with vacuoles
- Reduce number of acrosomeless sperm
- Reduce number of sperm with small acrosomes
- Improve percentage of normal forms

31

Solutions to improve outcome of poor sperm factors

2. Hypo-osmotic solution

Identify viable sperm for ICSI

- Viable sperm – curled tail
- Non-viable sperm – straight & rigid flagellum

3. Sperm selection during ICSI procedure

- Identify sperm with normal forms
- Identify and differentiate sperm with & without vacuoles under high magnification (400x)

32

ARTIFICIAL OOCYTE ACTIVATION

Applicable for:

- a. Acrosomeless Or Round-headed sperm
- b. Sperm with small acrosome – possible low SOAF
- c. Combination with HOS

Methods:

1. Electro-activation by Electrical pulses
2. Chemical activation – ionomycin/ Ca^{2+} ionophore
3. Recombinant activating factor/cRNA – PLC zeta

33

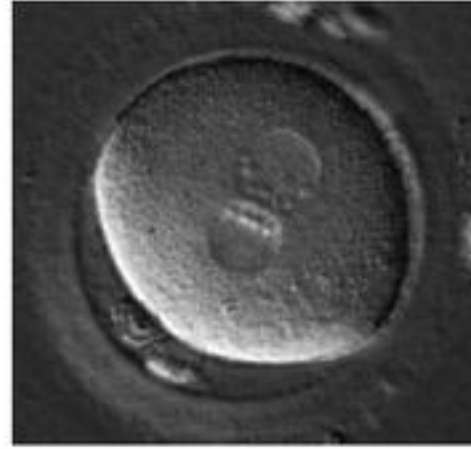
Summary

- Sperm contributes the paternal DNA in fertilization.
- Maturity status of the sperm cell has important influence on the outcome of ICSI.
- Integrity of the sperm DNA i.e. fragmentation index and aneuploidy has an important effect on embryo quality and pregnancy outcome.
- Sperm cytosolic factor triggers the important step to fertilization, embryo development and pregnancy outcome.

34



Predictive value of pronuclear scoring

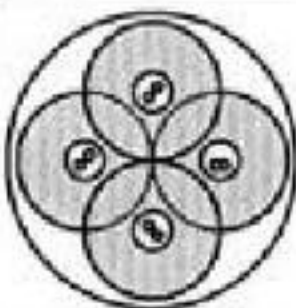
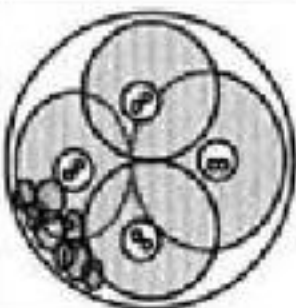
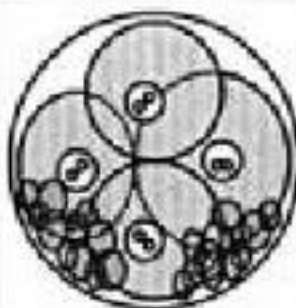
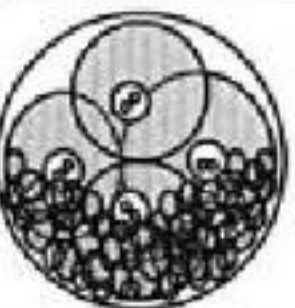
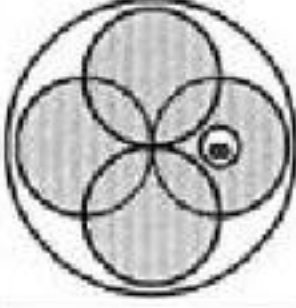
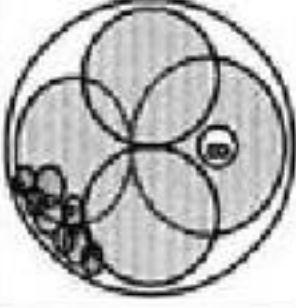
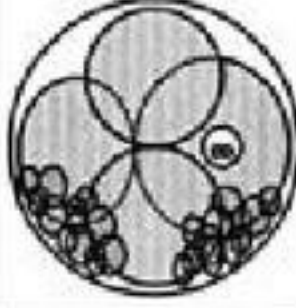
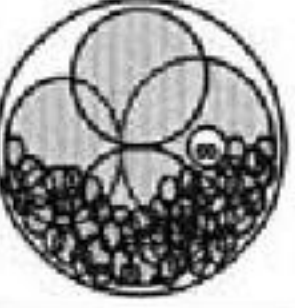
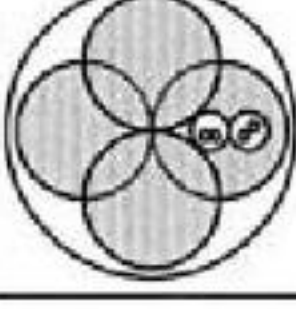
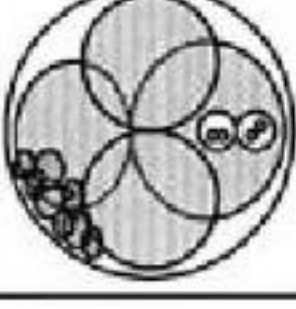
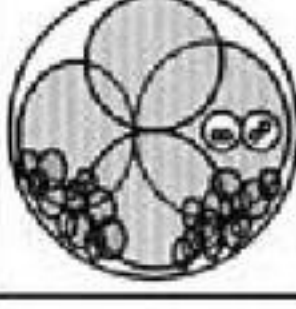
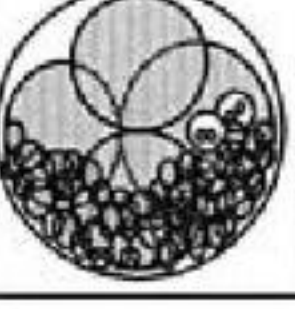


- Zygote-score assessment has a limited clinical significance in the choice of the best embryos for transfer.
- Evaluation of embryo quality based on the number of blastomeres, embryo morphological characteristics and grade is more predictive than zygote-score.

Nicoli et al. (2010). Reprod Biol Endocrinol 8:77

35

Embryo grading by analysing blastomere nuclei

grade	1	2	3	4
A				
B				
C				

Moriwaki et al. (2004). Hum. Reprod 19(1):152-159

36

BLASTOCYST GRADING SYSTEM



- Blastocyst development stage
- Inner cell mass score (quality)
- Trophoblast score (quality)

37

BLASTOCYST DEVELOPMENT STAGE

Expansion grade	Blastocyst development and stage status
1	Blastocoel cavity less than half the volume of the embryo
2	Blastocoel cavity more than half the volume of the embryo
3	Full blastocyst, cavity completely filling the embryo
4	Expanded blastocyst, cavity larger than the embryo, with thinning of the shell
5	Hatching out of the shell
6	Hatched out of the shell

38



BLASTOCYST GRADING SYSTEM

Inner cell mass score (quality)

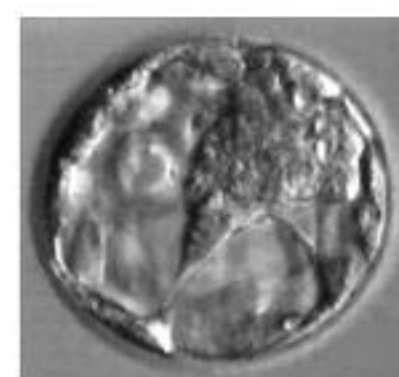
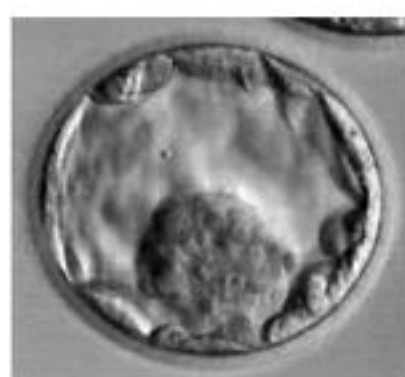
ICM grade	Inner cell mass quality
A	Many cells, tightly packed
B	Several cells, loosely grouped
C	Very few cells

Trophectoderm score

TE grade	Trophectoderm quality
A	Many cells, forming a cohesive layer
B	Few cells, forming a loose epithelium
C	Very few large cells

39

BLASTOCYST GRADING SYSTEM



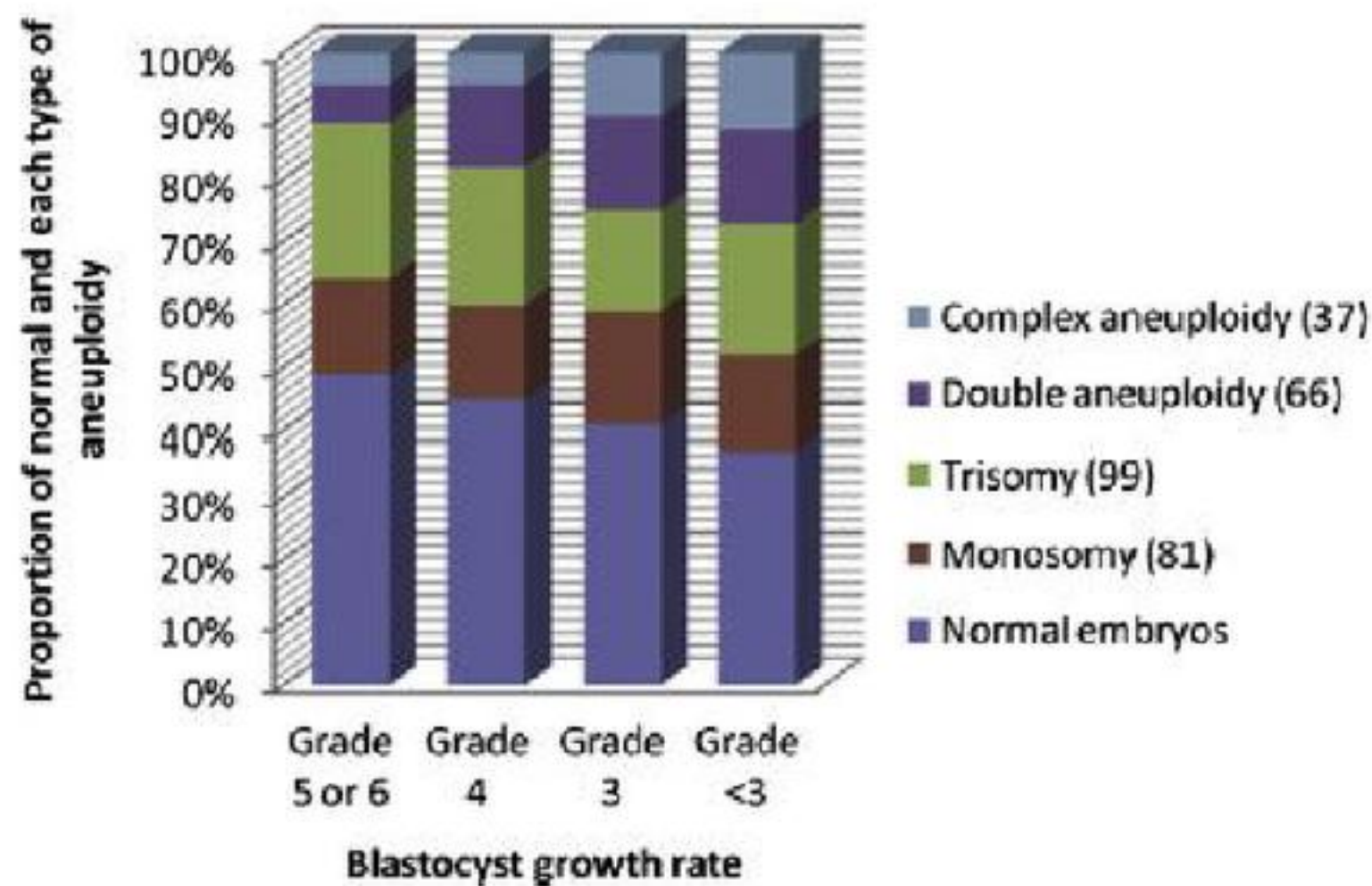
4AB
Well expanded =4
Inner cell mass =A
Trophectoderm =B

4AA
Well expanded =4
Inner cell mass =A
Trophectoderm =A

4BB
Well expanded =4
Inner cell mass =B
Trophectoderm =B

40

Blastocyst morphologic grading and the proportion of euploid and aneuploid (divided by type) embryos.



Alfarawati S et al. (2011). Fertil Steril

41

BLASTOCYST BIOPSY



1. A hole in the zona pellucida facing directly opposite the ICM is created by drilling with acid Tyrode's solution or laser ablation.
2. Blastocyst is then placed in G2 medium for culture for a few hours to allow herniation of trophectoderm.
3. Herniated trophectoderm is gently teased away from the blastocyst.
4. Biopsied blastocyst is then frozen while awaiting results from array CGH/PCR analysis.
5. Normal frozen biopsied blastocyst(s) is/are transferred in the thaw cycle.

42



CONCLUSION

- The quality of sperm and oocytes have significant impact on the outcome of an ART cycle.
- Good oocyte quality is very much dependent on patient's response to ovarian stimulation.
- Sperm selection protocols/methods have been devised to improve sperm quality.
- Embryo selection and blastocyst transfer help to improve the outcome of an ART cycle.

43

THANK YOU

44

CHẤT LƯỢNG GIAO TỬ VÀ PHÔI CẢI THIỆN KẾT QUẢ ART

Liow Swee Lian DVM, PhD
Sincere IVF Center
Novena Specialist Center
Singapore

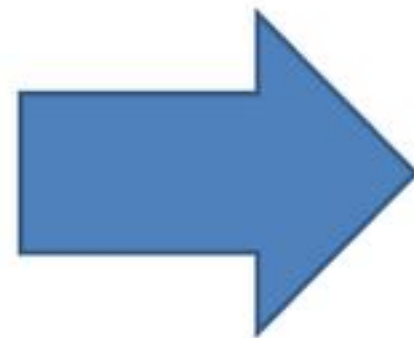
1

Nguyên nhân thất bại làm tổ

80%



10%



TỬ CUNG
10%

Dựa theo D. Sakkas

2



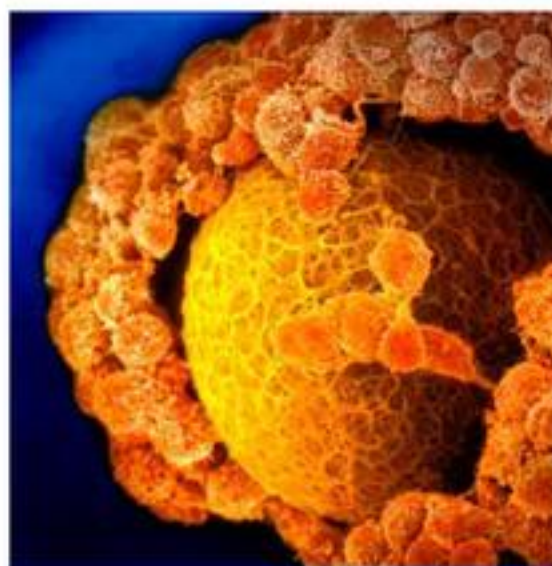
KÍCH THÍCH BUỒNG TRÚNG

- GnRH agonist + FSH
- GnRH antagonist + FSH
- HMG
- Kích thích nhẹ

3

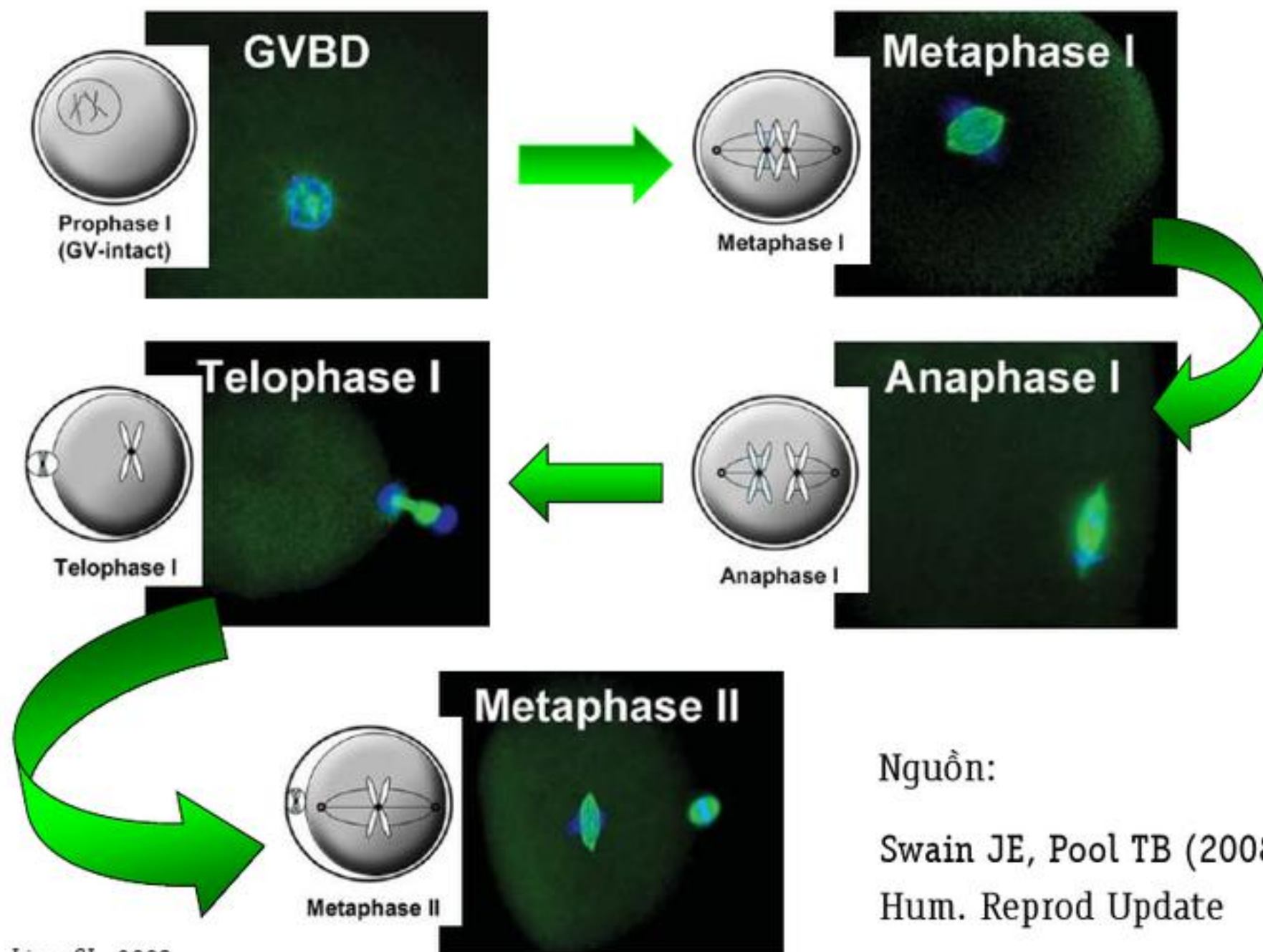
NGUYÊN NHÂN ẢNH HƯỞNG ĐẾN SỰ THỤ TINH, PHÁT TRIỂN VÀ LÀM TỔ CỦA PHÔI

1. Sự trưởng thành noãn
2. Chất lượng noãn
3. Hình dạng noãn



4

Các giai đoạn trưởng thành noãn



Liow SL, 2008

5

CÁC TÁC NHÂN ẢNH HƯỞNG ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN PHÔI

Chất lượng noãn

Có 4 mức độ đánh giá chất lượng noãn:

1. Khả năng tiếp tục quá trình giảm phân
2. Khả năng phân chia sau thụ tinh
3. Khả năng phát triển đến giai đoạn phôi nang
4. Khả năng có thai và thai diễn tiến

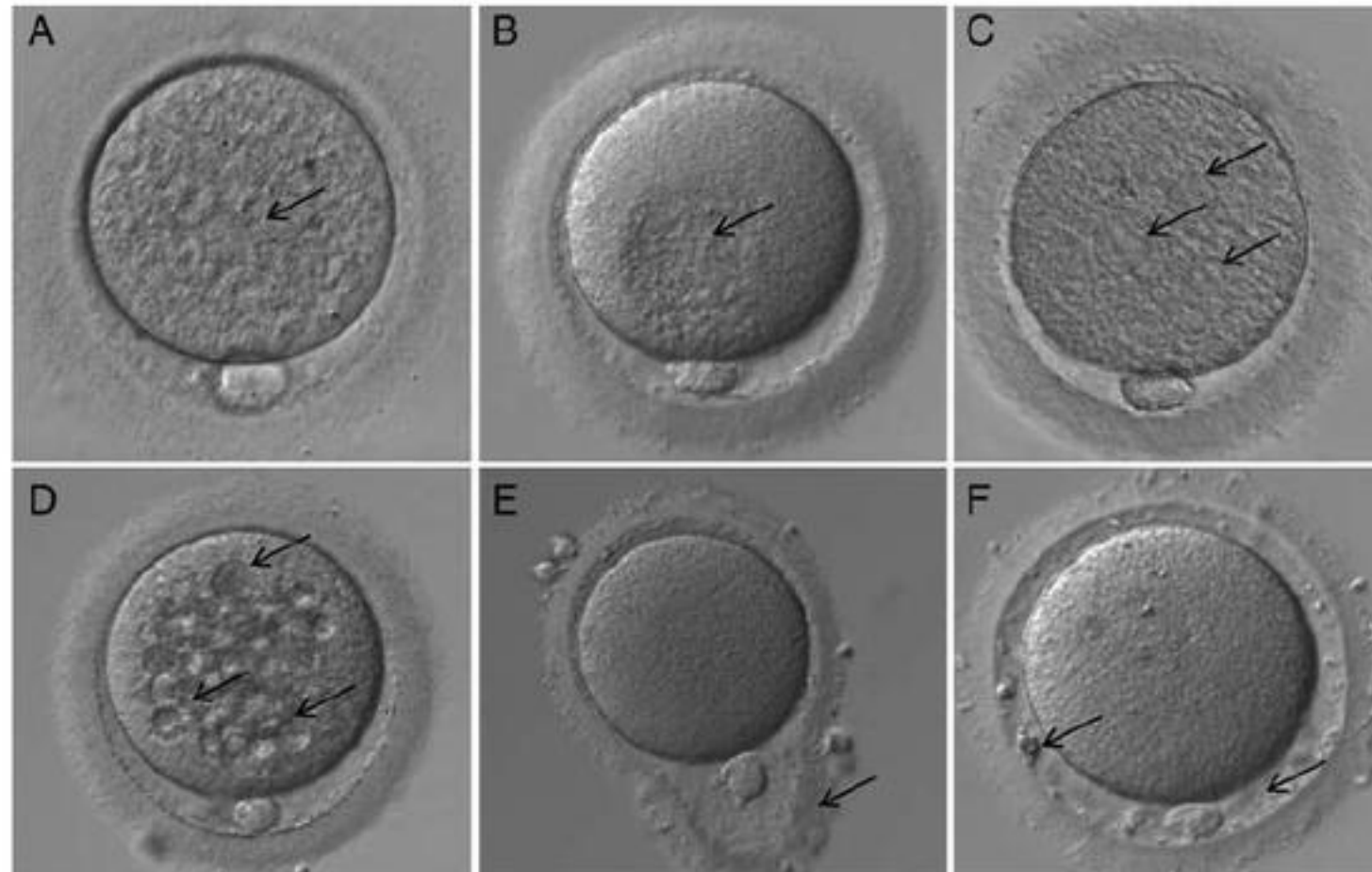
Liow SL, 2008

6



Giá trị tiên đoán về hình thái noãn

Những dạng noãn bất thường

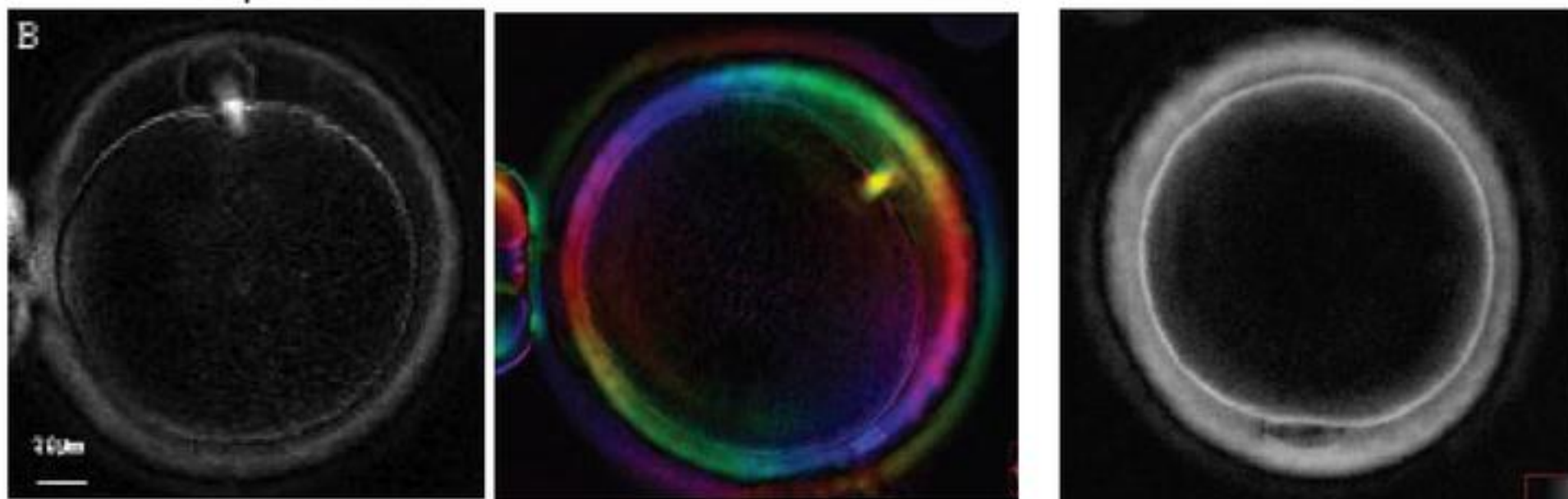


Rienzi L và cs. (2011). Hum. Reprod Update 17(1):34-45

7

Sự trưởng thành noãn: thoi vô sắc

- Thoi vô sắc là một chỉ số chính xác để đánh giá giai đoạn nhân.

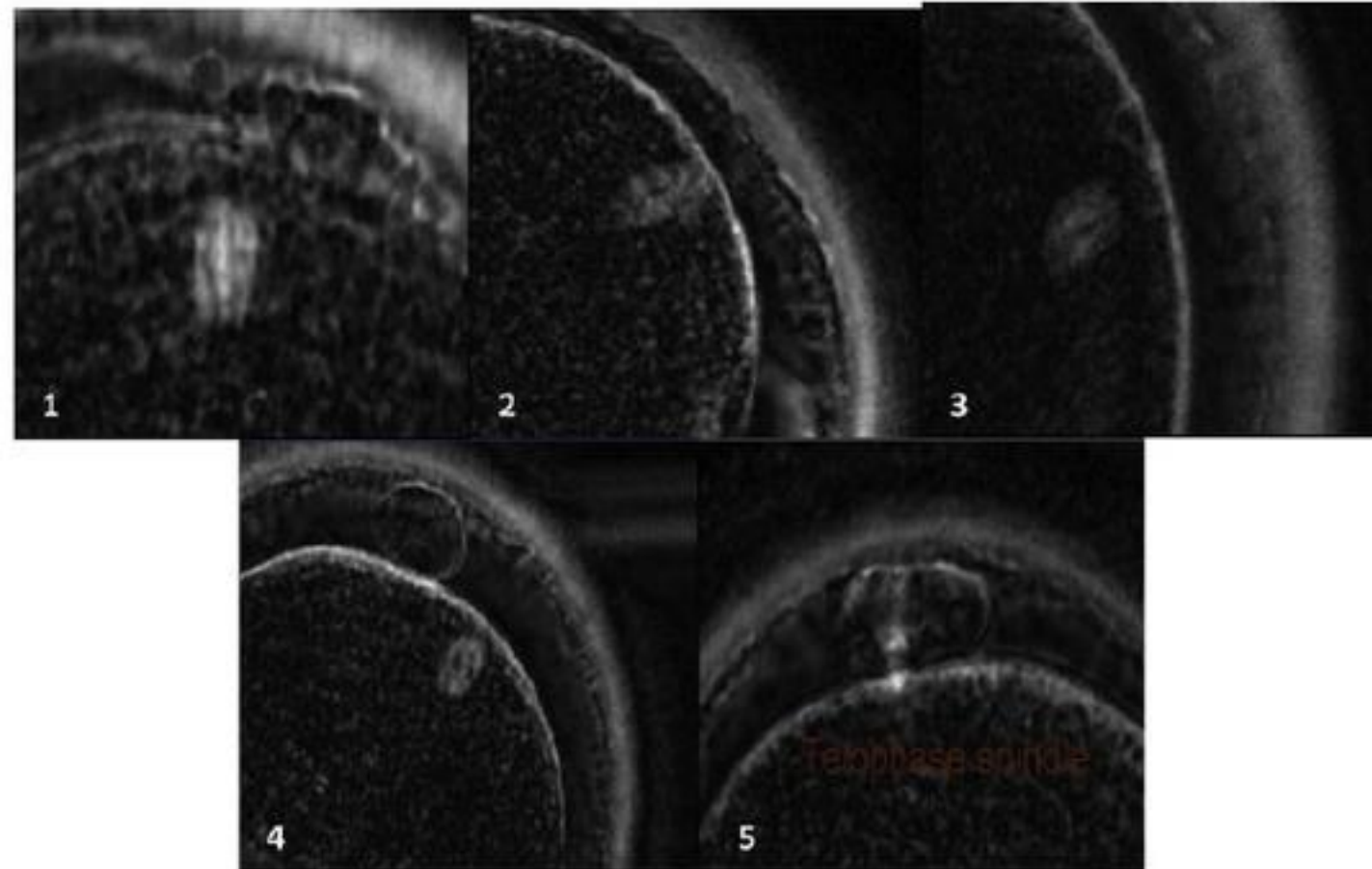


Early telophase 1: Ooplasm and PB is still continuous Interphase 2: PB extruded but MS not formed yet

- Thoi vô sắc có thể bị ảnh hưởng bởi điều kiện nuôi cấy không thuận lợi, sự thay đổi nhiệt độ, các stress hóa học trong suốt quá trình vi thao tác.

8

Noãn người: bất thường thoi vô sắc dưới kính hiển vi phân cực



1: Thoi vô sắc bình thường
2-5: Thoi vô sắc bất thường

Kilani S và cs.(2011): Fertil Steril

9

Noãn người: kết quả về hình dạng thoi vô sắc bình thường và bất thường

	Normally shaped spindles	Abnormally shaped spindles
Oocytes with a visible spindle	205 (29%) ^a	506 (71%) ^a
Fertilization	185 (90%) ^a	366 (72%) ^a
Blastulation	140 (76%) ^a	115 (31%) ^a
Utilization	100 (71%) ^a	52 (45%) ^a
Blastocysts transferred	68	32
Clinical pregnancy rate	37/68 (54%) ^a	0/32 ^a
Implantation	28 singleton live birth, 2 sets of monozygotic twins, 7 miscarriages 37 (54%) ^a	0 ^a

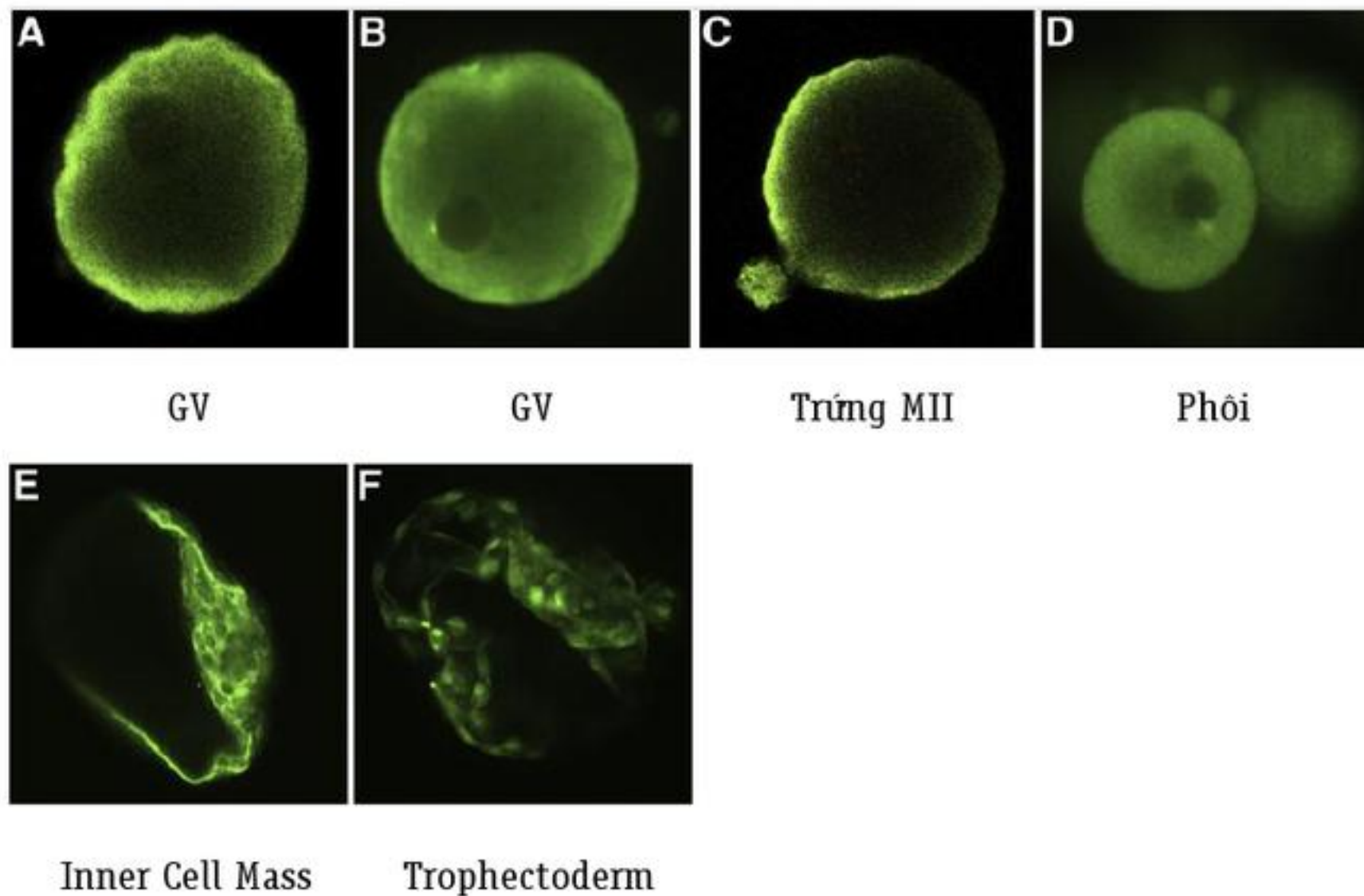
^a $P < .001$ (chi-square test).

Kilani. Meiotic spindle normality. Fertil Steril 2011.

10



Noãn và phôi người



Balakier và cs. (2012), Fertil Steril

11

NGUYÊN NHÂN THẤT BẠI LÀM TỔ



- Nguyên nhân từ mẹ:
 - Chất lượng noãn
 - Sự chấp nhận của nội mạc tử cung (NMTC)
 - Nhiễm sắc thể (NST) lệch bội
- Nguyên nhân từ cha:
 - NST lệch bội
 - Số lượng
 - Cấu trúc
 - Mảnh vỡ DNA

12

NGUYÊN NHÂN TỪ CHA

– Giai đoạn sớm:

Liên quan đến việc thiếu hụt tế bào chất của tinh trùng:

- Hợp tử và phôi giai đoạn sớm có chất lượng không tốt
- Tốc độ phân chia chậm

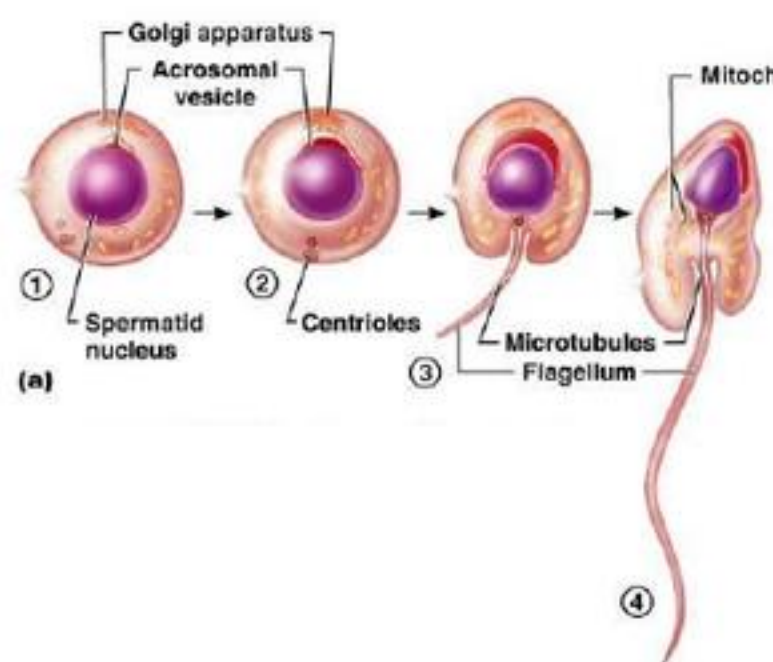
– Giai đoạn sau:

Liên quan đến mảnh vỡ DNA:

- Phát triển chậm
- Thất bại làm tổ

13

TIÊM TINH TỬ



Liow SL, 2010

- Em bé đầu tiên sinh năm 1995 (Fishel và cs., 1995).
- 35 bài báo cáo về tỉ lệ thai từ 1995-1998.
- Có thể có kết quả tốt hơn khi tiêm tinh tử đang kéo dài hoặc đã kéo dài.

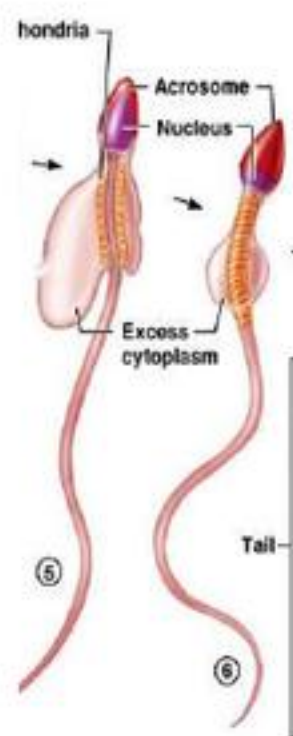
14



Tiêm tinh trùng từ tinh hoàn

Vô tinh do bế tắc so với không bế tắc:

- Kết quả từ vô tinh do bế tắc tốt hơn.
- Chủ yếu là bất thường bẩm sinh và ngừng quá trình trưởng thành ở vô tinh do không bế tắc.

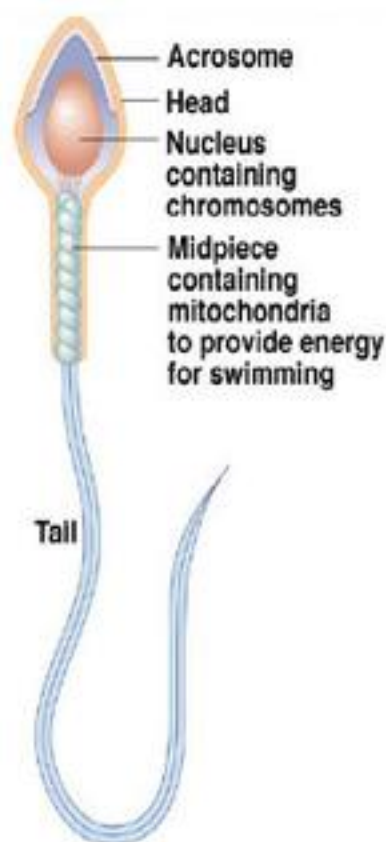


Tinh trùng từ tinh hoàn tươi và trữ lạnh:

- Kết quả tương tự.

(Devroey và cs., 1995; Tournaye và cs., 1999)

15

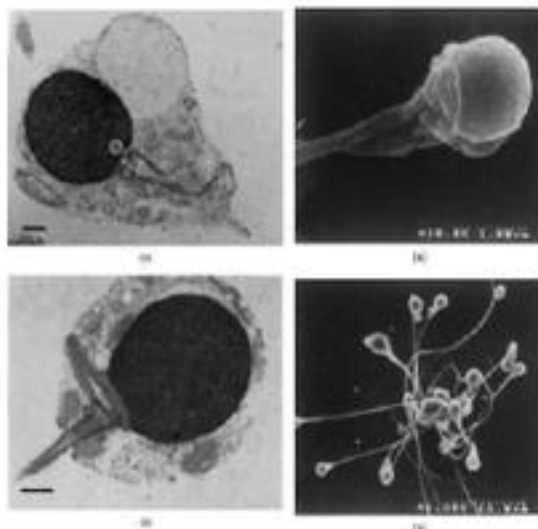


Mature spermatozoa

- Tỷ lệ thụ tinh: 75%
- Tỷ lệ thai: 35-45%

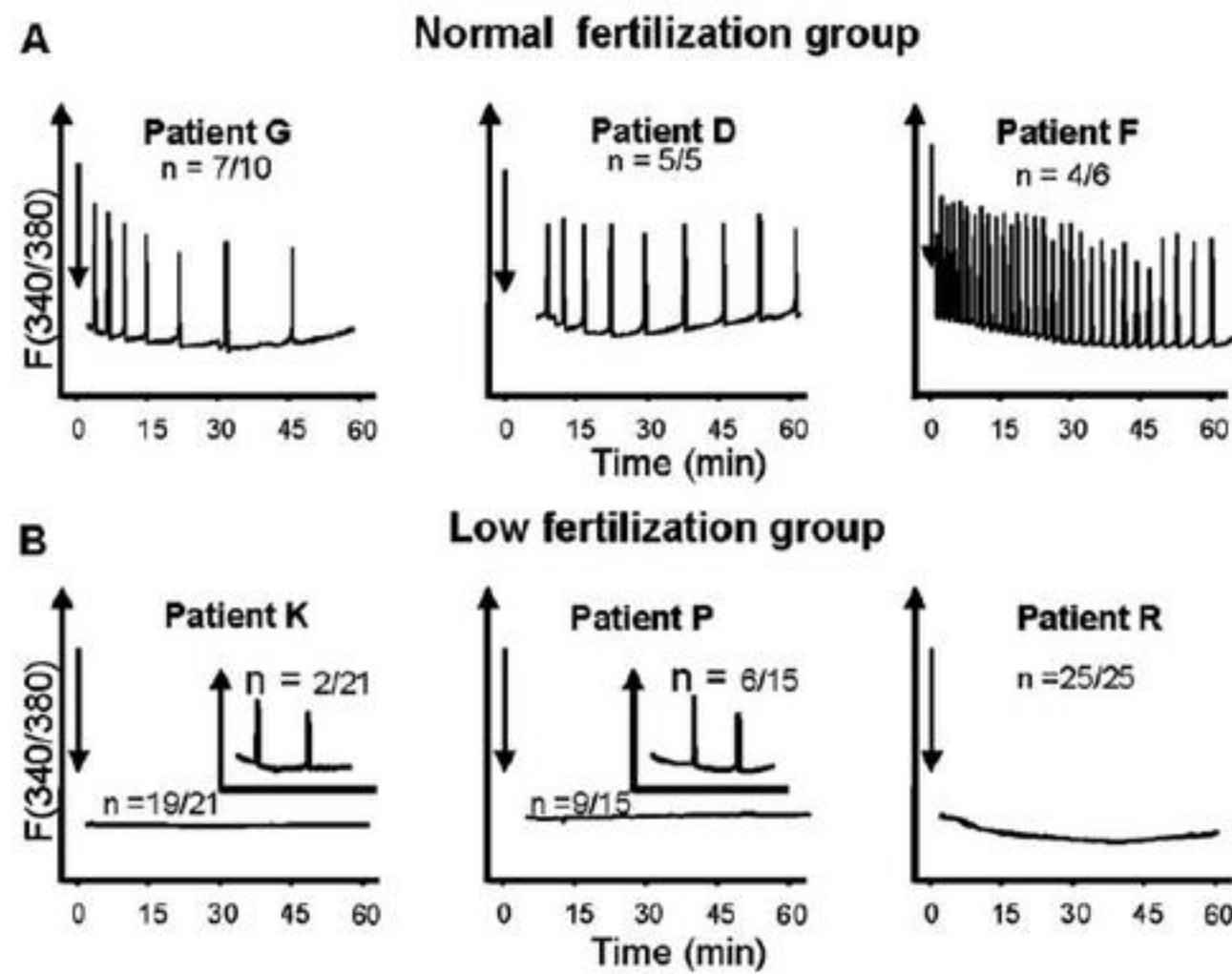
Poor outcome:

- Globospermia – acrosomeless sperm
- Karteganer syndrome – ciliary dyskinesia, total immotile sperm



16

Calcium ở tinh trùng người bình thường và vô sinh

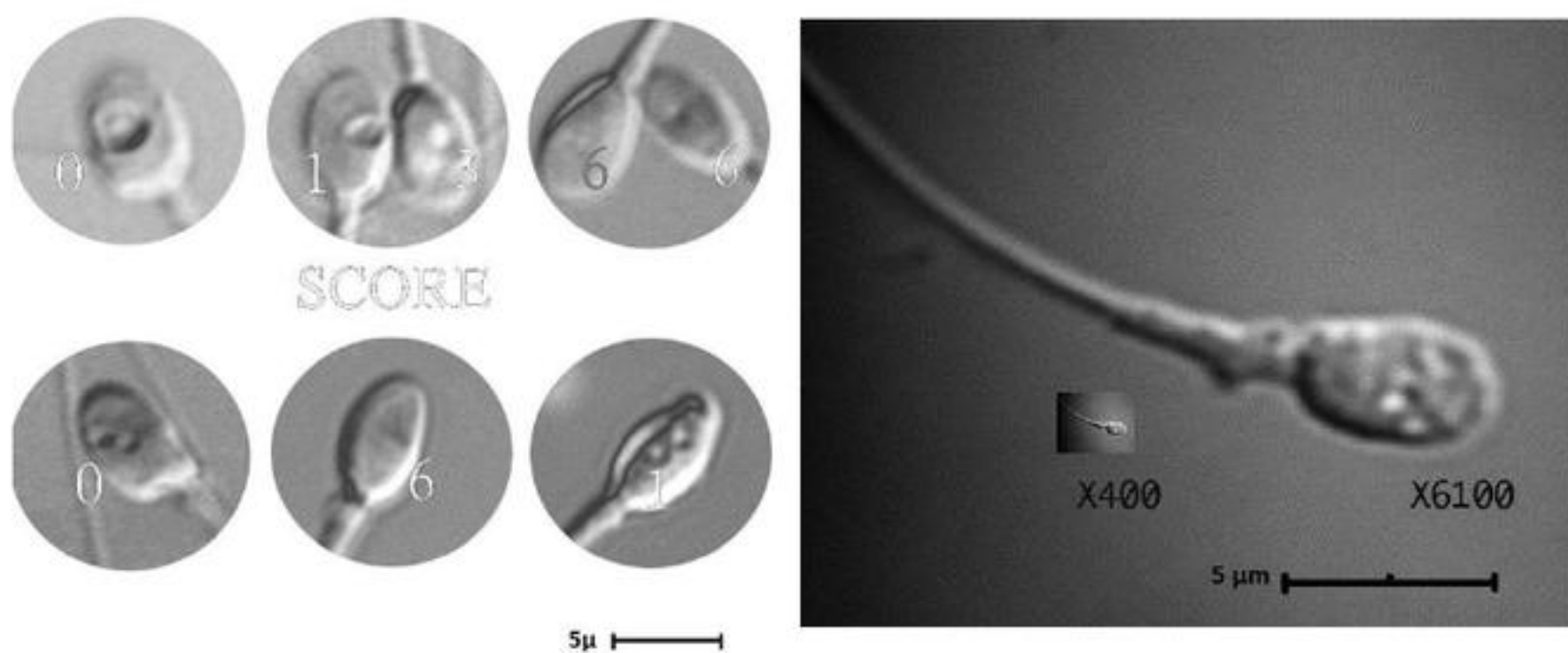


Kashir và cs. (2010). Hum. Reprod Update

17

Kính hiển vi phản pha độ phóng đại lớn

Không bào trong đầu tinh trùng



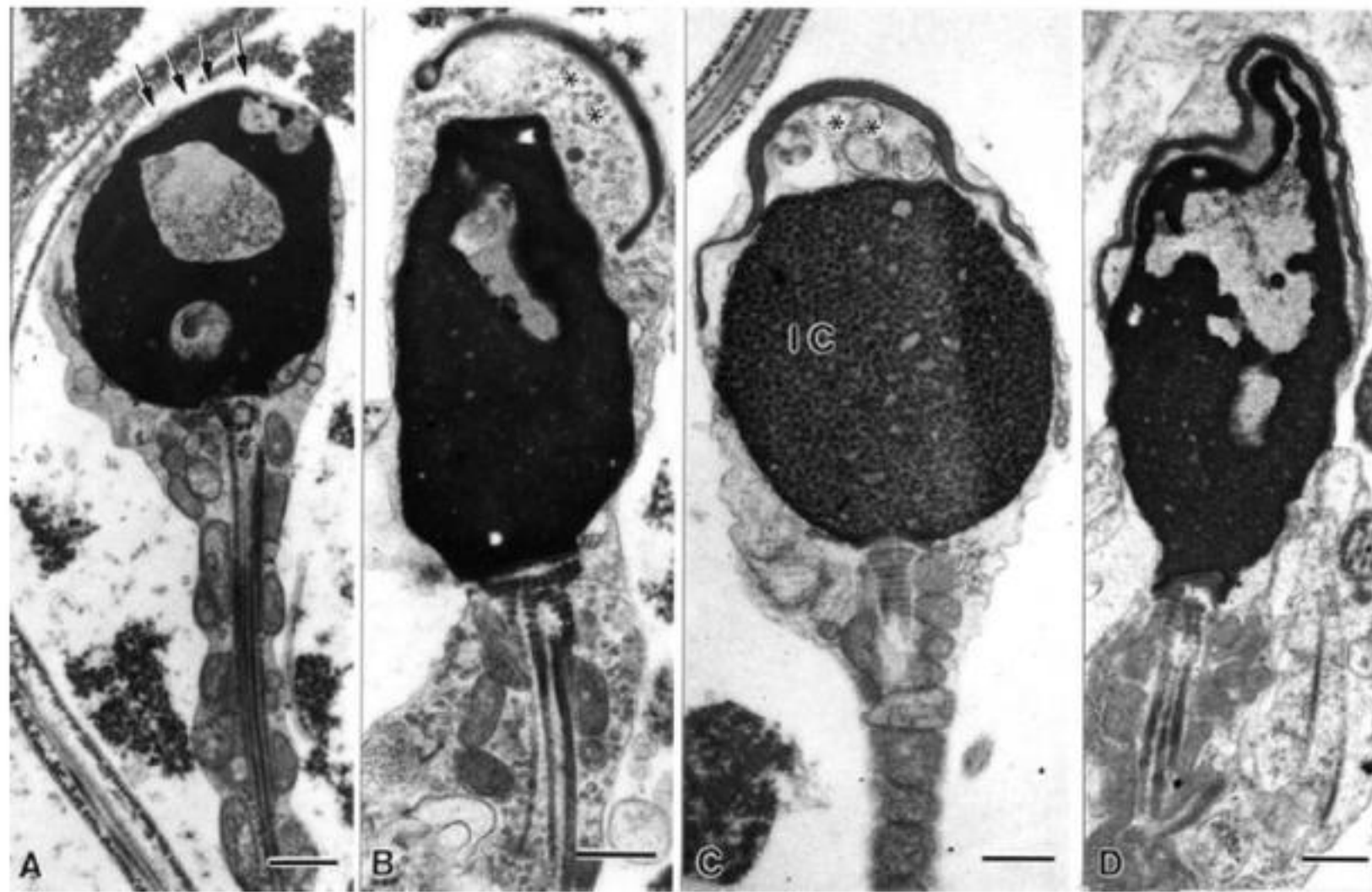
Cassuto và cs. (2011). RBM Online 10.1016/j.rbmo.2011.10.006

18



Bất thường tinh trùng

Thiếu hụt NST



Liow SL, 2010

19

Systems Biology in Reproductive Medicine, 2011, 0: 1-6
Copyright © 2011 Informa Healthcare USA, Inc.
ISSN 1939-6368 print/1939-6376 online
DOI: 10.3109/19396368.2011.553984

informa
healthcare

RESEARCH ARTICLE

Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization *in vitro*?

Luke Simon and Sheena E. M. Lewis

Centre for Public Health, Reproductive Medicine, Institute of Clinical Science, Queens University of Belfast, Northern Ireland, UK

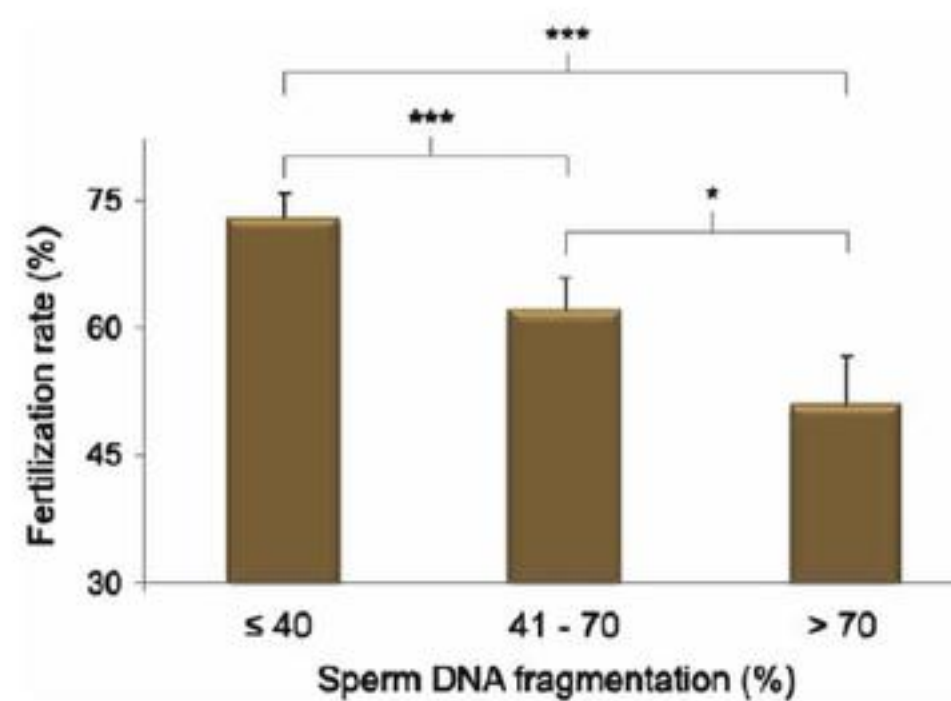


Figure 1. Relationship between sperm DNA fragmentation and fertilization rate. Bar chart showing decrease in fertilization rate with increase in DNA fragmentation in the native system. Significance at * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

20

Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis

Denny Sakkas, Ph.D.,^{a,b} and Juan G. Alvarez, M.D., Ph.D.^{c,d,e}

TABLE 2

Pregnancy outcome in patients with high levels of sperm DNA fragmentation when treated with ejaculated compared with testicular sperm.

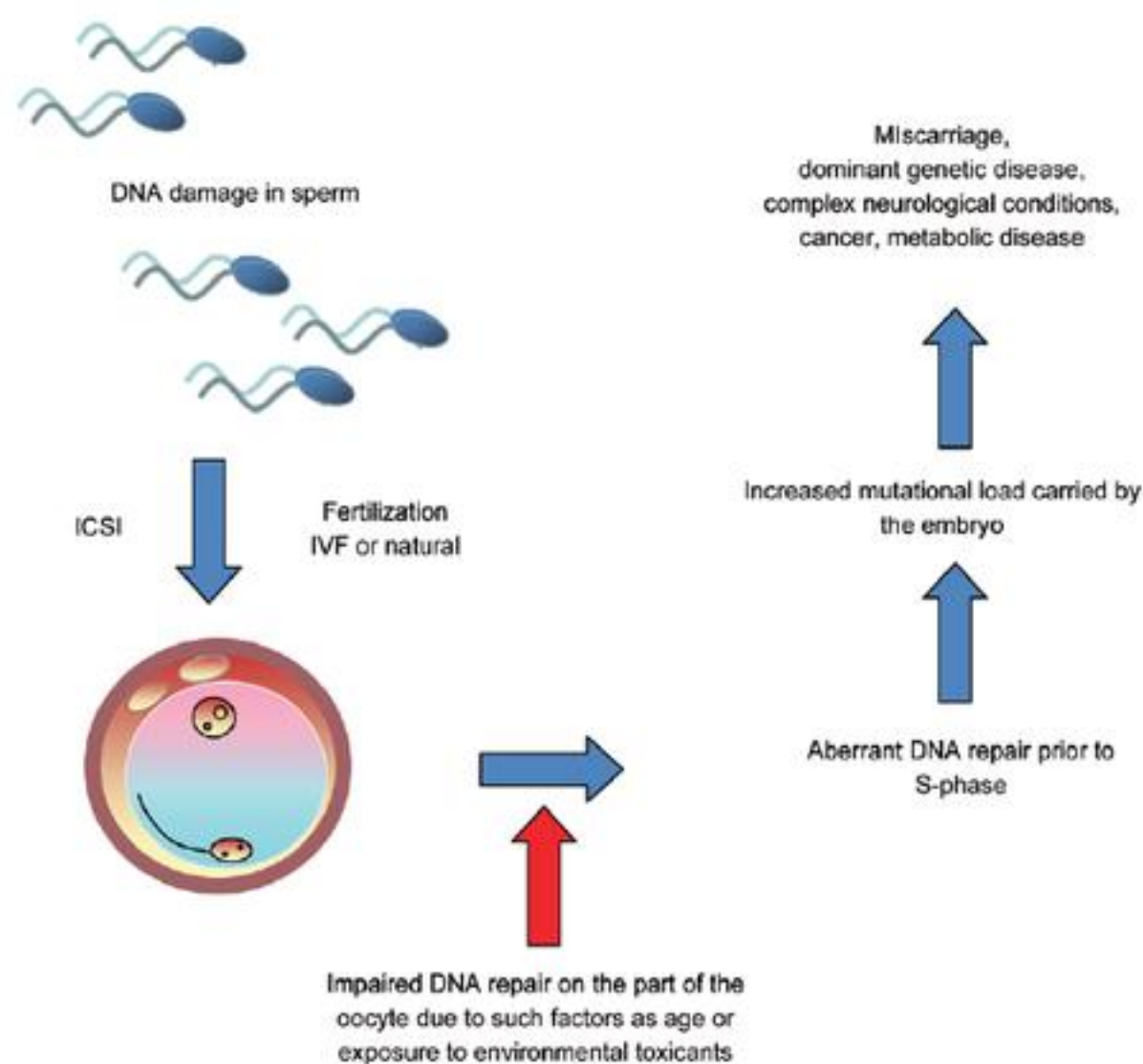
Sperm	Biochemical pregnancy rate (%)	Clinical pregnancy rate (%)	Implantation rate (%)	Miscarriage rate (%)
Ejaculated (n = 42)	6.90	13.79	6.56	75.0
Testicular (n = 30)	2.5	40.0	28.09	6.25
P value	NS	.035	.0021	.017

Note: All patients included in the study had a DNA fragmentation index value in semen by TUNEL >20%; statistical analysis by χ^2 test.

Sakkas. Sperm DNA fragmentation. Fertil Steril 2010.

21

Tổn thương DNA tinh trùng

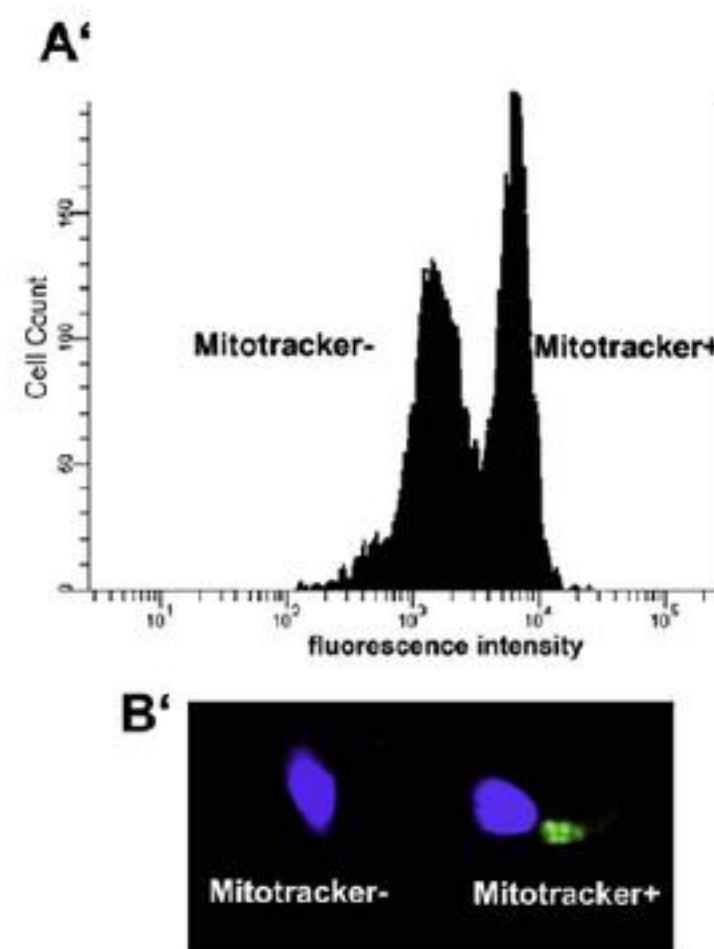


Aitken & Koppers (2010). AJA

22



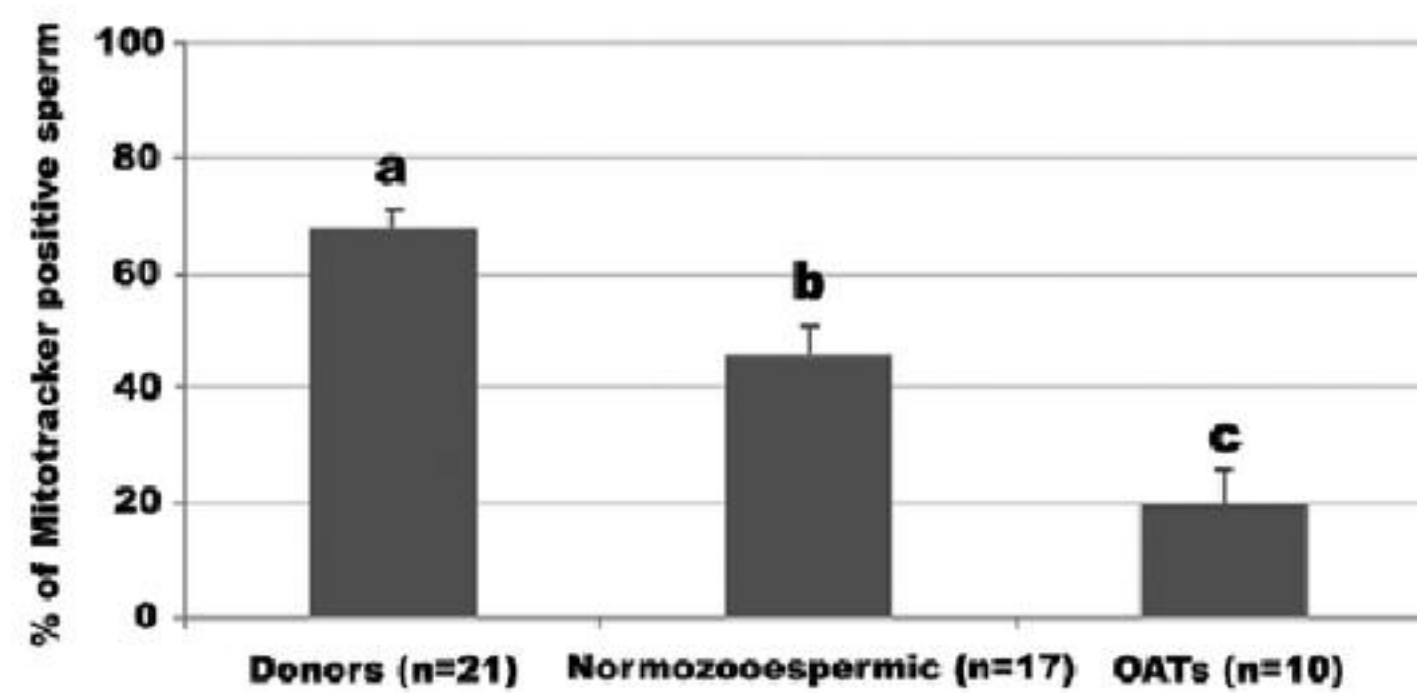
Tinh trùng có và không có ti thể



Sousa AP và cs.(2011). PLOS One

23

Tỉ lệ tinh trùng có ti thể

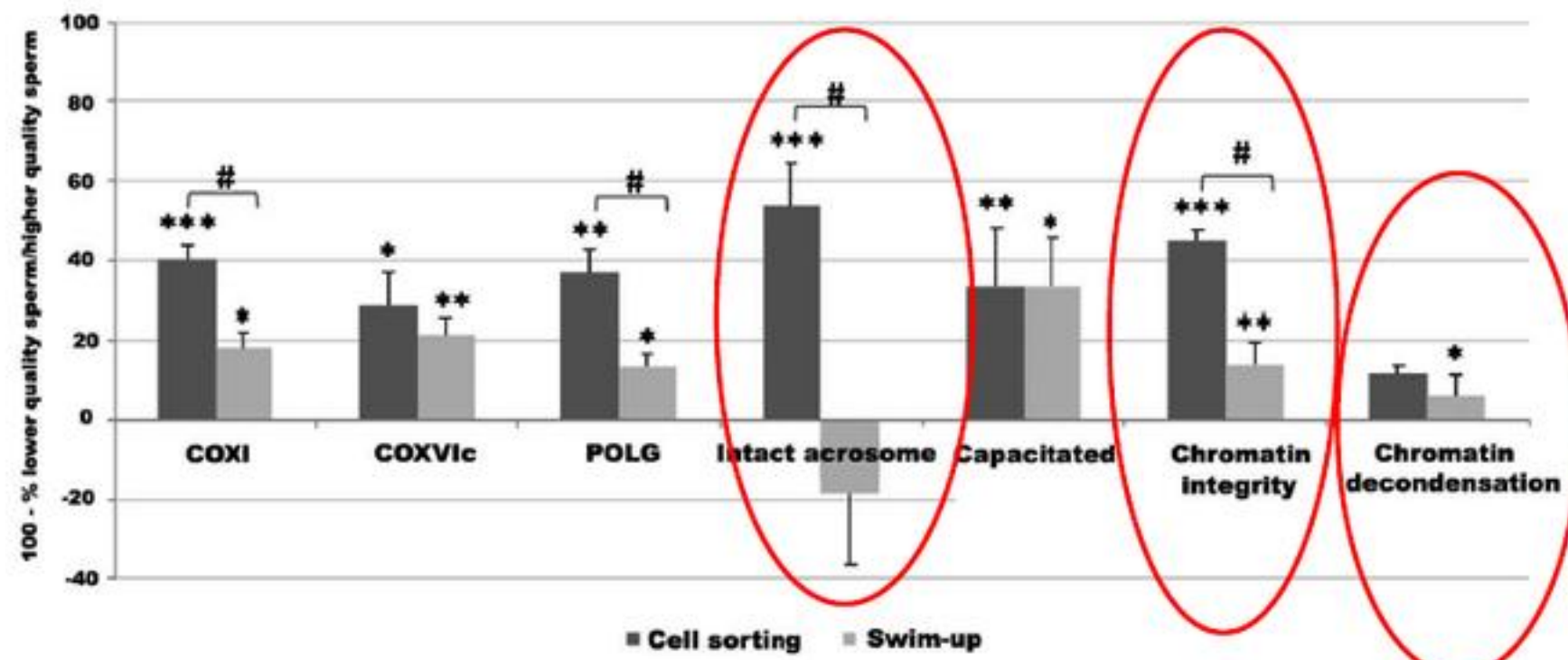


Mẫu tinh trùng được nhuộm bằng **MitoTracker Green**

Sousa AP và cs. (2011). PLOS One

24

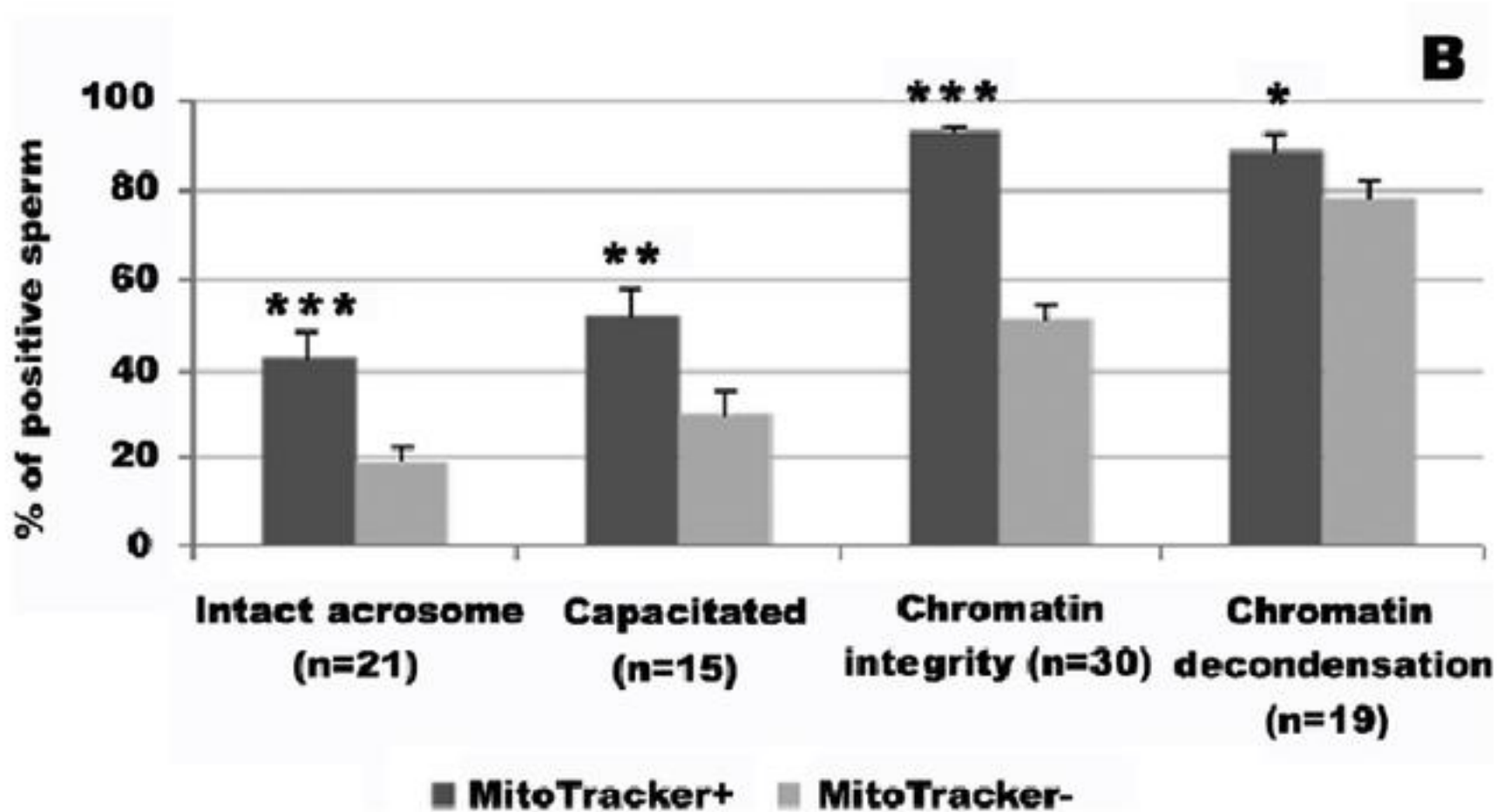
Lựa chọn tế bào sau khi nhuộm bằng MitoTracker Green so với Swim-up



Sousa AP và cs. (2011). PLOS One

25

So sánh giữa tinh trùng có và không có ti thể



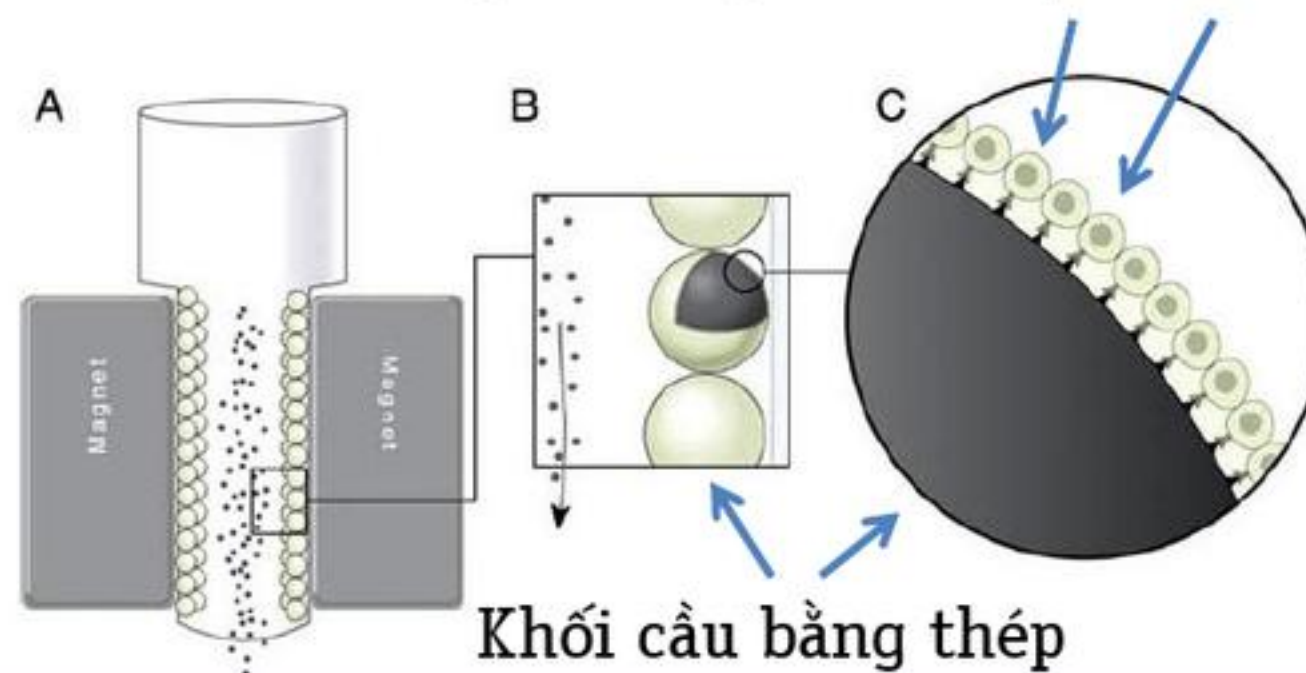
Sousa AP và cs. (2011). PLOS One

26



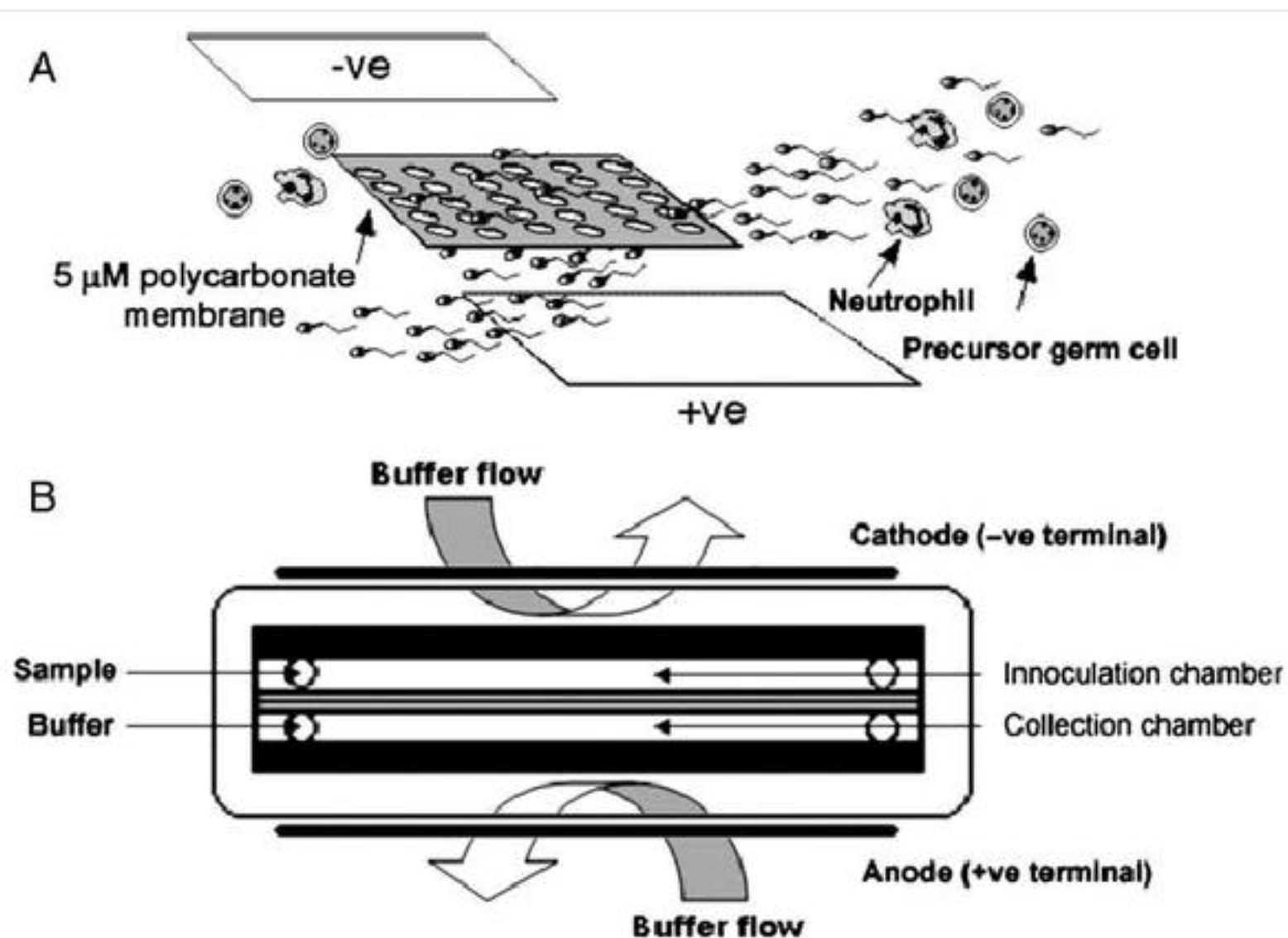
Lọc tinh trùng bằng cột MiniMACS magnetic

Immuno-magnetically labeled (Annexin V) cells



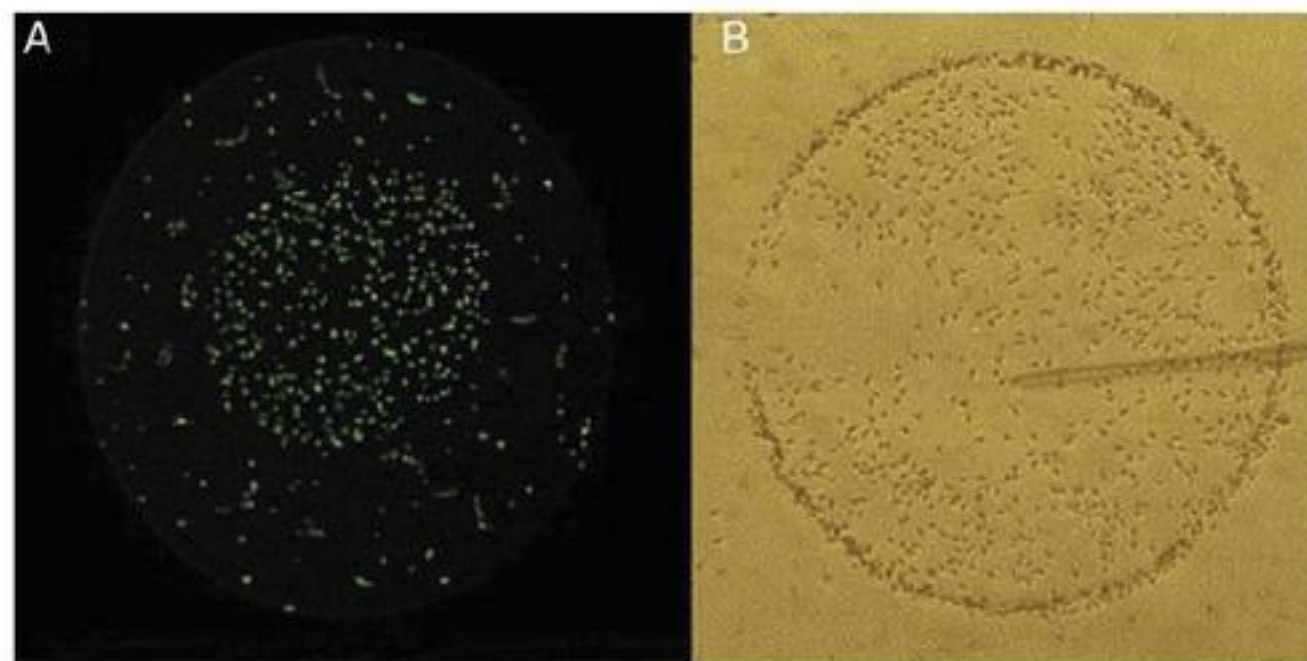
Phân lập được tế bào không chết theo chu trình.

Chọn lựa tinh trùng bằng điện di



Chọn lựa tinh trùng bằng đĩa PICSI

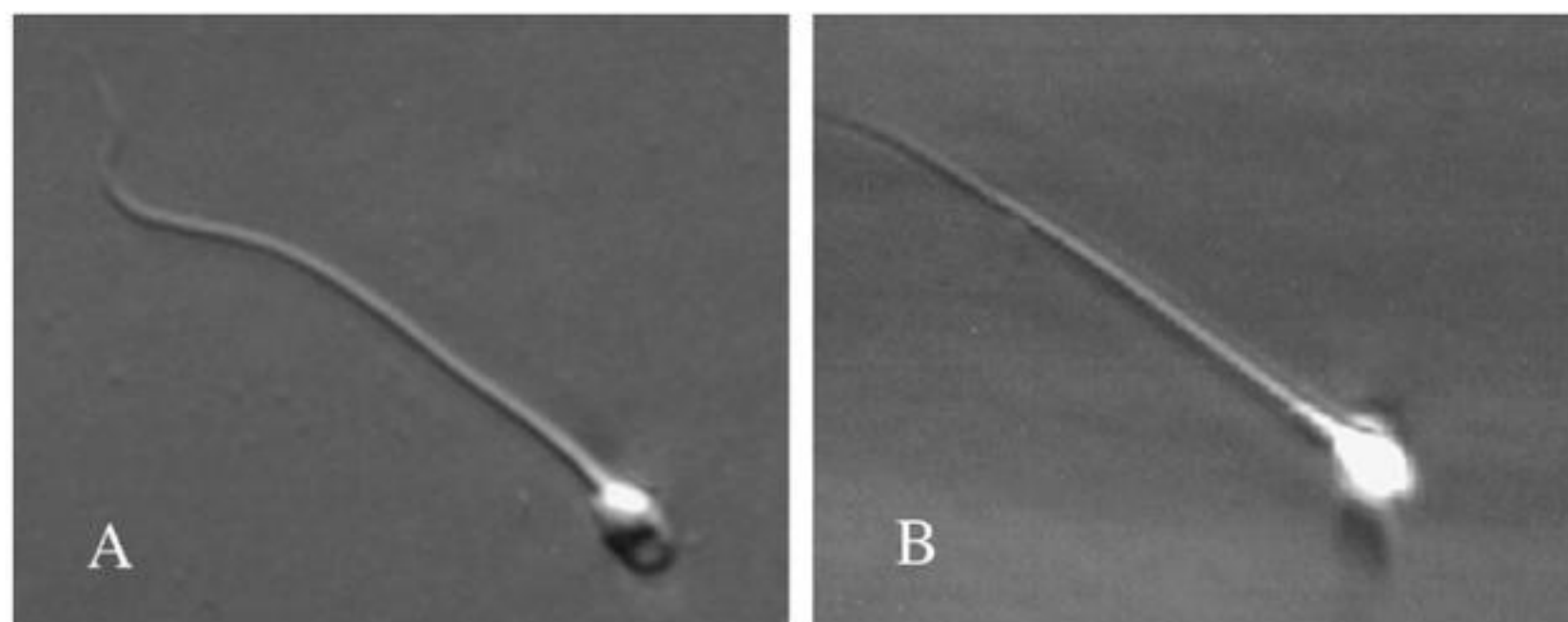
- Chọn lựa tinh trùng “bình thường” trước khi ICSI bằng cách sử dụng đĩa có phủ HA.
- Màng bào tương tinh trùng có chất lượng tốt có nhiều thụ thể HA.



Jakab và cs. (2005). Fertil Steril 84:1665-1673

29

HIỆN TƯỢNG KHÚC XẠ Ở ĐẦU TINH TRÙNG



Acrosome-reacted
spermatozoon

Acrosome intact
spermatozoon

Gianaroli L và cs. Fertil Steril 2010

30



Hướng giải quyết

1. Chuẩn bị tinh trùng

Thang nồng độ (90-70-45)

- Giảm lượng tinh trùng có không bào
- Giảm lượng tinh trùng không có acrosome
- Giảm lượng tinh trùng có acrosome nhỏ
- Cải thiện tỉ lệ tinh trùng có hình dạng bình thường

31

Hướng giải quyết

2. HOS

Nhận biết tinh trùng sống cho ICSI

- Tinh trùng sống – đuôi cuộn
- Tinh trùng không sống – đuôi thẳng và cứng

3. Chọn lựa tinh trùng trong quá trình ICSI

- Nhận biết tinh trùng có hình dạng bình thường
- Nhận biết và phân biệt tinh trùng có và không có không bào dưới độ phóng đại lớn (400x)

32

HỖ TRỢ HOẠT HÓA TRÙNG

Áp dụng cho:

- a. Tinh trùng không có acrosome hoặc đầu tròn
- b. Tinh trùng có ít acrosome – khả năng SOAF thấp
- c. Kết hợp với HOS

Phương pháp:

- 1. Hoạt hóa bằng điện
- 2. Hoạt hóa bằng hóa học – ionomycin/ Ca^{2+} ionophore
- 3. Tác nhân hoạt hóa tái tổ hợp/cRNA – PLC zeta

33

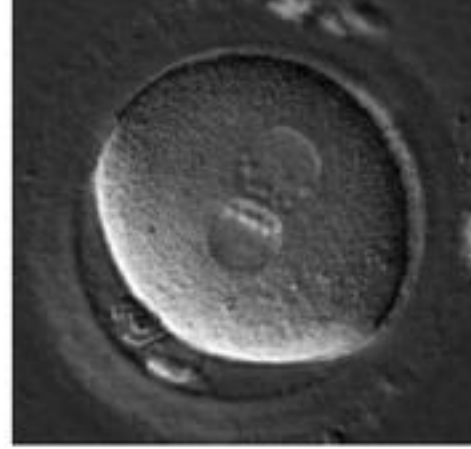
Tóm tắt

- Tinh trùng đóng góp DNA trong thụ tinh.
- Giai đoạn trưởng thành của tinh trùng ảnh hưởng đến kết quả ICSI.
- Tính toàn vẹn của DNA tinh trùng như mảnh vỡ và lệch bội là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng phôi và kết quả thai.
- Yếu tố tinh trùng ảnh hưởng đến sự thụ tinh, sự phát triển phôi và kết quả thai.

34



Giá trị tiên đoán của đánh giá tiền nhân



- Đánh giá hợp tử có hạn chế về mặt lâm sàng trong việc chọn lựa phôi tốt để chuyển.
- Đánh giá chất lượng phôi dựa trên số lượng phôi bào, các đặc điểm về hình thái phôi có giá trị tiên đoán hơn đánh giá hợp tử.

Nicoli và cs. (2010). Reprod Biol Endocrinol 8:77

35

Phân loại phôi dựa trên nhân của phôi bào

grade	1	2	3	4
A				
B				
C				

Moriwaki và cs. (2004). Hum. Reprod 19(1):152-159

36

BLASTOCYST GRADING SYSTEM



- Giai đoạn phát triển phôi nang
- Chất lượng ICM
- Chất lượng TE

37

HỆ THỐNG ĐÁNH GIÁ PHÔI NANG

Độ nở	Giai đoạn phát triển phôi nang
1	Khoang phôi ít hơn 1/2 thể tích phôi
2	Khoang phôi chiếm hơn 1/2 thể tích phôi
3	Phôi nang hoàn chỉnh, khoang phôi chiếm đầy thể tích phôi
4	Phôi nang nở rộng hoàn toàn, khoang lớn hơn phôi với sự mỏng dần của màng
5	Phôi đang thoát màng
6	Phôi thoát màng hoàn toàn

38



HỆ THỐNG ĐÁNH GIÁ PHÔI NANG

ICM

Độ ICM	Chất lượng ICM
A	Nhiều tế bào, liên kết chặt chẽ với nhau
B	Một vài tế bào, liên kết thành từng khối
C	Rất ít tế bào

TE

Độ TE	Chất lượng TE
A	Rất nhiều tế bào, hợp thành 1 lớp liên kết chặt chẽ
B	Rất ít tế bào, hình thành lớp biểu mô liên kết lỏng lẻo
C	Rất ít tế bào kích thước lớn

39

HỆ THỐNG ĐÁNH GIÁ PHÔI NANG



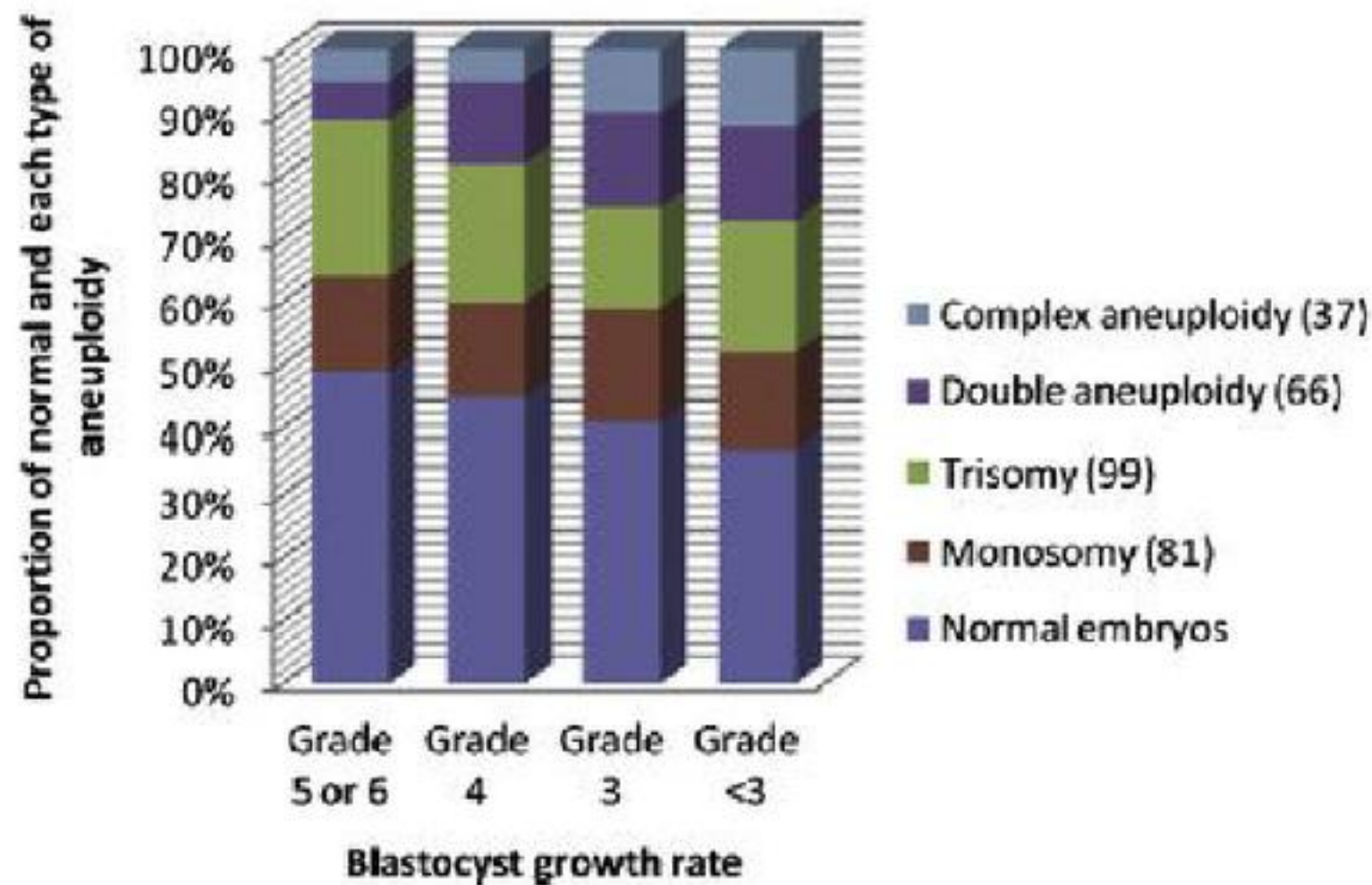
4AB
Độ nở rộng =4
ICM=A
TE=B

4AA
Độ nở rộng =4
ICM=A
TE=A

4BB
Độ nở rộng =4
ICM=B
TE=B

40

Blastocyst morphologic grading and the proportion of euploid and aneuploid (divided by type) embryos.



Alfarawati S và cs. (2011). Fertil Steril

41

SINH THIẾT PHÔI NANG



1. Tạo một lỗ trên màng ZP đối diện trực tiếp với khối ICM bằng dung dịch acid Tyrode hoặc tia laser.
2. Sau đó, phôi nang được nuôi cấy trong môi trường G2 trong một vài giờ để khối TE thoát ra ngoài.
3. Khối TE thoát khỏi phôi nang từ từ.
4. Phôi nang sinh thiết được đem đông lạnh trong khi đợi kết quả phân tích bằng CGH/PCR.
5. Các phôi nang/phôi nang sinh thiết được đông lạnh bình thường sẽ được chuyển trong qui trình rã phôi.

42



KẾT LUẬN

- Chất lượng noãn và tinh trùng có ảnh hưởng đáng kể đến kết quả điều trị của 1 chu kỳ ART.
- Chất lượng noãn phụ thuộc rất nhiều vào khả năng đáp ứng phác đồ kích thích buồng trứng của bệnh nhân.
- Các phương pháp/qui trình chọn lựa tinh trùng đã được đưa ra để cải thiện chất lượng tinh trùng.
- Chọn lựa phôi và phôi nang chuyển giúp cải thiện kết quả điều trị của 1 chu kỳ ART.

43

CẢM ƠN

44

ĐÁNH GIÁ PHÔI GIAI ĐOẠN PHÂN CHIA DỰA VÀO CÁC ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI CỦA PHÔI

Trương Thị Thanh Bình

IVFAS

Trong thụ tinh trong ống nghiệm (IVF – in vitro fertilization), việc đánh giá chính xác chất lượng phôi là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tỉ lệ thành công. Hầu hết tại các trung tâm IVF trên thế giới, việc đánh giá thường được thực hiện trên phôi ở giai đoạn phân chia (cleavage stage embryo). Các chuyên viên phôi học sẽ ghi nhận các đặc điểm của phôi dưới kính hiển vi và đánh giá mối tương quan giữa các đặc điểm này với tiềm năng làm tổ trong lòng tử cung của từng phôi riêng biệt. Để việc đánh giá được thực hiện một cách chính xác, nhiều hệ thống đánh giá chất lượng phôi giai đoạn phân chia đã được đưa ra dựa trên đặc điểm hình thái của phôi. Trong các hệ thống này, các chỉ tiêu đánh giá bao gồm: số lượng phôi bào, sự phân mảnh (fragmentation), tính đối xứng (symmetry), sự hiện diện của hiện tượng đa nhân (multinucleation) và trạng thái nén chặt (compaction) của các phôi bào.

Bài viết này dựa trên tài liệu *"The Atlas of Human Embryology: From Oocytes to Pre-implantation Embryos"* của Cristina Magli và cộng sự (2012) nhằm làm rõ lại các đặc điểm về hình thái của phôi đã được thảo luận trong Hội thảo Đồng thuận về đánh giá phôi, tổ chức ở Istanbul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Mục đích của bài viết là nhằm đưa ra một nền tảng kiến thức sâu rộng, chính xác và đặc biệt là có sự thống nhất giữa các chuyên gia trong việc đánh giá những đặc điểm của phôi trong giai đoạn phân chia.



SỐ LƯỢNG PHÔI BÀO

Giai đoạn phân chia (cleavage stage) của phôi bắt đầu từ giai đoạn phôi 2 tế bào đến giai đoạn nén (compaction) của phôi dâu gồm 8-16 tế bào. Số lượng phôi bào là đặc điểm chính, có giá trị tiên lượng cao nhất trong đánh giá chất lượng phôi. Phôi chất lượng tốt phải là phôi có thể hiện tính động học thích hợp (appropriate kinetics) và tính đồng bộ (synchrony of division) trong các giai đoạn phân chia. Ở phôi có sự phát triển bình thường, sự phân chia tế bào sẽ diễn ra cách nhau 18-20 giờ. Các phôi phân chia quá chậm hoặc quá nhanh có thể có những khiếm khuyết ở nhiễm sắc thể hoặc ở quá trình trao đổi chất. Các nghiên cứu gần đây cho thấy: bên cạnh thời điểm phân chia, khoảng cách thời gian giữa các lần phân chia cũng rất quan trọng. Nếu tất cả các phôi bào phân chia đồng bộ một cách chính xác, chúng ta chỉ quan sát được các phôi 2-, 4-, 8- tế bào. Tuy nhiên, trong thực tế, chúng ta thường quan sát thấy các phôi 3-, 5-, 6-, 7- hoặc 9- tế bào, điều này cho thấy sự phát triển không đồng bộ giữa các phôi bào. Thời điểm đánh giá phôi được nghiên cứu và thiết lập nhằm đánh giá chính xác tính động học của phôi. Cần lưu ý rằng, tính động học không chỉ do bản chất bên trong phôi quyết định mà còn chịu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy như nhiệt độ, môi trường nuôi cấy...

Trong đánh giá phôi giai đoạn phân chia, các mốc thời gian quan sát tốt nhất được thông qua trong Hội thảo Đồng thuận Istanbul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) như sau:

- Ngày 1: (26 ± 1 giờ) sau ICSI, (28 ± 1 h) sau IVF: 2 tế bào
- Ngày 2: (44 ± 1 giờ): 4 tế bào
- Ngày 3: (68 ± 1 giờ): 8 tế bào

Sự phân chia sớm (early cleavage) được định nghĩa là lần giảm phân đầu tiên, xảy ra trước thời điểm $26 + 1$ giờ (ICSI) và $28 + 1$ giờ (IVF) được cho là có liên quan đến số lượng phôi tốt, tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ phát triển đến giai đoạn phôi nang. Cơ chế về mối liên hệ giữa lần phân chia đầu tiên và sự phát triển sau đó của phôi vẫn chưa được tìm ra, tuy nhiên, một số giả thuyết đã được đề nghị. Nhìn chung các giả thuyết này dựa trên hoạt động của trứng thụ tinh theo chu trình tế bào (Natalia Basile, 2011).

Nhiều nghiên cứu cho thấy việc chuyển phôi 4 tế bào vào ngày 2 cho tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ làm tổ cao hơn có ý nghĩa so với chuyển phôi có số lượng tế bào nhiều hơn hoặc ít hơn. Tương tự, với chuyển phôi ngày 3, các nghiên cứu cho thấy rằng

nếu phôi tiếp tục gia tăng tế bào so với ngày 2, tỉ lệ làm tổ và tỉ lệ sinh sống sẽ tăng lên; đặc biệt, phôi 8 tế bào (phát triển từ phôi 4 tế bào vào ngày 2) cho các tỉ lệ nêu trên cao nhất.

Ngoài ra, giai đoạn phân chia của phôi tại thời điểm chuyển phôi cũng có vai trò trong việc dự đoán tỉ lệ sảy thai sớm. Theo Hourvitz và cộng sự (2006), nếu phôi tốt nhất trong các phôi được chuyển vào ngày 3 có số lượng phôi bào nhỏ hơn 5 thì tỉ lệ sảy thai sớm sẽ tăng lên. Theo nghiên cứu của Munne (2006), tác giả nhận thấy có các mốc thời gian quan sát và các bất thường nhiễm sắc thể, trong đó, phôi có 4 tế bào vào ngày 2 có tỉ lệ bất thường nhiễm sắc thể thấp nhất. Nghiên cứu của Magli và cộng sự (2007) cũng cho kết quả tương tự với phôi có 7-8 tế bào vào ngày 3. Ngoài ra còn có nghiên cứu của Finn và cộng sự (2010) cho thấy phôi có 7-8 tế bào vào ngày 3 có tỉ lệ thể bội chỉnh (euploidy) cao hơn so với phôi có 6 hoặc ít hơn 6 phôi bào và phôi có 9 hoặc nhiều hơn 9 phôi bào.

SỰ PHÂN MẢNH (FRAGMENTATION)

Ở phôi đang phân chia, quá trình nguyên phân thường tạo ra các mảnh tế bào chất, không chứa nhân được bao quanh bởi một màng plasma, gọi là mảnh vỡ tế bào (fragment). Kích thước và sự phân bố các mảnh vỡ tế bào bên trong khoảng không gian bao quanh là màng trong suốt (Zona Pellucida) thường rất khác nhau. Người ta thường sử dụng lượng mảnh vỡ để dự đoán khả năng làm tổ của phôi và sự lệch bội. Tuy nhiên, nếu mảnh vỡ tế bào chỉ chiếm ít hơn 10% thể tích toàn bộ phôi, điều này không ảnh hưởng đến tiềm năng phát triển của phôi.

Mức độ phân mảnh thường được biểu diễn theo tỉ lệ phần trăm trong tổng thể tích tế bào chất và được chia thành 3 cấp độ:

- Phân mảnh ít (mild): <10%
- Phân mảnh vừa phải (moderate): 10-25%
- Phân mảnh nhiều (severe): >25%

Thông thường, rất khó để phân biệt giữa các mảnh vỡ tế bào (không nhân) với các phôi bào nhỏ (có nhân). Johansson và cộng sự (2003) đã cho thấy mảnh tế bào chất có đường kính <45µm vào ngày 2 và <40µm vào ngày 3 không có chứa DNA, và đề nghị tiêu chuẩn để xác định các mảnh vỡ tế bào là các cấu trúc có kích thước nhỏ hơn kích thước đã được đề nghị.



Các nghiên cứu cũng cho thấy mức độ phân mảnh nhiều có tương quan âm với tỉ lệ làm tổ và tỉ lệ thai lâm sàng (Racowsky và cs., 2000). Trong khi đó, phân mảnh ít không có ảnh hưởng xấu và thậm chí đôi khi còn có tác động tốt lên chất lượng của phôi (Alikani và cs., 1999). Ở người, có hai loại phân mảnh đã được ghi nhận bằng phân tích các mốc thời gian (time-lapse analysis):

- Phân mảnh thật (definitive fragmentation): xuất hiện tách hẳn ra khỏi phôi bào và hiện diện trong suốt quá trình phát triển của phôi.
- Phân mảnh giả (pseudo-fragmentation): xuất hiện tạm thời trong giai đoạn phân chia của phôi và không hiện diện trong quá trình phát triển sau này của phôi.

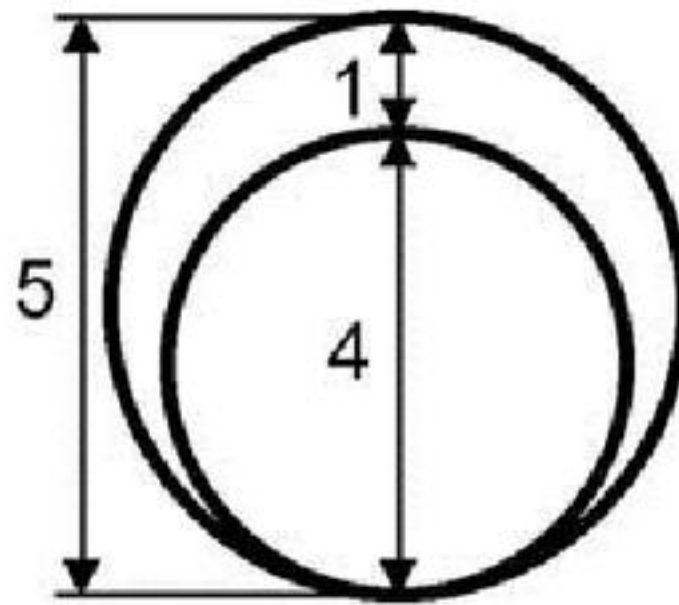
Sự gia tăng tỉ lệ phân mảnh tế bào cũng dẫn đến giảm sự hình thành phôi nang và có thể ảnh hưởng đến sự phân bố của tế bào trong quá trình biệt hóa. Sự phân bố của mảnh vỡ tế bào trong khoang PVS được chia thành 2 kiểu: phân tán rải rác (scattered) và tập trung (concentrated). Phân mảnh kiểu phân tán rải rác có tương quan với sự gia tăng xác suất bất thường nhiễm sắc thể. Tuy nhiên, mức độ phân mảnh càng nhiều thì càng khó phân biệt giữa 2 kiểu phân mảnh này. Tóm lại, sự phân mảnh được xem như một thông số cần thiết để đánh giá sự phát triển của phôi vì các phôi có sự phân mảnh thật càng nhiều thì khả năng sống sót càng ít.

KÍCH THƯỚC PHÔI BÀO VÀ KHÁI NIỆM “STAGE SPECIFIC” VÀ “NON-STAGE SPECIFIC”

Theo lý thuyết, quá trình nguyên phân sẽ tạo ra hai phôi bào có kích thước bằng nhau. Khi sự phân chia diễn ra không đối xứng, một trong các phôi bào tạo ra sẽ thừa hưởng ít hơn một nửa lượng tế bào chất nhận được từ tế bào mẹ. Phôi bào này khi tiếp tục phân chia sẽ tạo ra dòng tế bào chứa nhiều khiếm khuyết. Theo nhiều nghiên cứu, phôi 4 và 8 tế bào đều nhau có tỉ lệ làm tổ cao hơn và tỉ lệ đa nhân trong một phôi bào, tỉ lệ lệch bội (aneuploidy) thấp hơn so với các loại phôi khác. Nhiều nghiên cứu cho thấy ở phôi ngày 2, các phôi bào có độ đồng đều cao thì kết quả sau điều trị cũng gia tăng. Sự phân chia không đồng đều (một tế bào phân chia thành hai tế bào có kích thước không bằng nhau) có thể dẫn đến sự phân phối không đều các phân tử trong tế bào chất như protein và mRNAs, và đã được ghi nhận là có tương quan đến sự gia tăng tỉ lệ lệch bội.

Kích thước phôi bào trong một phôi phụ thuộc vào số lần phân chia và độ đồng đều của mỗi lần phân chia. Do đó, để đánh giá chất lượng phôi giai đoạn phân chia một

cách chính xác hơn, người ta đưa ra khái niệm “stage specific” và “non-stage specific” embryos. Việc phân loại được thực hiện dựa trên số lượng phôi bào và kích thước phôi bào. Các phôi bào của phôi 2-, 4- và 8- nên có kích thước giống nhau (stage specific) hơn là không giống nhau (non-stage specific). Hình 1 biểu diễn tỉ lệ kích thước lý tưởng của phôi người 2 tế bào (trong giai đoạn phôi 2 tế bào). Nếu phôi có 2 phôi bào đều nhau về kích thước thì được đánh giá là phôi “stage specific”. Nếu 2 phôi bào có sự khác biệt lớn về kích thước (>25% về đường kính) thì được cho là phôi “non-stage specific”. Quy tắc này được tính trên phôi bào lớn nhất và nhỏ nhất trong phôi và áp dụng tương tự với phôi 4 và 8 tế bào.



Hình 1. Tỉ lệ kích thước phôi bào lý tưởng của phôi giai đoạn phân chia (2-, 4-, 8- tế bào)

Trái lại, phôi bào của các phôi với số lượng tế bào khác với 2-, 4- và 8- nên có kích thước khác nhau vì có sự phân chia không đồng bộ của một hoặc nhiều hơn một phôi bào. Các phôi sau đây vẫn được xem là phôi “specific stage”:

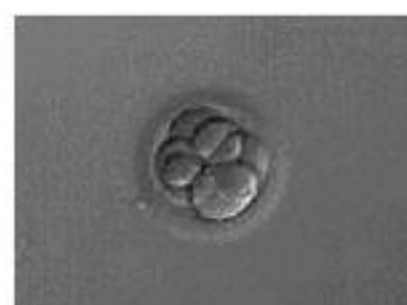
- Phôi 3 tế bào nên có 1 phôi bào lớn và 2 phôi bào nhỏ hơn (hình 2).
- Phôi 5 tế bào nên có 3 phôi bào lớn và 2 phôi bào nhỏ hơn (hình 3).
- Phôi 6 tế bào nên có 2 phôi bào lớn và 4 phôi bào nhỏ hơn (hình 4).
- Phôi 7 tế bào nên có 1 phôi bào lớn và 6 phôi bào nhỏ hơn (hình 5).



Hình 2



Hình 3



Hình 4

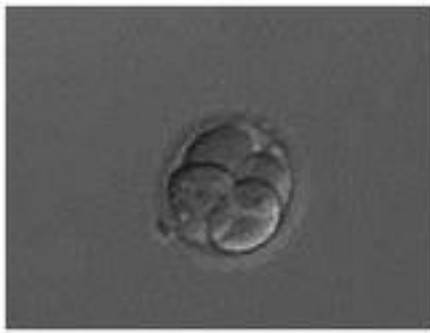


Hình 5

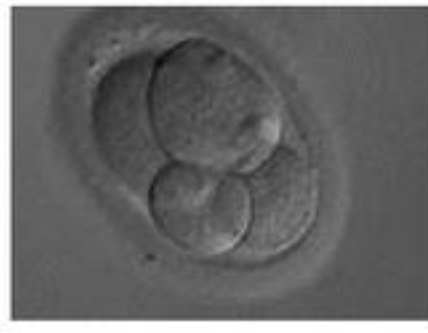
Trái lại, các phôi sau đây sẽ được xem là phôi “non-specific”:



- Phôi 4 tế bào có 1 hoặc 2 phôi bào lớn hơn nhiều so với các phôi bào còn lại (hình 6, 7).
- Phôi 3 tế bào có tất cả các phôi bào đều nhau (hình 8).
- Phôi 5 tế bào có 2 phôi bào lớn và 3 phôi bào nhỏ hoặc 1 phôi bào nhỏ và 4 phôi bào lớn (hình 9, 10).
- Phôi 6 tế bào có tất cả các phôi bào đều nhau hoặc là có sự khác biệt rõ về kích thước (ví dụ: 2 phôi bào lớn và 4 phôi bào nhỏ hơn hẳn) (hình 11, 12).
- Phôi 7 tế bào với 3 phôi bào lớn và 4 phôi bào nhỏ hơn (hình 13).



Hình 6



Hình 7



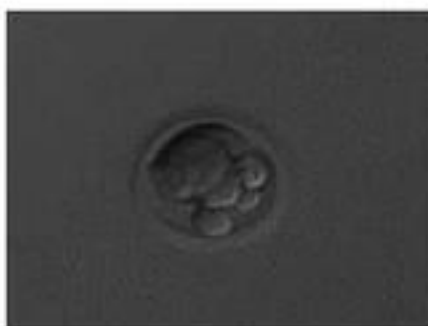
Hình 8



Hình 9



Hình 10



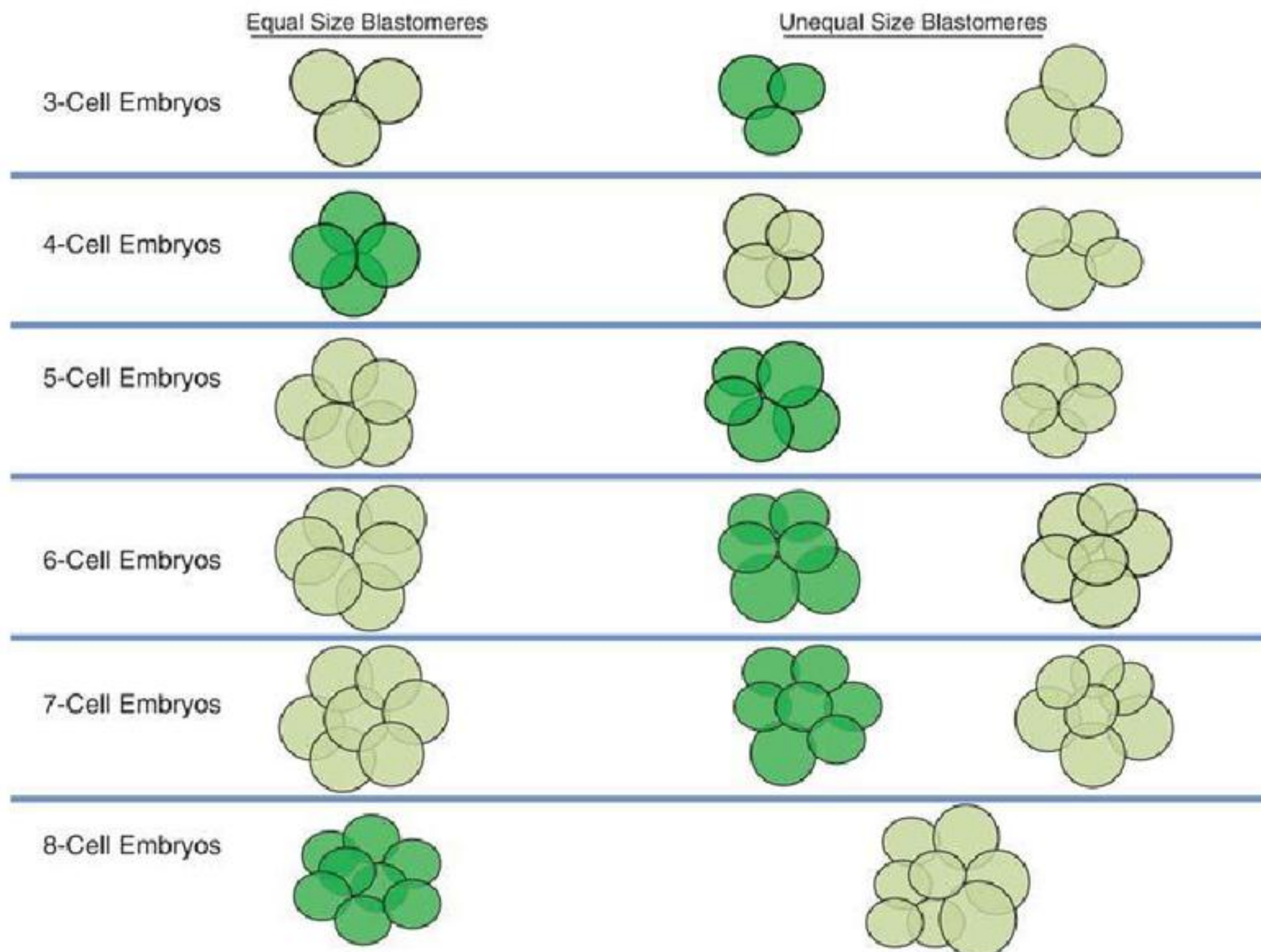
Hình 11



Hình 12



Hình 13



Hình 14. Quan điểm về các kiểu phân chia phôi

"stage-specific" so với "non-stage specific."

Màu đậm là các phôi "stage specific". Màu nhạt là các phôi "non-stage specific".

SỰ XUẤT HIỆN NHÂN Ở PHÔI BÀO

Trong giai đoạn phân chia, ở một số trường hợp, ta có thể quan sát thấy nhân của phôi bào. Một cách lý tưởng nhất, mỗi phôi bào trong phôi đều có thể quan sát thấy một nhân. Hiện tượng đa nhân là hiện tượng được nghiên cứu nhiều nhất, được định nghĩa là hiện tượng có sự xuất hiện của nhiều hơn một nhân ở ít nhất một phôi bào. Hiện tượng đa nhân có thể được đánh giá vào ngày 1, 2 và 3 khi nuôi cấy. Tuy nhiên, ở phôi ngày 3, đặc điểm này khó ghi nhận hơn do phôi ngày 3 có cấu trúc phức tạp hơn (số lượng phôi bào nhiều, kích thước phôi bào nhỏ). Chất lượng phôi được chứng minh là có tương quan với hiện tượng đa nhân. Phôi 4 tế bào vào ngày 2 và phôi 8 tế bào vào ngày 3 có tỉ lệ đa nhân thấp hơn so với các phôi có số lượng tế bào khác với 4 và 8 vào cùng ngày quan sát.

Nhiều nghiên cứu cho thấy hiện tượng đa nhân còn có liên quan đến bất thường về di truyền của phôi, làm giảm tỉ lệ phân chia và tiềm năng làm tổ của phôi, đồng

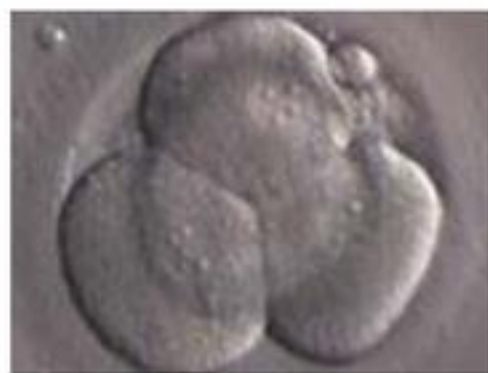
thời làm tăng tỉ lệ sảy thai. Các bất thường về hình thái khác nhau thường có liên quan lẫn nhau, ví dụ như sự phân chia không đều được cho là có liên quan đến hiện tượng đa nhân và phân mảnh tế bào.

Sự xuất hiện hoặc không xuất hiện của hiện tượng đơn nhân trong mỗi phôi bào là một yếu tố dự đoán được tiềm năng làm tổ của phôi. Ở phôi 4 tế bào, nếu quan sát thấy tất cả 4 phôi bào đều chứa 1 nhân (đơn nhân), ta có thể dự đoán tỉ lệ làm tổ của phôi cao hơn trường hợp chỉ có ít hơn 4 (0-3) phôi bào đơn nhân được quan sát thấy.

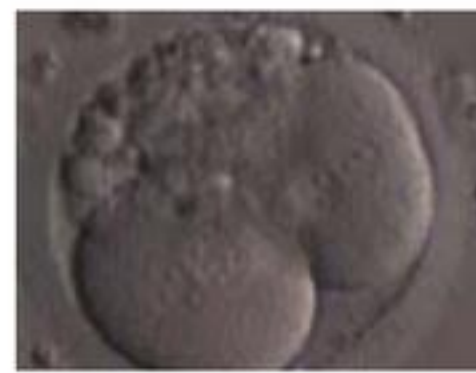
Hiện tượng đa nhân được chia thành hai loại:

- Binucleation: có 2 nhân trong 1 phôi bào.
- Multi/micronucleation: có nhiều hơn 2 nhân trong 1 phôi bào.

Cả hai loại hiện tượng này có thể có bản chất khác nhau. Phôi có phôi bào có nhiều hơn hai nhân thường được bỏ đi, không dùng cho chuyển phôi vì có thể có sự phân chia bất thường của tế bào. Tuy nhiên, với các phôi ngày 1 có phôi bào chứa 2 nhân cần được cân nhắc cho chuyển phôi vì các phôi bào này có thể phân chia tiếp tục thành các tế bào có bộ nhiễm sắc thể bình thường. Việc đánh giá hiện tượng đa nhân nên được đưa vào qui trình đánh giá phôi, nhằm chọn được những phôi có chất lượng tốt nhất; và mặc dù những phôi này có thể tạo thành thai sinh sống nhưng vẫn cần được loại bỏ khi chuyển phôi mà có các phôi khác thay thế.



*Hình 15. Phôi 4 tế bào đều nhau.
Mỗi phôi bào đều chứa 1 nhân.*



*Hình 16. Phôi 2 tế bào,
với 25-30% fragment.
Mỗi phôi bào đều chứa 2 nhân.*

CÁC BẤT THƯỜNG VỀ TẾ BÀO CHẤT

Thông thường, phôi ở giai đoạn phân chia có tế bào chất đồng nhất, hạt mịn, rõ, màu nhạt. Sự hiện diện của các bất thường như không bào, các vùng hạt trong tế bào chất do sự kết đám của các bào quan tạo ra (cytoplasmic granularity), các lỗ nhỏ trong tế bào chất (cytoplasmic pitting)... cũng được ghi nhận trong quá trình đánh giá chất lượng phôi. Các lỗ nhỏ trong tế bào chất được xác định bởi sự xuất hiện của nhiều lỗ nhỏ, đường kính khoảng $1,5\mu\text{m}$, trên bề mặt của tế bào chất (hình 17). Mặc dù hiện tượng này ở phôi ngày 3 được cho là giúp cải thiện sự hình thành phôi nang, nhìn chung, các đặc điểm của tế bào chất không có giá trị tiên lượng cho chất lượng phôi cũng như tỉ lệ thai. Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác cho thấy rằng điều kiện nuôi cấy có thể cảm ứng tạo ra hiện tượng tạo lỗ ở tế bào chất và trong một số trường hợp có thể làm tăng nguy cơ sảy thai sớm.

Ở các phôi bào, tế bào chất có thể sẫm màu ở vùng trung tâm và trong, sáng ở vùng ngoại vi xung quanh do các bào quan trong tế bào chất tập trung ở trung tâm của phôi bào (hình 18). Theo Veeck (1999), các phôi này có ít tiềm năng làm tổ hoặc sẽ bị thoái hóa. Tương tự, các phôi có các vùng hạt tập trung tế bào chất xen lẫn với vùng trong bên trong phôi bào có nhiều khả năng sẽ bị thoái hóa (hình 19).

Hiện tượng không bào trong tế bào chất khá phổ biến ở trứng và phôi người (hình 20). Các không bào thường khác nhau về kích thước và số lượng. Về bản chất, không bào là một dạng thể vùi được bao quanh bởi màng tế bào chất, bên trong chứa đầy dịch gần giống như dịch ở khoang quanh noãn. Mặc dù không bào đã được mô tả và nghiên cứu kỹ ở trứng người, nhưng có rất ít thông tin về ảnh hưởng của chúng trong sự phát triển của phôi. Bên cạnh các không bào được quan sát thấy tại thời điểm thu nhận trứng và các không bào được tạo ra khi ICSI, nhiều không bào có thể xuất hiện tại giai đoạn nén của phôi. Sự hình thành không bào vào ngày 4 có liên quan đến việc phôi ngừng phát triển. Nguyên nhân có thể là do các không bào này tạo ra các ảnh hưởng bất lợi đến sự hình thành phôi nang. Người ta tin rằng sự xuất hiện của một vài không bào nhỏ là không quan trọng. Tuy nhiên, nếu không bào nhiều và to, chúng có thể gây ảnh hưởng, chủ yếu lên sự định hướng không gian của phôi, do đó nên được ghi nhận để chọn lựa phôi.





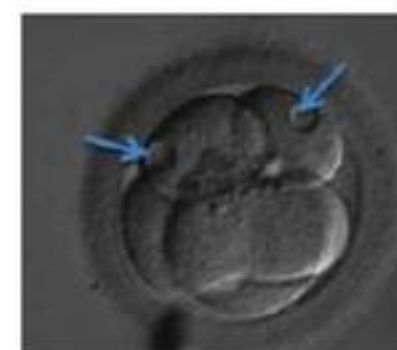
*Hình 17.
Hiện tượng
"cytoplasmic
pitting": các
lỗ nhỏ phân bố
trong tế bào chất
của các phôi bào*



*Hình 18.
Phôi bào có vùng
ngoại vi tron sáng,
vùng trung tâm
nhiều hạt sẫm
màu do sự tập
trung của các bào
quan vào vùng
trung tâm*



*Hình 19.
Sự phân bố bất
thường của các
bào quan tạo ra
các vùng tron
và vùng hạt
xen lẫn nhau*



*Hình 20.
Phôi có các
không bào
(vị trí mũi tên)*

SỰ ĐỊNH HƯỚNG KHÔNG GIAN (SPATIAL ORIENTATION) CỦA PHÔI BÀO

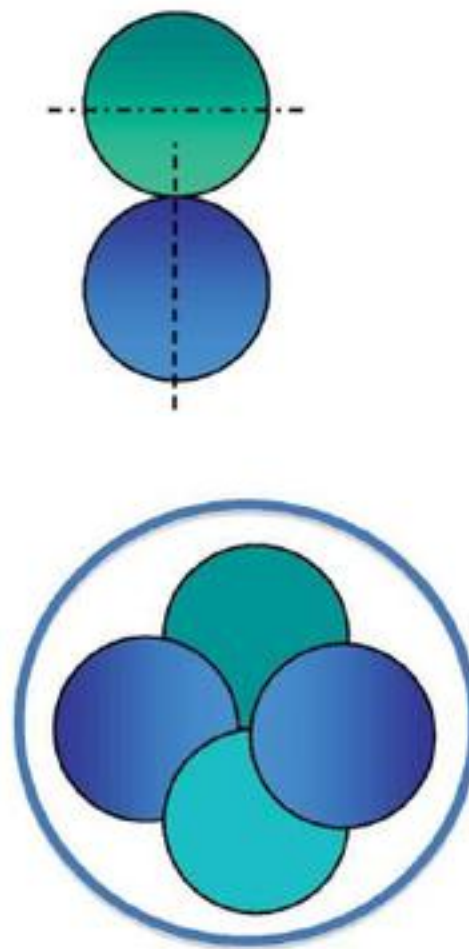
Trứng người có sự phân cực ngay từ khi mới hình thành và gồm có hai cực: cực "animal" và cực "vegetal". Sự phân chia thứ nhất xảy ra theo trục kinh tuyến (từ trên xuống), tạo ra hai phôi bào giống nhau, thừa hưởng các cực "animal" và "vegetal" như nhau. Ở lần phân chia thứ hai, một tế bào phân chia theo trục kinh tuyến, trong khi tế bào còn lại phân chia theo hướng xích đạo (từ trái sang phải hoặc ngược lại) dẫn đến sự hình thành 4 tế bào có sự phân cực khác nhau. Hai tế bào con tạo ra từ sự phân chia theo hướng kinh tuyến sẽ thừa hưởng cả hai loại cực. Trong khi đó, hai tế bào con được tạo ra từ sự phân chia theo hướng xích đạo sẽ có sự khác nhau về cực: một tế bào chứa cực "animal" và một tế bào chứa cực "vegetal" (hình 23). Kết quả của hai lần phân chia này sẽ tạo ra một cấu trúc tứ diện (hoặc hình chóp) với 3 phôi bào có cực "animal" nằm gần thể cực và phôi bào còn lại chỉ thừa hưởng cực "vegetal" nằm xa thể cực (hình 21). Nếu tế bào phân chia theo các hướng khác với cách trên có thể tạo ra sự phân bố các cực khác ở tế bào con. Kết quả có thể tạo thành cấu trúc không phải là tứ diện, còn gọi là cấu trúc "clover" (các phôi bào nằm trên cùng một mặt phẳng giống như hình cỏ ba lá). Hình dạng "clover" có thể tiếp tục duy trì trong các lần phân chia tiếp theo.



Hình 21. Phôi 4 tế bào
với cấu trúc tứ diện điển hình



Hình 22. Phôi 4 tế bào
với cấu trúc "clover" (cỏ ba lá)



Hình 23. Mặt phẳng phân chia của lần phân bào thứ 2. Một phôi bào chia theo hướng kinh tuyến, một phôi bào phân chia theo hướng xích đạo, tạo ra 4 tế bào con có các cực khác nhau

Ngoài ra, trong thực tế, chúng ta thường gặp các phôi hình quả trứng gà (ovoid) nếu xét trong không gian 3 chiều (Nếu là không gian 2 chiều thì gọi là hình oval). Ở các phôi này, các phôi bào thường phân bố một cách bất thường.

Tóm lại, mặt phẳng phân chia được cho là có vai trò xác định nhiều khía cạnh khác nhau của sự phát triển sau này của phôi. Để hiểu rõ hơn những tác động của nó lên khả năng phát triển và tiềm năng làm tổ của phôi, cần làm rõ những vấn đề có liên quan đến quá trình điều hòa ở gen lên sự phân chia của phôi bào.

HIỆN TƯỢNG NÉN CỦA PHÔI BÀO

Sau khi phôi đạt đến giai đoạn 8 tế bào, các phôi bào bắt đầu biểu hiện sự gia tăng gắn kết lẫn nhau tại một loạt các kênh nội bào. Đây chính là điểm khởi đầu của hiện tượng nén của phôi. Quá trình nén tiếp tục diễn ra ở các lần phân chia tiếp



theo cho đến khi ranh giới giữa các phôi bào không còn quan sát được. Hiện tượng này thường xảy ra vào ngày 4. Phôi ở giai đoạn này được gọi là phôi dâu (morula). Một phôi dâu tốt là một tín hiệu tốt cho khả năng phát triển của phôi. Ngoài ra, thành phần môi trường nuôi cấy và điều kiện môi trường cũng đóng vai trò quan trọng trong sự xuất hiện hiện tượng nén ở phôi.

Hiện tượng nén có thể quan sát được ở trước giai đoạn phôi 8 tế bào. Điều này được một số nhà nghiên cứu xem là bình thường. Trong khi đó, một số phôi 10 tế bào vẫn không có hiện tượng này được xem là khác thường. Nghiên cứu của Skiadas (2006) cho thấy các phôi có hiện tượng nén xảy ra sớm sẽ có tiềm năng làm tổ cao hơn. Tuy nhiên điều này chỉ đúng ở các phôi có chất lượng tốt (<10% fragment).

Theo Đồng thuận Istanbul, phôi ngày 4 được đánh giá là tốt khi tất cả các tế bào đều nằm trong một khối phôi dâu nén chặt. Những phôi có một vài tế bào hoặc mảnh vỡ tế bào nằm tách rời ra khỏi khối phôi bào nén chặt sẽ có khả năng làm tổ thấp hơn. Nguyên nhân có thể là do các tế bào nằm tách rời này có thể đánh mất tính toàn thể (totipotency) khi chúng được gắn kết để tạo thành lá nuôi tế bào (trophectoderm).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. (1999). Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 71:836-842.
2. 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. *Hum Reprod*; 26:1270-1283.
3. Cristina Magli, Gayle M. Jones, Kersti Lundin, and Etienne van den Abbeel (2012). The Atlas of Human Embryology: From Oocytes to Pre-implantation Embryos. *Hum Reprod*, 27(S1):i50-i71
4. Finn A, Scott L, O'leary T, Davies D, Hill J. (2010). Sequential embryo scoring as a predictor of aneuploidy in poor-prognosis patients. *Reprod Biomed Online* 21:381-390.
5. Hourvitz A, Lerner-Geva L, Elizur SE, Baum M, Levron J, David B, Meirow D, Yaron R, Dor J. (2006). Role of embryo quality in predicting early pregnancy loss following assisted reproductive technology. *Biomed Online* 13:504-509.
6. Johansson M, Hardarson T, Lundin K. (2003). There is a cut off limit in diameter between a

- blastomere and a small anucleate fragment. *J Assist Reprod Genet* 20:309-313.
7. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. (2007). Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril* 87:534-540.
8. Munne S. (2006). Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online* 12:234-253.
9. Natalia Basile, Juan Garcia Velasco, Marcos Meseguer (2011). Evaluation of embryo quality: Time lapse imaging to assess embryo morphokinesis. In: David K. Gardner, Ariel Weissman, Colin M. Howles, Zeev Shoham. *Textbook of assisted reproductive techniques 4thEds.*:254-265.
10. Racowsky C, Jackson KV, Cekleniak NA, Fox JH, Hornstein MD, Ginsburg ES. (2000). The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil Steril* 73:558-564.
11. Skiadas CC, Jackson KV, Racowsky C. (2006) Early compaction on day 3 may be associated with increased implantation potential. *Fertil Steril* 86:1386-1391.
12. Veeck LL. Preembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation (1999). In: *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses: An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology*. New York, USA: Parthenon Publishing, 46-51.



ĐÁNH GIÁ HÌNH THÁI PHÔI NANG

Nguyễn Ngọc Quỳnh, Phạm Dương Toàn, Đặng Quang Vinh

IVF Vạn Hạnh

TỔNG QUAN

Theo báo cáo mới nhất trên thư viện Cochrane năm 2012 cho thấy có sự khác biệt nhỏ về tỉ lệ sinh sống cũng như không có sự khác biệt về tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ sảy thai sau chuyển phôi nang so với chuyển phôi ở giai đoạn phân chia. Tuy nhiên, việc kéo dài thời gian nuôi cấy phôi đến giai đoạn phôi nang đã trở thành một trong những xu hướng được thực hiện trong chương trình hỗ trợ sinh sản từ những năm 1999, khi môi trường nuôi cấy đầu tiên cho phôi nang được sản xuất trên thị trường. Các hệ thống môi trường nuôi cấy phôi dần dần được cải thiện và đến nay, hầu hết các hệ thống môi trường nuôi cấy phôi nang cho phép phôi đạt đến giai đoạn phôi nang trên 50% trường hợp.

Mục tiêu chính của nuôi cấy phôi nang là để tăng tỉ lệ thành công của thụ tinh ống nghiệm, bởi vì lựa chọn phôi tốt hơn sau khi gen kích hoạt và/hoặc đồng bộ nội mạc tử cung tốt hơn. Nuôi cấy phôi nang cũng đã được sử dụng như một công cụ lựa chọn phôi khả thi nhất, kết quả là giảm số lượng phôi chuyển tương ứng với giảm tỉ lệ đa thai.

Nuôi cấy phôi nang ngày càng được áp dụng rộng rãi tại các trung tâm IVF, do đó, cần phải có hệ thống đánh giá hình thái phôi nang để dựa vào đó chọn lựa phôi chuyển cho bệnh nhân.

Trong 20 năm qua, đã có nhiều hệ thống đánh giá hình thái phôi nang được thiết lập.

Dokras và cộng sự (1993) là những người đầu tiên đưa ra hệ thống đánh giá phôi nang tối ưu dựa trên sự khác biệt giữa khoang phôi có nguồn gốc từ phôi giai đoạn nén sớm và từ không bào. Trong giai đoạn đầu nuôi cấy phôi nang, phôi nang có khoang nở rộng (Shoukir và cs., 1998) và phôi nang đang thoát màng (Balaban và cs., 2000; Yoon và cs., 2001) được ưu tiên lựa chọn phôi để chuyển phôi. Sau đó, hệ



thống phân loại phôi nang được giới thiệu vào năm 1999 của Gardner và Schoolcraft đã nhanh chóng được phần lớn các trung tâm thụ tinh ống nghiệm áp dụng. Mặc dù hệ thống đánh giá không bao gồm tất cả các khía cạnh hình thái phôi nang, đặc biệt là bất thường về hình thái học, nó cũng đã rất hữu ích trong việc phân loại mức độ mở rộng phôi nang, cũng như đánh giá hình thái học của khối tế bào bên trong (ICM) và lớp tế bào lá nuôi (TE). Và gần đây nhất, hệ thống đánh giá phôi nang của Hiệp hội Alpha được công bố chủ yếu dựa vào hệ thống của Gardner với một số trường hợp ngoại lệ.

Tất cả các nghiên cứu này thường tập trung vào việc xác định phôi nang tối ưu. Có ít dữ liệu đánh giá về hình thái phôi nang không tối ưu và tiềm năng phát triển của nó, mặc dù ở nhiều chu kỳ điều trị thường gặp phôi nang có chất lượng không tốt.

Mục tiêu của bài báo cáo này là trình bày hệ thống đánh giá phôi nang theo Gardner và Schoolcraft (1999) được áp dụng nhiều ở các trung tâm, đồng thời phân tích kỹ hơn các hình thái phôi nang bất thường được quan sát thường xuyên trong quá trình nuôi cấy phôi nang.

ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG PHÔI NANG

Hình thái phôi nang được đánh giá dựa trên 3 tiêu chuẩn là độ nở rộng của khoang phôi, TE và khối ICM.

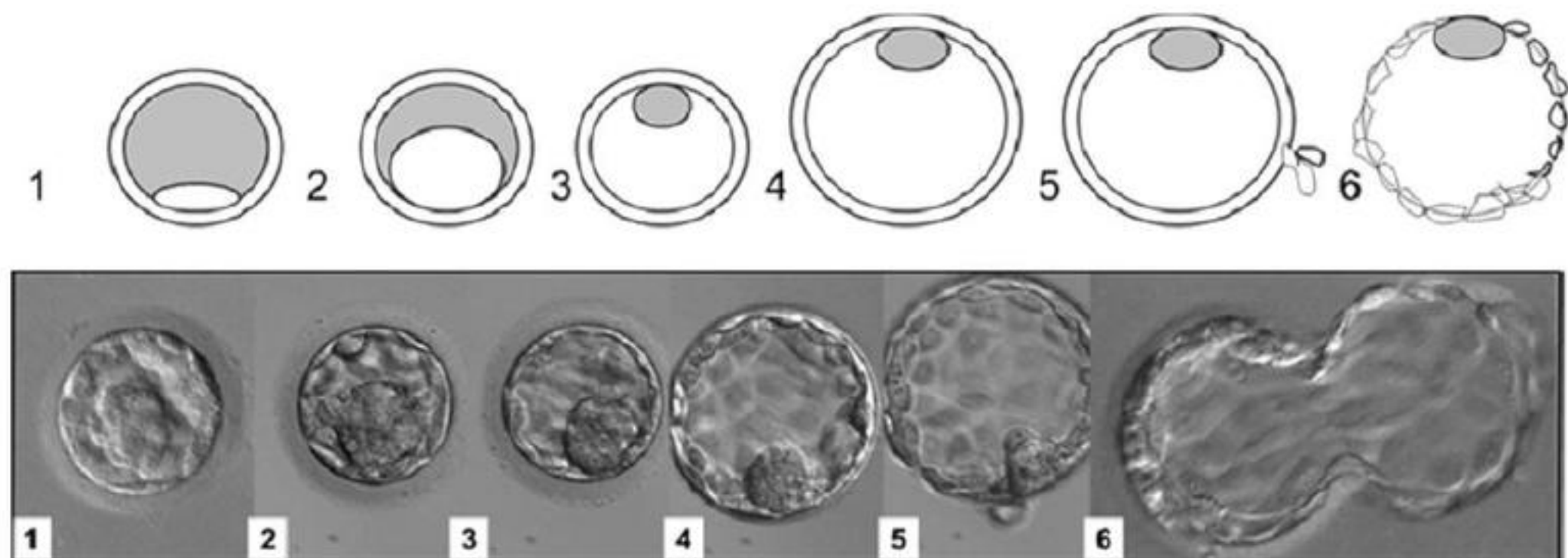
Độ nở rộng của khoang phôi

Ở giai đoạn phôi dâu, bắt đầu có sự tích lũy dịch giữa các tế bào, khi thể tích lượng dịch này tăng lên, hình thành lỗ hổng và dần dần tạo nên khoang phôi nang. Sự kiện này xảy ra vào giai đoạn ngày 4 và ngày 5 trong qui trình nuôi cấy phôi trong ống nghiệm, là một dấu mốc quan trọng trong quá trình phát triển của phôi giai đoạn phôi nang. Sự tăng lên của lượng dịch trong khoang phôi nang và số lượng tế bào làm tăng kích thước của phôi, kết quả làm màng zona mỏng đi. Cuối cùng, màng zona vỡ giải phóng khối tế bào gọi là sự thoát màng. Số lượng tế bào của phôi nang có thể thay đổi dao động trong khoảng 24 đến 322 tế bào (Hardarson và cs., 2003) và thường được phản ánh qua hình thái phôi nang. Quá trình phát triển của phôi từ giai đoạn xảy ra sự nén chặt của các tế bào đến giai đoạn có cấu trúc cao hơn là phôi nang vẫn chưa được hiểu rõ hoàn toàn. Tuy nhiên, bằng cách nào đó mà các tế bào nằm ở phần rìa ngoài phôi nang san phẳng ra và liên kết chặt chẽ với các tế bào lân cận, tạo ra một rào chắn giữa bên ngoài và bên trong của phôi,

một điều kiện tiên quyết để hình thành phôi nang. Quá trình hình thành khoang phôi nang là nhờ sự hoạt động của kênh xuyên màng Na/K-ATPase của các tế bào ở giai đoạn phôi dâu. Các kênh này bơm Na^+ và K^+ vào khoang phôi nang làm tăng áp suất thẩm thấu, kết quả là nước thẩm thấu vào khoang phôi nang (Watson và cs., 2004). Điều này làm gia tăng áp lực nước và làm tăng dần kích thước của khoang trong suốt giai đoạn phôi nang.

Thời gian và độ nở rộng của phôi nang được thể hiện trong một số nghiên cứu được cho là yếu tố quan trọng quyết định khả năng làm tổ của phôi (Shapiro và cs., 2008; Ahlstrom và cs., 2011).

Theo hệ thống đánh giá của Gardner và Schoolscraft (1999) phân tích độ nở rộng của khoang phôi được chia thành 6 nhóm (1-6):



Hình 1. Độ nở rộng của khoang phôi

Độ 1: Early blastocyst: thể tích khoang phôi $<1/2$ thể tích của phôi

Độ 2: Blastocyst: thể tích khoang phôi $>1/2$ thể tích của phôi

Độ 3: Blastocyst hoàn toàn: khoang phôi hoàn toàn lấp đầy thể tích của phôi

Độ 4: Blastocyst nở rộng: khoang phôi nở rộng với màng trong suốt mỏng dần

Độ 5: Blastocyst đang thoát màng

Độ 6: Blastocyst đã thoát màng

Hình thái ICM

Khi phôi nang đạt được độ nở rộng độ 3 hoặc cao hơn thì có thể dễ dàng quan sát 2 quần thể tế bào mới hình thành. Phần tế bào ở bên ngoài phôi giúp định hình cấu trúc phôi nang được gọi là lớp tế bào lá nuôi phôi TE, phần tế bào còn lại nằm bên trong khoang phôi nang thường tạo thành một cụm tế bào ở một cực của phôi nang được gọi là khối tế bào ICM sẽ phát triển thành phôi thai. Hình thái ICM có sự dao động rất lớn phụ thuộc vào độ nén chặt của các tế bào. Theo đó, hình thái ICM được phân thành 3 loại (Gardner và Schoolcraft, 1999; Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Theo hệ thống đánh giá của Gardner và Schoolcraft (1999) cho thấy ICM có chất lượng tốt nhất (A) chứa nhiều tế bào được nén chặt với nhau, ICM chất lượng trung bình (B) có số lượng tế bào ít hơn và liên kết lỏng lẻo, ICM có chất lượng xấu nhất (C) có rất ít tế bào liên kết lỏng lẻo. Sự thay đổi về số lượng các tế bào liên kết với nhau trong khối ICM ảnh hưởng đến hình dạng của ICM, một vài nghiên cứu đã chứng tỏ rằng giữa hình thái ICM và kết quả lâm sàng có mối tương quan tích cực với nhau, giả thuyết đưa ra rằng khối ICM càng lớn cho khả năng làm tổ càng cao.

ICM có nhiều hình dạng, tuy nhiên hình dạng tối ưu của ICM liên quan đến tiềm năng làm tổ của phôi là hình bầu dục hơn là các dạng tròn hay dài (Richter và cs., 2001). Hình dạng ICM phản ánh số lượng tế bào tương đương, một số hình dạng khác của ICM như: hình nấm, hình sao, hình lưới liềm. Tuy nhiên tiềm năng làm tổ của các hình dạng này hiện tại vẫn chưa được hiểu rõ.

Một số quan sát cho thấy thỉnh thoảng có sự xuất hiện của 2 khối ICM riêng biệt trong cùng 1 phôi nang. Theo báo cáo của Chida (2000) thì tỉ lệ xuất hiện một ICM đôi ở phôi chuột được thụ tinh trong ống nghiệm là 3,1%. Họ phát hiện ra rằng tần số xuất hiện ICM đôi trong thụ tinh trong ống nghiệm cao hơn thụ tinh tự nhiên là 0,6%. Do đó, có thể đưa ra giả thuyết rằng thụ tinh trong ống nghiệm có thể ảnh hưởng đến tỉ lệ hình thành ICM đôi và tương quan đến tỉ lệ sinh đôi cùng trứng.

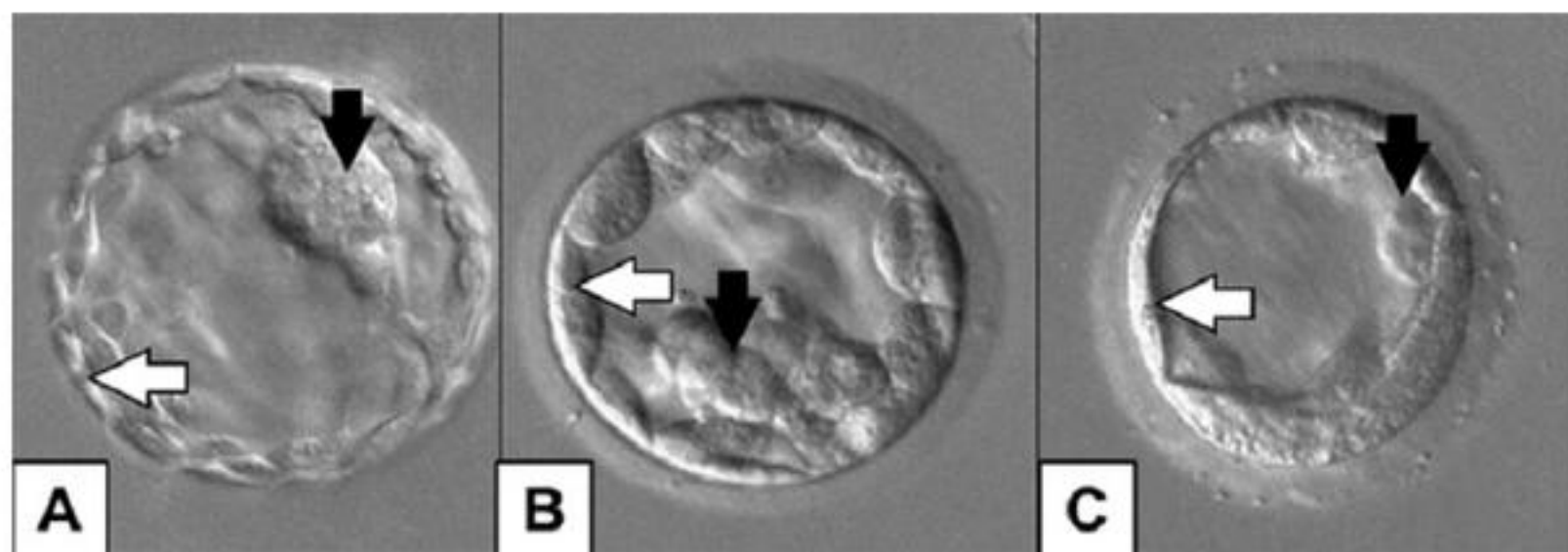
Hình thái TE

Tương tự như khối ICM lớp tế bào TE có thể được phân biệt rõ ràng khi phôi đã nở rộng (độ 3 hoặc cao hơn). Vai trò của các tế bào TE chưa rõ ràng trong giai đoạn đầu phát triển của phôi nang, trong giai đoạn hình thành khoang phôi nang TE đóng vai trò tạo ra chất lỏng chứa đầy khoang phôi nang. Vai trò của TE thể hiện rõ ở giai đoạn làm tổ của phôi giúp phôi bám dính và ăn sâu vào lớp nội mạc tử cung.

Các tế bào TE cũng sản xuất ra một số phân tử hỗ trợ quá trình làm tổ (Aplin, 2000). Nếu không nhờ vào chức năng phá vỡ màng ZP của lớp tế bào TE thì quá trình thoát màng của phôi không diễn ra (Sathananthan và cs., 2003). Ở giai đoạn sau của phôi thai, các tế bào TE phát triển thành màng ối và nhau thai.

Theo hệ thống đánh giá của Gardner và Schoolcraft (1999), cách phân loại lớp TE tương tự như đánh giá khối ICM. Dựa vào số lượng tế bào và khả năng gắn kết chia thành 3 cấp độ khác nhau (A-C). Tốt nhất là độ A, chứa nhiều tế bào gắn kết với nhau hình thành biểu mô. Trung bình là độ B, chứa số lượng tế bào ít hơn tạo thành lớp biểu mô mỏng. Xấu nhất là độ C, số lượng các tế bào rất ít, các tế bào có kích thước lớn và cố liên kết lỏng lẻo. Một số nghiên cứu cho thấy chất lượng TE có mối liên hệ với khả năng làm tổ của phôi (Zaninovic và cs., 2001; Ahlstrom và cs., 2011). Tuy nhiên một số nghiên cứu khác lại cho thấy không có mối liên hệ giữa khả năng làm tổ của phôi và chất lượng TE (Richter và cs., 2001).

Với hệ thống đánh giá của Gardner, chuyển phôi blastocyst có độ phát triển là 3AA sẽ đạt tỉ lệ thai trên 60%.



Hình 2. Đánh giá ICM (mũi tên đen) và TE (mũi tên trắng)

Sự thoái hóa tế bào phôi nang

Tế bào chết có thể do hoại tử hoặc chết, hai quá trình trên có hình dạng và dấu hiệu nhận biết khác nhau. Hoại tử có thể do tế bào bị trương nước và màng tế bào bị vỡ không thể phục hồi (Wyllie, 1980). Tế bào thường chết theo chu trình, đặc trưng bởi sự co rút tế bào và liên quan đến hoạt động tổng hợp nhiễm sắc chất, hạt nhân bị phân mảnh, tế bào phồng lên chứa các phân mảnh bên trong (Hardy, 1997; Hardy, 1999).

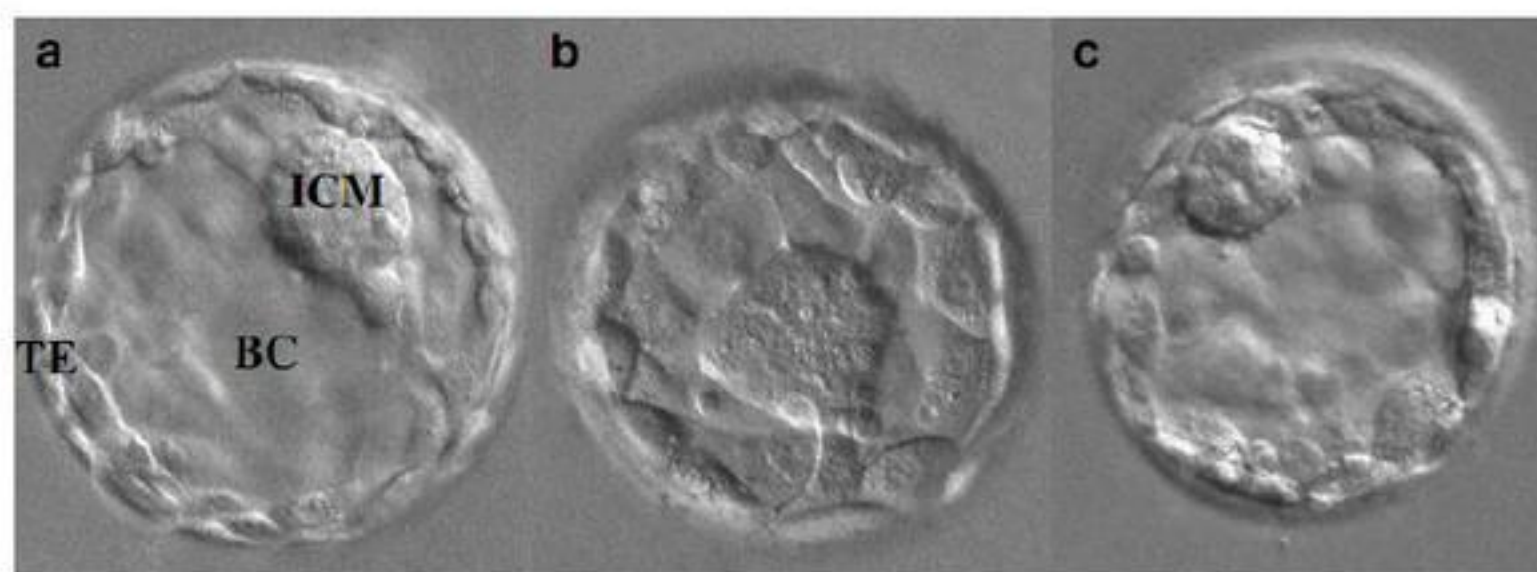
Hardy và cộng sự (1989) nghiên cứu trên những phôi nang dư cho thấy có sự khác biệt về hạt nhân giữa tế bào ICM và TE, tỉ lệ tế bào chết ở 2 nhóm tế bào ICM và TE không có sự khác biệt, và tỉ lệ này tăng lên vào ngày 7 trong môi trường nuôi cấy

phôi nang. Phần trăm tế bào chết vào ngày 5 và 6 là 10%, đối với những phôi nang có chất lượng tốt; nhưng tăng lên 26-38,5% vào ngày 6, đối với những phôi nang có hình dạng bất thường và phôi nang đa thụ tinh. Các tế bào chết trong phôi có thể được loại bỏ nhờ quá trình thực bào.

Các mảnh vỡ tế bào phát sinh trong suốt quá trình phát triển của phôi nang giai đoạn tiền làm tổ thường được cô lập ở khoảng không PVS, có thể dễ dàng quan sát được. Tuy nhiên, thay vì bị cô lập ở khoảng không PVS thì các mảnh vỡ này xuất hiện ở khoang phôi nang.

Theo nghiên cứu của Kovacic và cộng sự (2004), tỉ lệ sinh sống của những phôi nang chất lượng tốt là 45,2% và giảm dần đối với những phôi nang sau: phôi nang có tế bào chất bị phân mảnh và hoại tử TE (32,8%), phôi nang có tối đa 20% phôi bào bị loại bỏ (16,7%), hoại tử TE và ICM (7,7%) và cuối cùng những phôi nang rất nhỏ có nhiều hơn 20% phôi bào bị loại bỏ (1,2%).

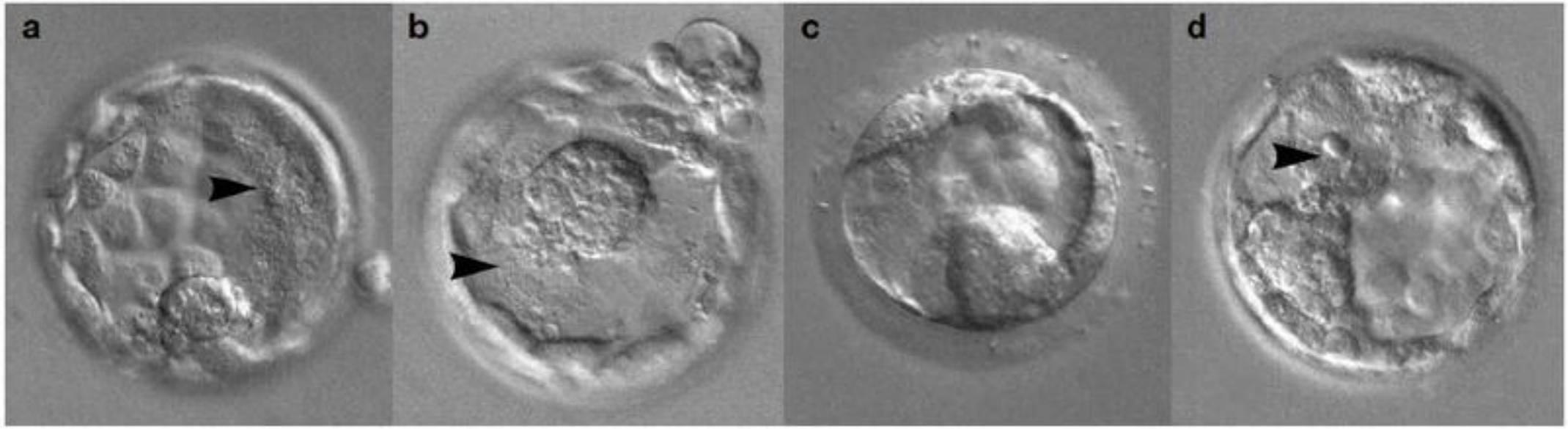
Nhìn chung, với hệ thống đánh giá phôi nang được miêu tả cho thấy thường tập trung vào việc xác định phôi nang tối ưu. Có ít dữ liệu đánh giá về hình thái phôi nang không tối ưu và tiềm năng phát triển của nó, mặc dù ở nhiều chu kỳ điều trị thường gặp phôi nang có chất lượng không tốt.



Hình 3. Phôi nang tối ưu (a-c)

(Nguồn: Kovacic và cs., 2004)

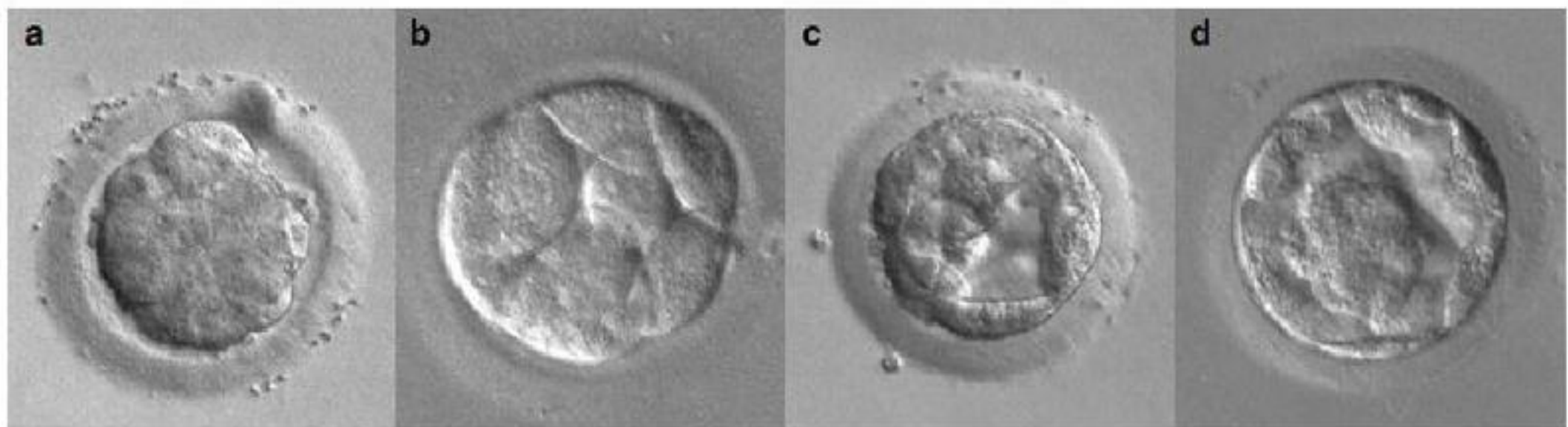
Phôi nang tối ưu: khoang phôi nở rộng, trong đó thể tích khoang phôi hoàn toàn đầy phôi. ICM hình tròn hoặc bầu dục, với nhiều tế bào liên kết chặt chẽ. Các lớp tế bào TE tạo thành một biểu mô gắn kết.



Hình 4. Phôi nang không tối ưu ở hình thái TE: phôi nang có khoang phôi nở rộng, ICM bình thường có dạng hình bầu dục nhưng xuất hiện ổ hoại tử (mũi tên) trong TE (a, b), hoặc hoàn toàn hoại tử TE (c), hoặc với các mảnh vỡ (mũi tên) giữa các tế bào TE (d)

(Nguồn: Kovacic và cs., 2004)

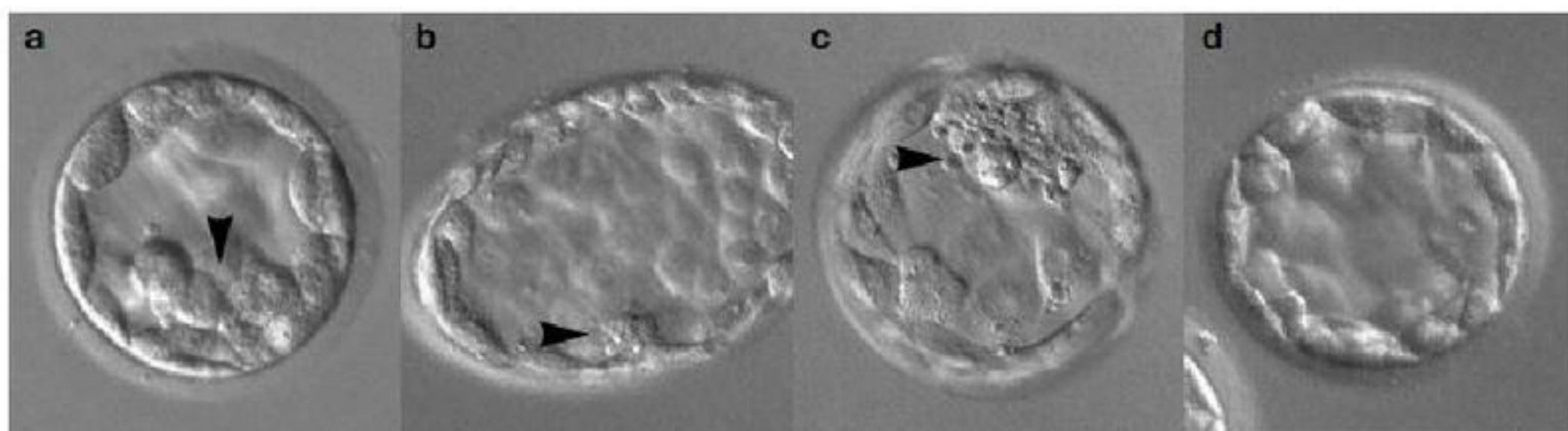
Dạng phôi nang có khoang phôi nở rộng, ICM tối ưu, như mô tả ở trên, nhưng không tối ưu TE: không có tế bào TE xếp lớp được nhìn thấy ở vành khoang phôi, chỉ có một đường thẳng, đánh giá là phôi nang với TE không tối ưu.



Hình 5. Morula và phôi nang sớm: morulae (a) hoặc phôi nang sớm chưa giãn nở với bắt đầu tạo khoang (b-d)

(Nguồn: Kovacic và cs., 2004)





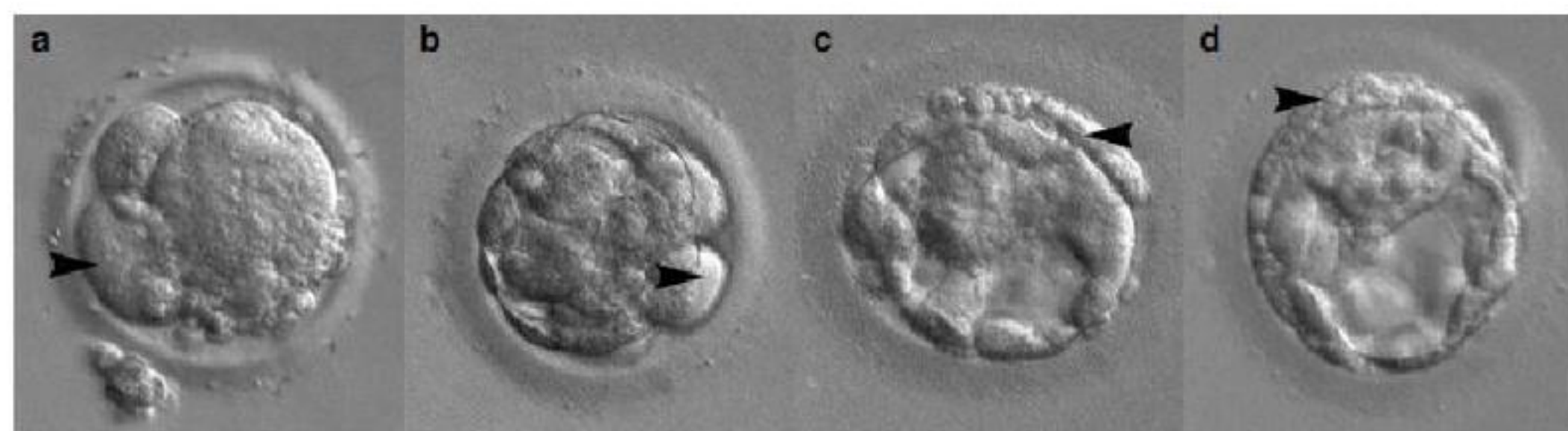
Hình 6. Phôi nang với ICM không tối ưu: phôi nang nở rộng với TE bình thường nhưng có ICM phân mảnh (a), nhỏ (b), hoại tử (c) hoặc không có ICM (d)

(Nguồn: Kovacic và cs., 2004)



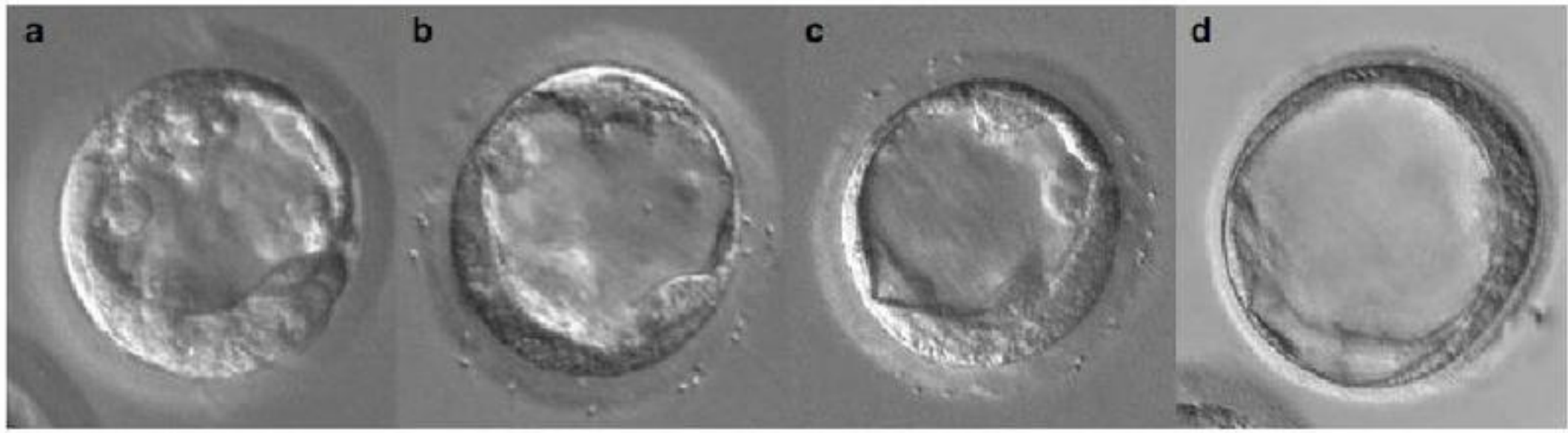
Hình 7. Phôi nang không tối ưu với ICM và TE: phôi nang có khoang phôi nở rộng với phân mảnh ICM và với mảnh vỡ trong TE (a-d)

(Nguồn: Kovacic và cs., 2004)



Hình 8. Morula hoặc phôi nang sớm: có đến 20% phôi bào hoặc mảnh vỡ được đẩy vào trong khoang quanh noãn

(Nguồn: Kovacic và cs., 2004)



Hình 9. Phôi nang hoại tử: phôi nang có khoang phôi chưa giãn nở hoặc nở rộng mà không có ICM, đại diện là một vùng rộng lớn hoại tử (a-d).

Cấu trúc trung tâm chứa đầy chất lỏng có thể là một khoang phôi hoặc không bào

(Nguồn: Kovacic và cs., 2004)

Các dạng hình thái khác

Không bào

Không bào có thể phát sinh trong quá trình nuôi cấy in vitro của phôi thai người bất cứ lúc nào của giai đoạn phát triển. Không bào đầu tiên phát hiện vào ngày 4 có tác động nghiêm trọng nhất đến sự phát triển phôi nang. Không bào xuất hiện trong giai đoạn phân chia có thể không được quan sát thấy trong giai đoạn phôi nang, hoặc có thể chỉ phát hiện trong các tế bào loại bỏ. Không bào khi được tìm thấy trong túi phôi xuất hiện thường xuyên trong TE hơn trong ICM (Ebner và cs., 2005).

Có hơn một vị trí thoát màng

Một phát hiện hiếm hoi trong phôi nang được đánh giá là sự xuất hiện của hai hay nhiều vị trí thoát màng (Fong và cs., 2001). Nguyên nhân có thể trong quá trình ICSI tạo phôi, màng zona không được đóng hoàn toàn trong quá trình tiêm tinh trùng (Fong và cs., 1997). Phôi thoát màng ở nhiều hơn một điểm trên ZP, đặc biệt khi một trong các lỗ là rất nhỏ có thể dẫn đến phôi nang không thể thoát màng hoàn toàn, khi áp lực trong phôi khoang không đủ mạnh và không tập trung ở một vị trí thoát màng.



KẾT LUẬN

Tỉ lệ thành công của chuyển phôi chủ yếu phụ thuộc vào khả năng lựa chọn phôi tốt nhất từ những phôi có sẵn. Việc lựa chọn phôi thực hiện dễ dàng giữa các phôi nang hơn so với lựa chọn phôi ở giai đoạn đầu của phôi phân chia. Tuy nhiên, để đánh giá được chất lượng phôi nang cần đánh giá dựa trên 3 tiêu chuẩn là độ nở rộng của khoang phôi, hình thái ICM và TE.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahlstrom A, Westin C, Reisner E, Wikland M, Hardarson T (2011). Trophoctoderm morphology: an important parameter for predicting pregnancy and birth after single blastocyst transfer. *Hum Reprod*; 26:3289-3296.
2. 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. *Hum Reprod*; 26:1270-1283.
3. Aplin JD (2000). The cell biological basis of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*; 14:757-764.
4. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R (2000). Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertility and Sterility*; 74:282-287.
5. Chida S (2000). Monozygous double inner cell masses in mouse blastocysts following fertilization in vitro and in vivo. *J In Vitro Fert Embryo Transf*; 7:177-179.
6. Dokras A, Sargent IL, Barlow DH (1993). Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential. *Human Reproduction*; 8(12):2119-2127.
7. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, Tews G (2005). Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertil Steril*; 83:1635-1640.
8. Fong CY, Bongso A, Ng SC, Anandakumar C, Trounson A, Ratnam S (1997). Ongoing normal pregnancy after transfer of zona-free blastocysts: implications for embryo transfer in the human. *Hum Reprod*; 12:557-560.
9. Fong CY, Bongso A, Santhanathan H, Ho J, Ng CS (2001). Ultrastructural observations of enzymatically treated human blastocysts: zona-free blastocyst transfer and rescue of blastocysts with hatching difficulties. *Hum Reprod*; 16:540-546.

10. Gardner DK, Schoolcraft WB (1999). In vitro culture of human blastocysts. In: Jansen R, Mortimer D (eds). *Toward Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond 1999*. UK: Parthenon Publishing London. P378-388.
11. Hardarson T, Caisander G, Sjogren A, Hanson C, Hamberger L, Lundin K (2003). A morphological and chromosomal study of blastocysts developing from morphologically suboptimal human pre-embryos compared to control blastocysts. *Hum Reprod*; 18:399-407.
12. Hardy K (1997). Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod*; 3:919-925.
13. Hardy K (1999). Apoptosis in the human embryo. *Rev Reprod*; 4:125-134.
14. Hardy K, Handyside AH, Winston R (1989). The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development*; 107:597-604.
15. Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M, Cizek – Sajko M (2004). Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reproduction Biomedicine Online*; 8:687-694.
16. Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapino BS (2001). Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril*; 76(6):1157-1167.
17. Sathananthan H, Menezes J, Gunasheela S (2003). Mechanics of human blastocyst hatching in vitro. *Reprod BioMed Online*; 7(2):228-234.
18. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Thomas S (2008). Large blastocyst diameter, early blastulation, and low preovulatory serum progesterone are dominant predictors of clinical pregnancy in fresh autologous cycles. *Fertil Steril*; 90(2):302-309.
19. Shoukir Y, Chardonens D, Campana A, Bischof P, Sakkas D. (1998). The rate of development and time of transfer play different roles in influencing the viability of human blastocysts. *Human Reproduction*; 13:676-681.
20. The Cochrane Collaboration. 2012.
21. Watson AJ, Natale DR, Bacroft LC (2004). Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim Reprod Sci*; 82-83:583-592.
22. Wyllie AH (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*; 284:555-556.
23. Yoon HJ, Yoon SH, Son WY, Im KS, Lim JH (2001). High implantation and pregnancy rates with transfer of human hatching day 6 blastocysts. *Fertility and Sterility*; 75(4):832-833.
24. Zaninovic N, Berrios R, Clarke RN, Bordine R, Ze Y, Veeck LL (2001). Blastocyst expansion, inner cell mass (ICM) formation, and trophectoderm (TM) quality: is one more important for implantation? *Fertil Steril*; 76(3):S8.



ĐỒNG THUẬN CỦA VSRM VỀ “ĐÁNH GIÁ VÀ PHÂN LOẠI NOÃN, PHÔI TRONG HỖ TRỢ SINH SẢN”

VSRM



BLASTOCYST CULTURE AND TRANSFER IMPROVES IVF OUTCOME

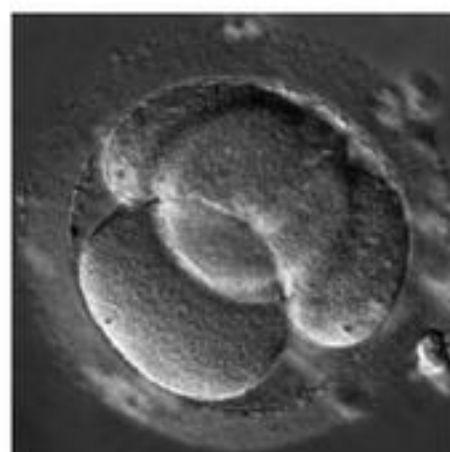
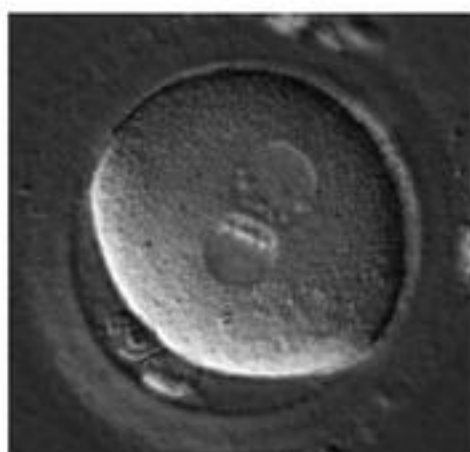
Liow Swee Lian DVM, PhD
Sincere IVF Center
Novena Specialist Center
Singapore

1

INTRODUCTION

Culture of human preimplantation embryos

- Early IVF days, embryos were cultured from zygote to day 2 (4-cell) or day 3 (8-cell) embryo stage



Zygote (2PN-stage)

4-cell stage (Day 2)

8-cell stage (Day 3)

2



INTRODUCTION

- More physiological laboratory procedures and culture systems have significantly improved implantation rates.
- Transfer of more than a single embryo in an IVF cycle now presents a high probability of a multiple gestation.
- Single embryo transfer (SET) is mandatory in some countries.
- In most countries, not more than 2 embryos are transferred.

3



Embryo selection

One of the major challenges for embryologists:

- Selection of embryos with the highest potential to implant

Current methods of embryo selection are based on detailed morphological parameters at different stages of development.

4

Implantation failure

- >70% of IVF embryos fail to implant (Patrizio & Sakkas, 2009)
 - i. absence of developmentally competent embryos in an IVF cohort
 - ii. our inability to select competent embryo(s) for transfer

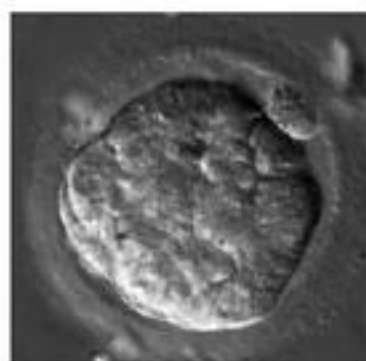
5

INTRODUCTION

- Late 1990s, advanced culture media permit extended culture of zygote to blastocyst:
 - To select more robust embryos for ET
 - Higher implantation rate
 - Reduce multiple gestation
 - Culture of PGD-embryos to blastocysts
 - Generation of embryonic stem cells



8-cell stage (Day 3)



Morula (Day 4)



Blastocyst (Day 5)

6



Extended culture of zygote to blastocyst

Three protocols:

1. Non renewal single medium protocol

Uninterrupted culture using one medium throughout the 5 days of culture.

2. Renewal single medium protocol

Interrupted culture where one medium is used throughout but is renewed on the third day of culture.

3. Sequential media protocol

Interrupted culture where two media of different composition are used sequentially.

7

JUSTIFICATIONS FOR SEQUENTIAL MEDIA

1. The changing energy requirements of the preimplantation embryo and the inhibitory effect of glucose on early cleavage stage embryos.
2. The inhibitory effect of EDTA on blastocyst development and the inner cell mass (ICM).
3. The chemical breakdown of L-glutamine(Gln) in aqueous solution and the accumulation of ammonia and its effects on embryo development.
4. The role of amino acids on preimplantation embryo development.

8

BLASTOCYST GRADING SYSTEM



- Blastocyst development stage
- Inner cell mass score (quality)
- Trophoctoderm score (quality)

9

BLASTOCYST DEVELOPMENT STAGE

Expansion grade	Blastocyst development and stage status
1	Blastocoel cavity less than half the volume of the embryo
2	Blastocoel cavity more than half the volume of the embryo
3	Full blastocyst, cavity completely filling the embryo
4	Expanded blastocyst, cavity larger than the embryo, with thinning of the shell
5	Hatching out of the shell
6	Hatched out of the shell

10



BLASTOCYST GRADING SYSTEM



4AA

Well expanded =4

Inner cell mass =A

Trophectoderm =A



4AB

Well expanded =4

Inner cell mass =A

Trophectoderm =B



4BB

Well expanded =4

Inner cell mass =B

Trophectoderm =B

11

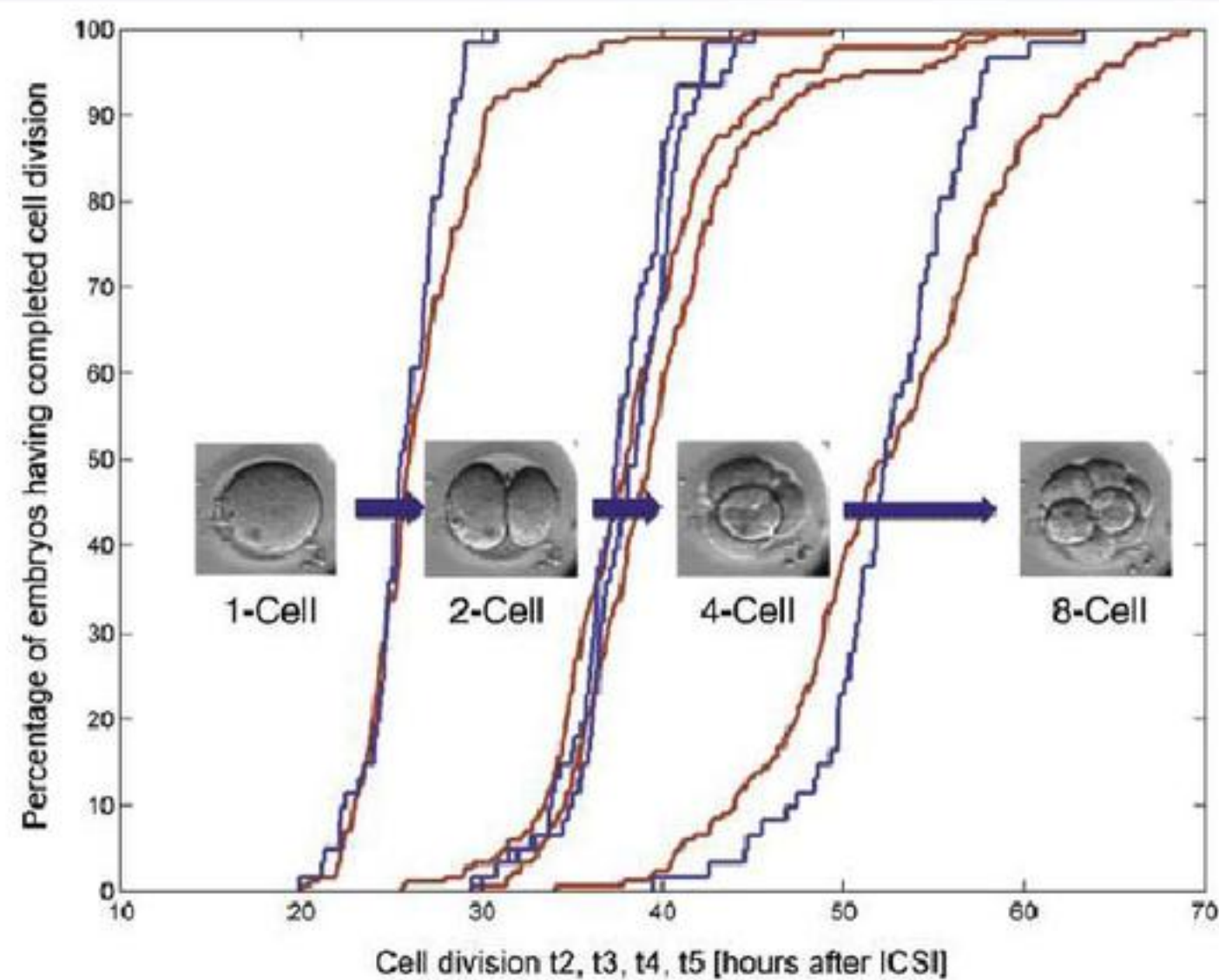
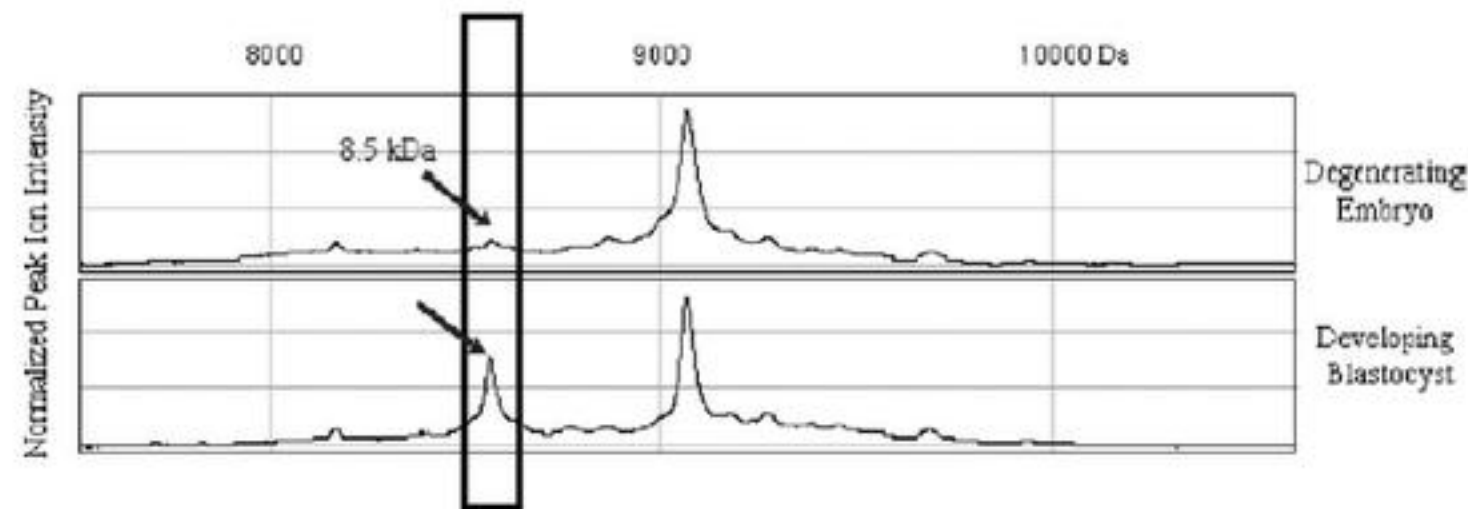


Figure 2 Percentage of embryos having completed a cell division by a given time after insemination. Blue curves represent implanting embryos; red curves represent embryos that did not implant. Four curves of each color represent completion of the four consecutive cell divisions from 1 to 5 cells i.e. t2, t3, t4 and t5.

Non-invasive assessment of embryos

FIGURE 5

The expression of an 8.5-kDa protein biomarker appears to be directly associated with ongoing human blastocyst development. Box highlights differences in expression across morphological different day 5 human embryos. Arrows indicate significant increase of expression in developing blastocyst ($P < 0.05$).



Katz-Jaffe. Mammalian embryo secretome. Fertil Steril 2006.

13

Glucose utilization during different stages of preimplantation embryo in vitro development

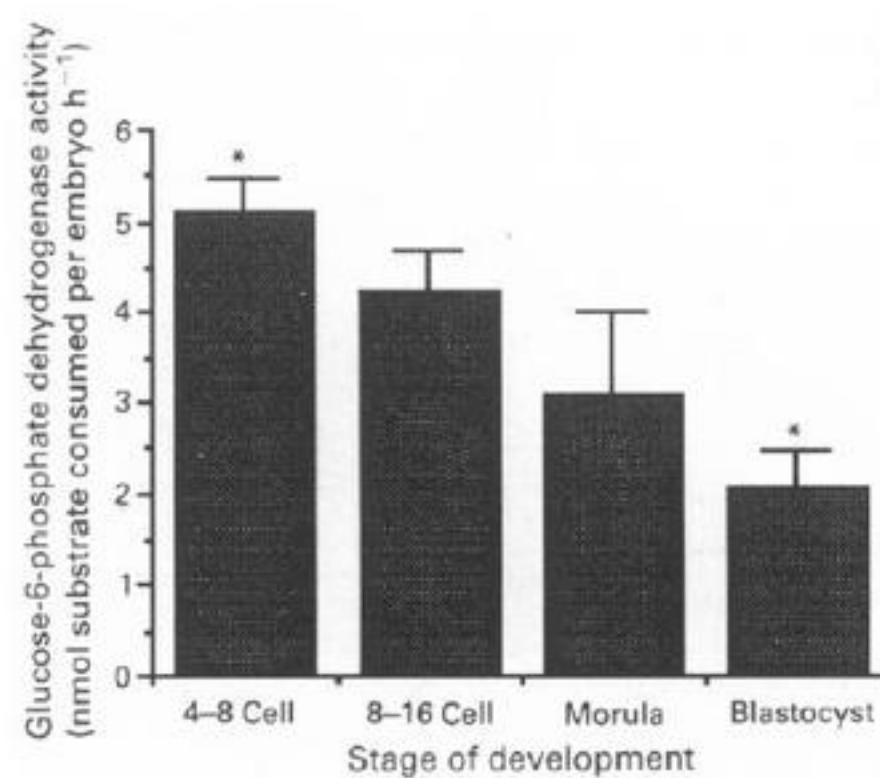


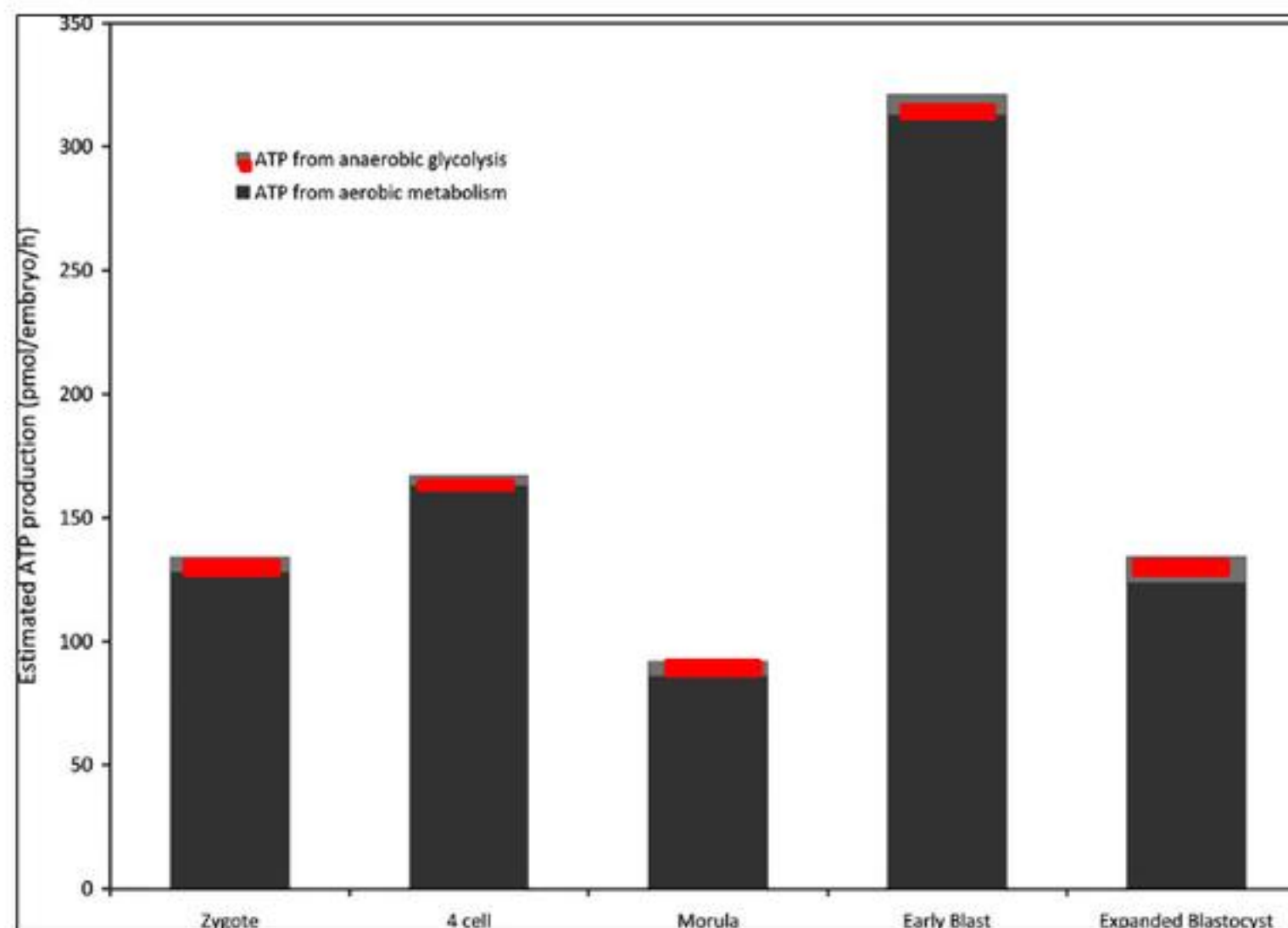
Fig. 5. Variation in activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase with development. Enzyme activities were measured in extracts from single human preimplantation embryos. Values are means of six (range 3–8) determinations for each stage of development and are expressed as nmol substrate consumed per embryo h⁻¹ ± SEM. G6PDH activity fell significantly with development (* $P < 0.001$, one-way analysis of variance).

Martin KL et al. (1993). J Reprod Fertil 99:259-266

14



ATP production in in vitro-derived embryos

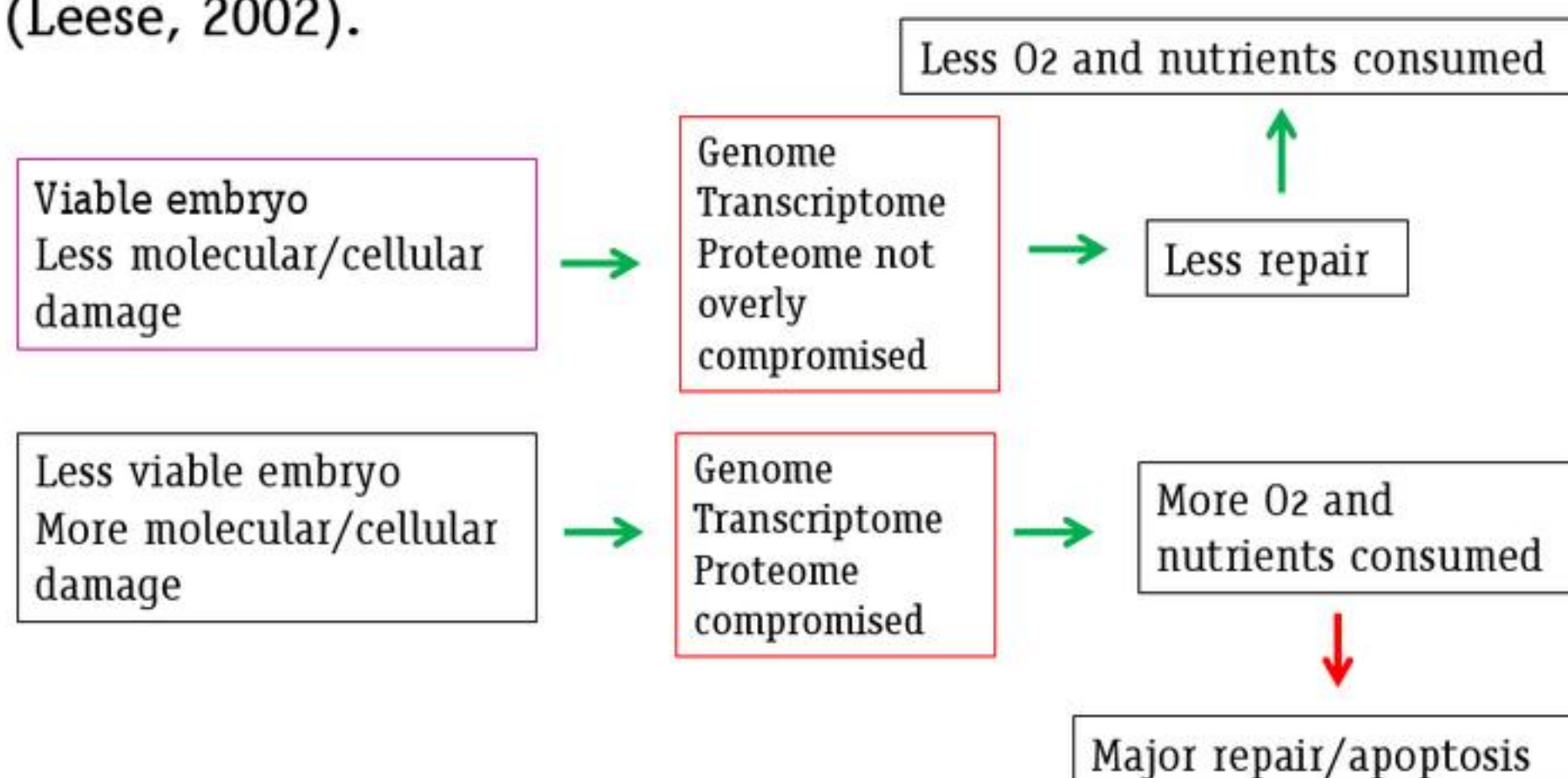


Sturmev and Leese (2003). Reproduction 126:197-204

15

METABOLOMICS

'Quiet embryo hypothesis' proposed that viable embryos have a 'quieter' metabolism than those which arrest (Leese, 2002).

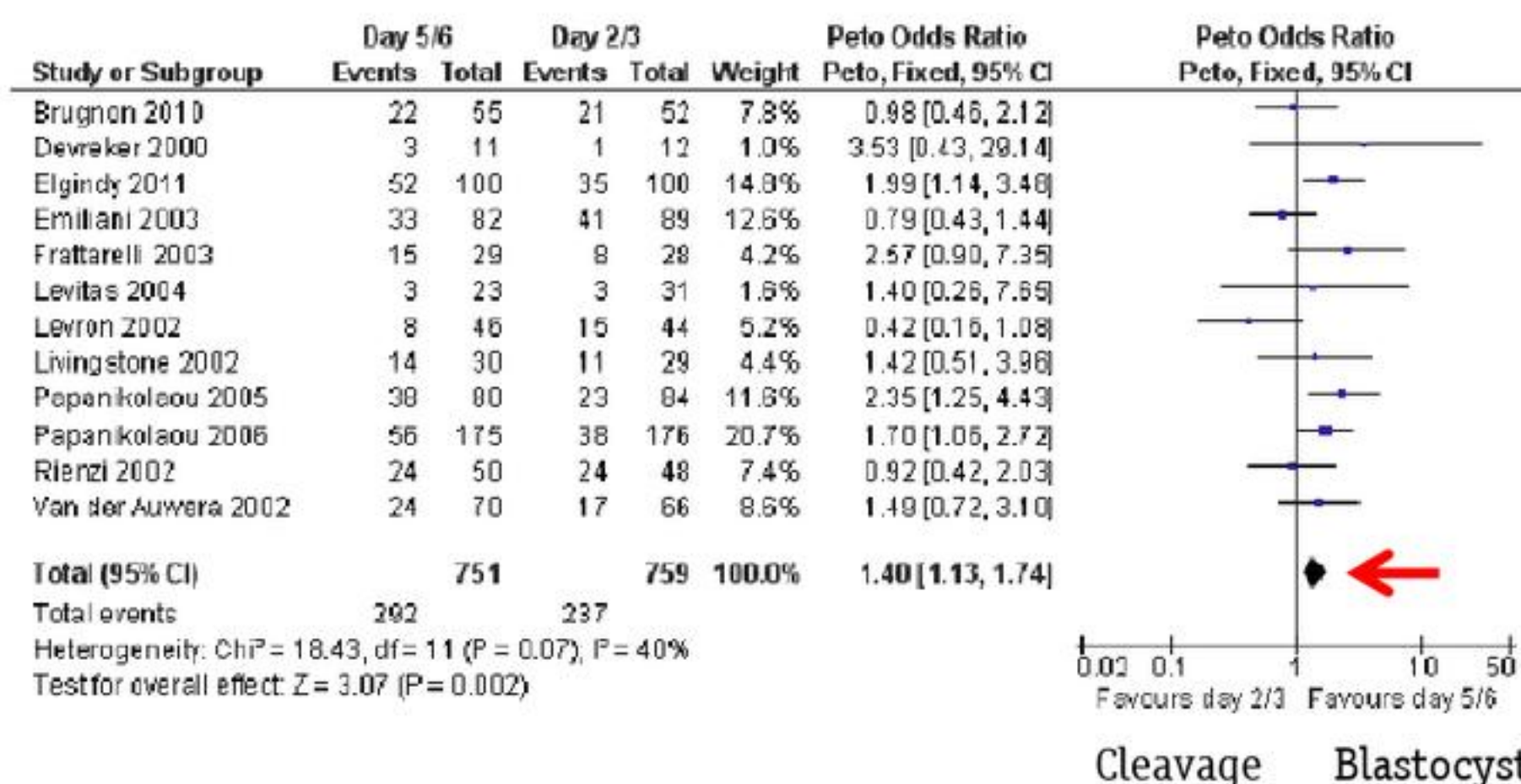


16

Cochrane Review (2012): Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in ART

Live birth rate and Live birth per couple

Figure 3. Forest plot of comparison: 1 Live birth rate, outcome: 1.1 Live birth per couple.

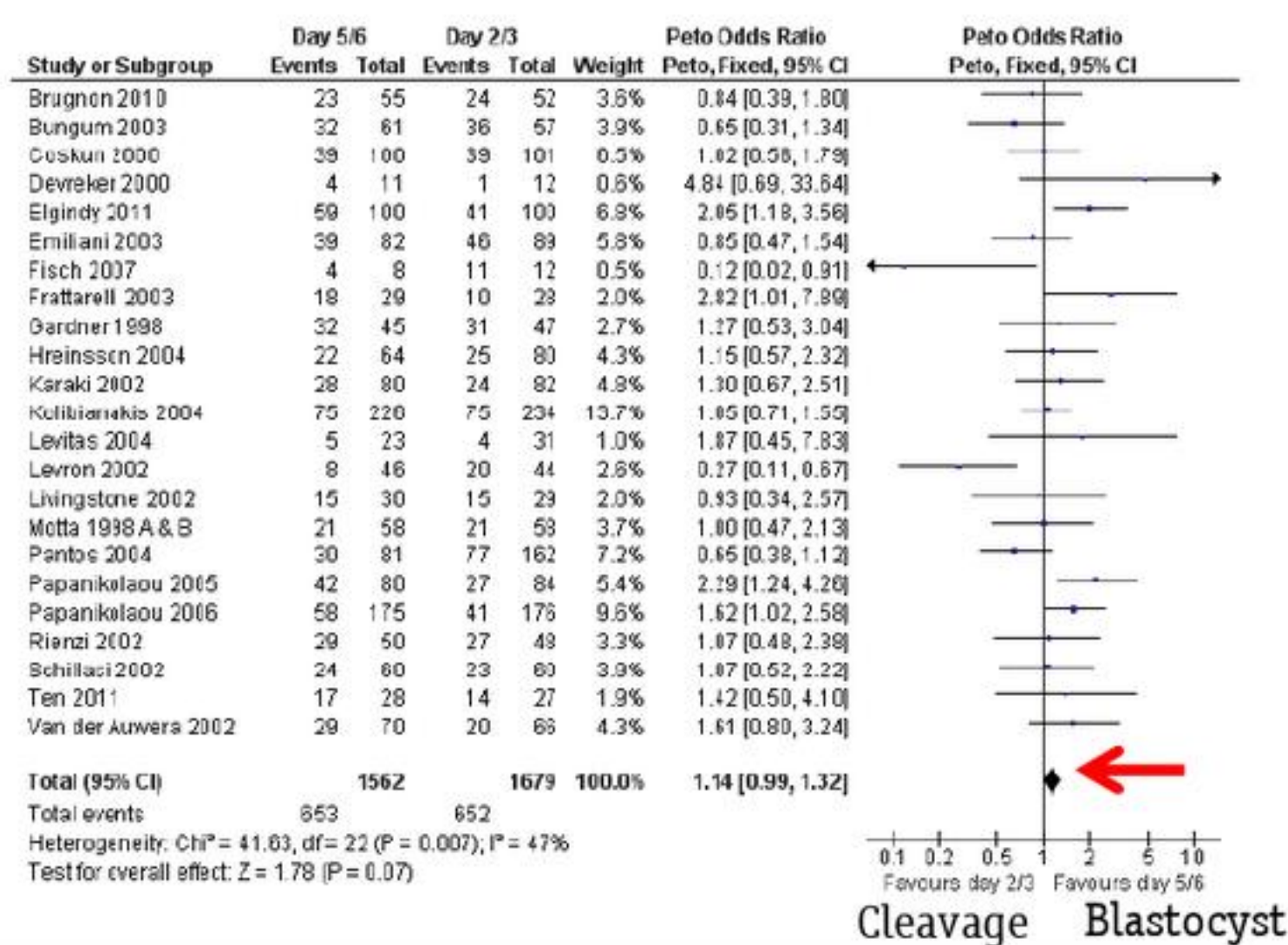


17

Cochrane Review (2012): Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in ART

Clinical pregnancy rate and Clinical pregnancy rate per couple

Figure 4. Forest plot of comparison: 2 Clinical pregnancy rate, outcome: 2.1 clinical pregnancy rate per couple.

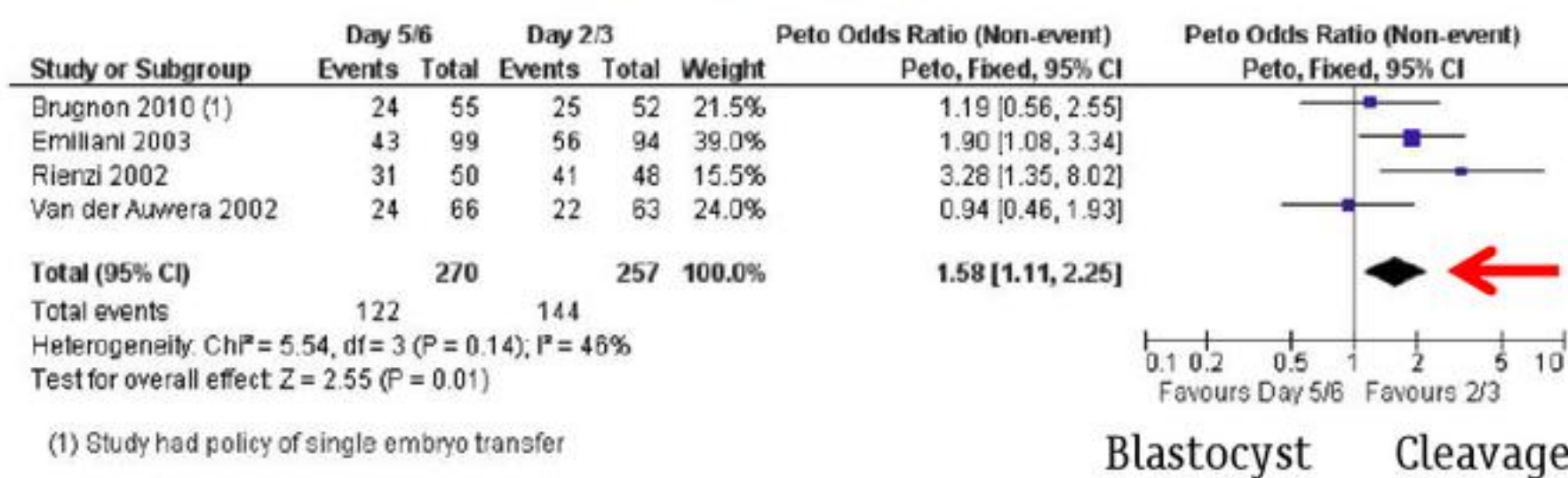


18

Cochrane Review (2012): Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in ART

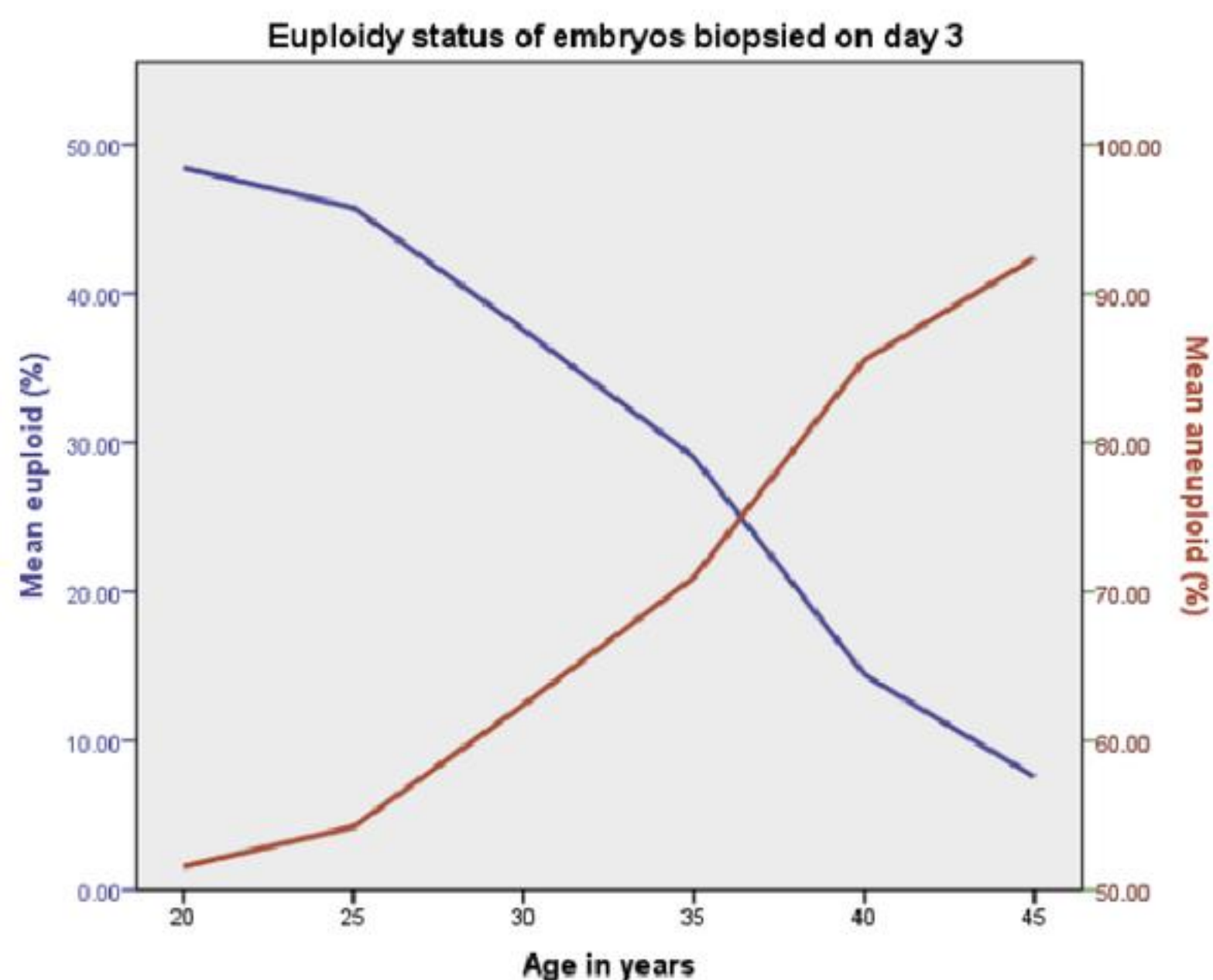
Cumulative pregnancy rate and Cumulative pregnancy rate per couple

Figure 5. Forest plot of comparison: 3 Cumulative pregnancy rate, outcome: 3.1 cumulative pregnancy rate from fresh and frozen transfers.



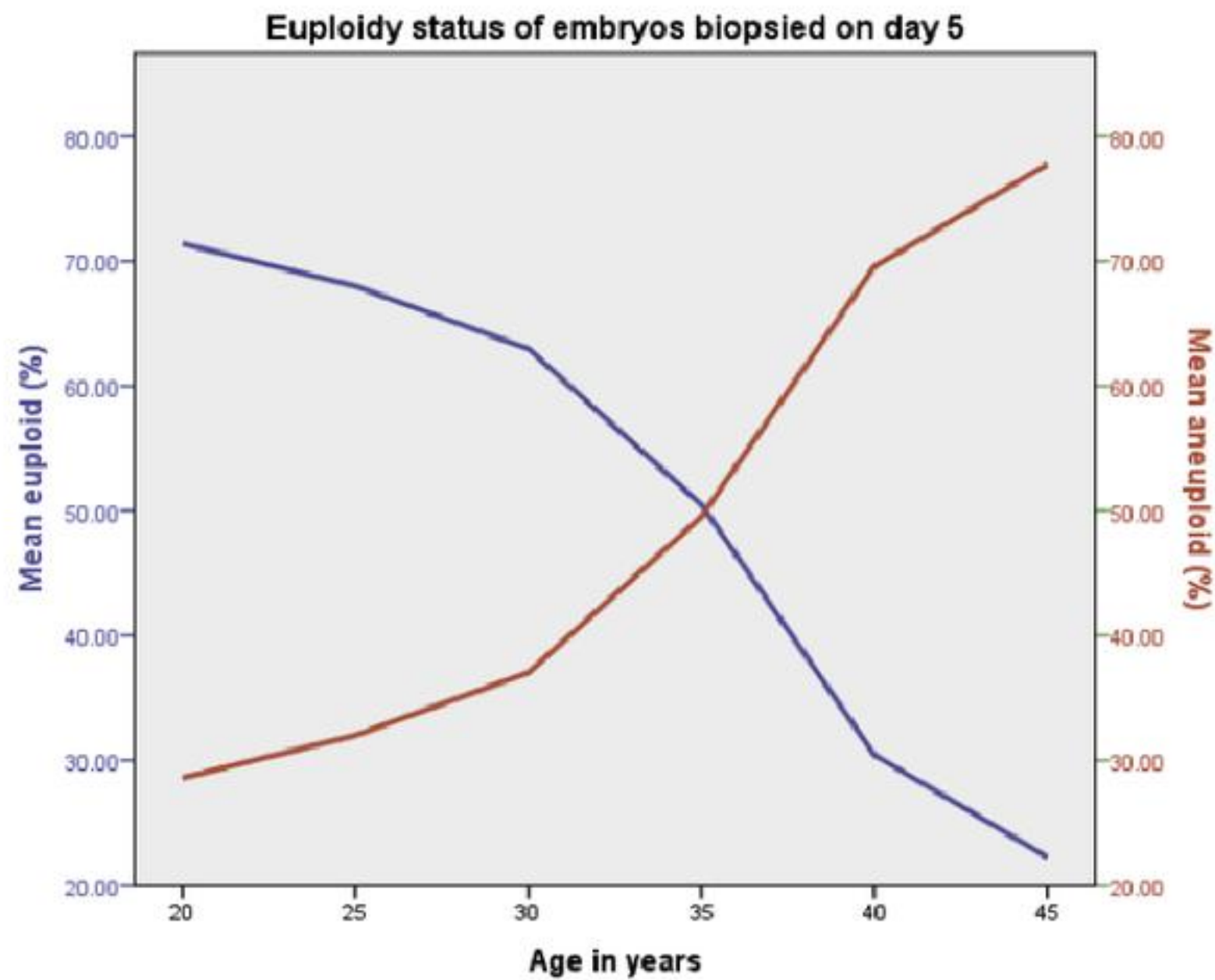
19

Euploidy status of Day 3 embryos



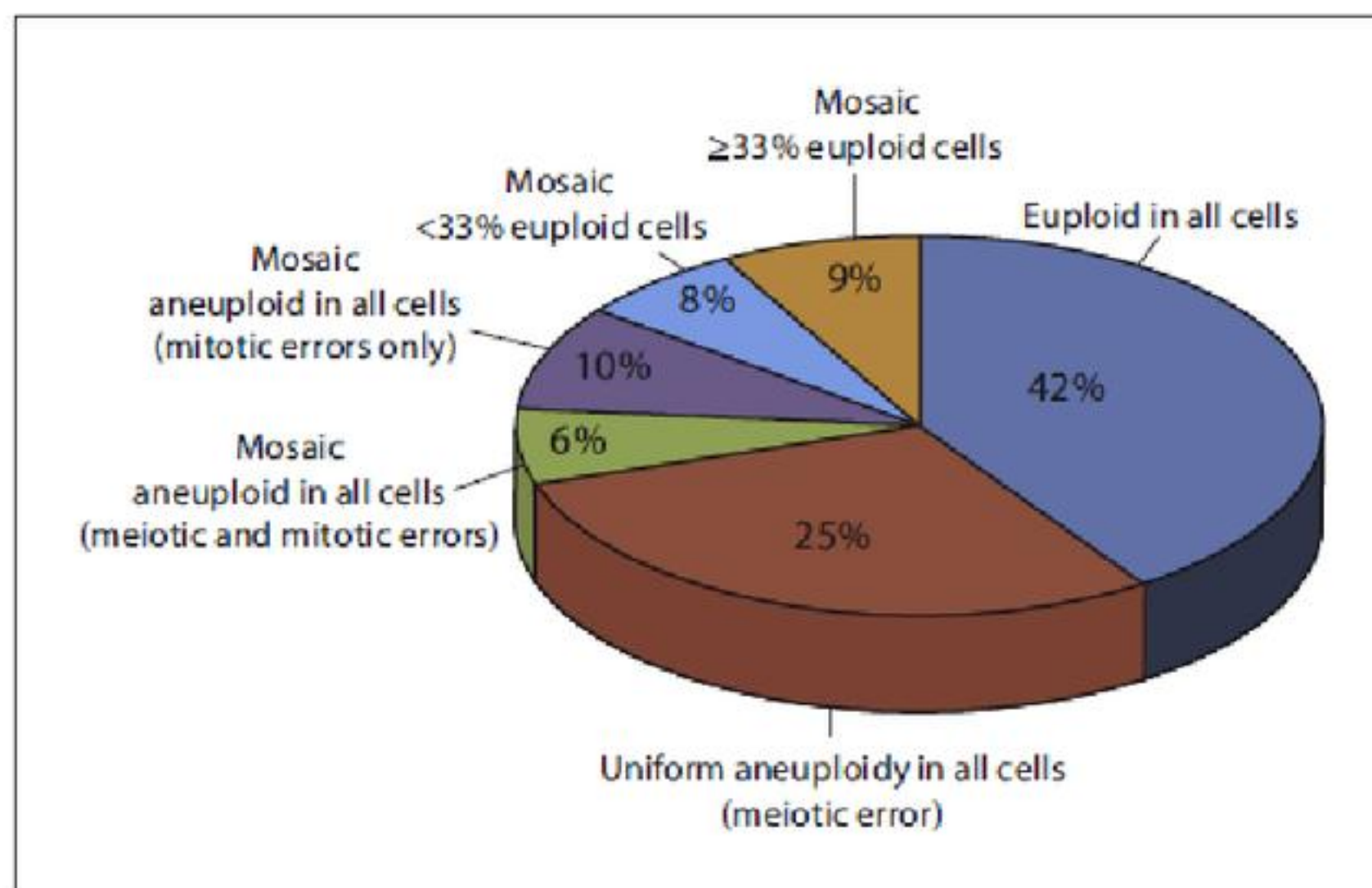
20

Euploidy status of Day 5 embryos



21

Aneuploidy and mosaicism in the human blastocyst

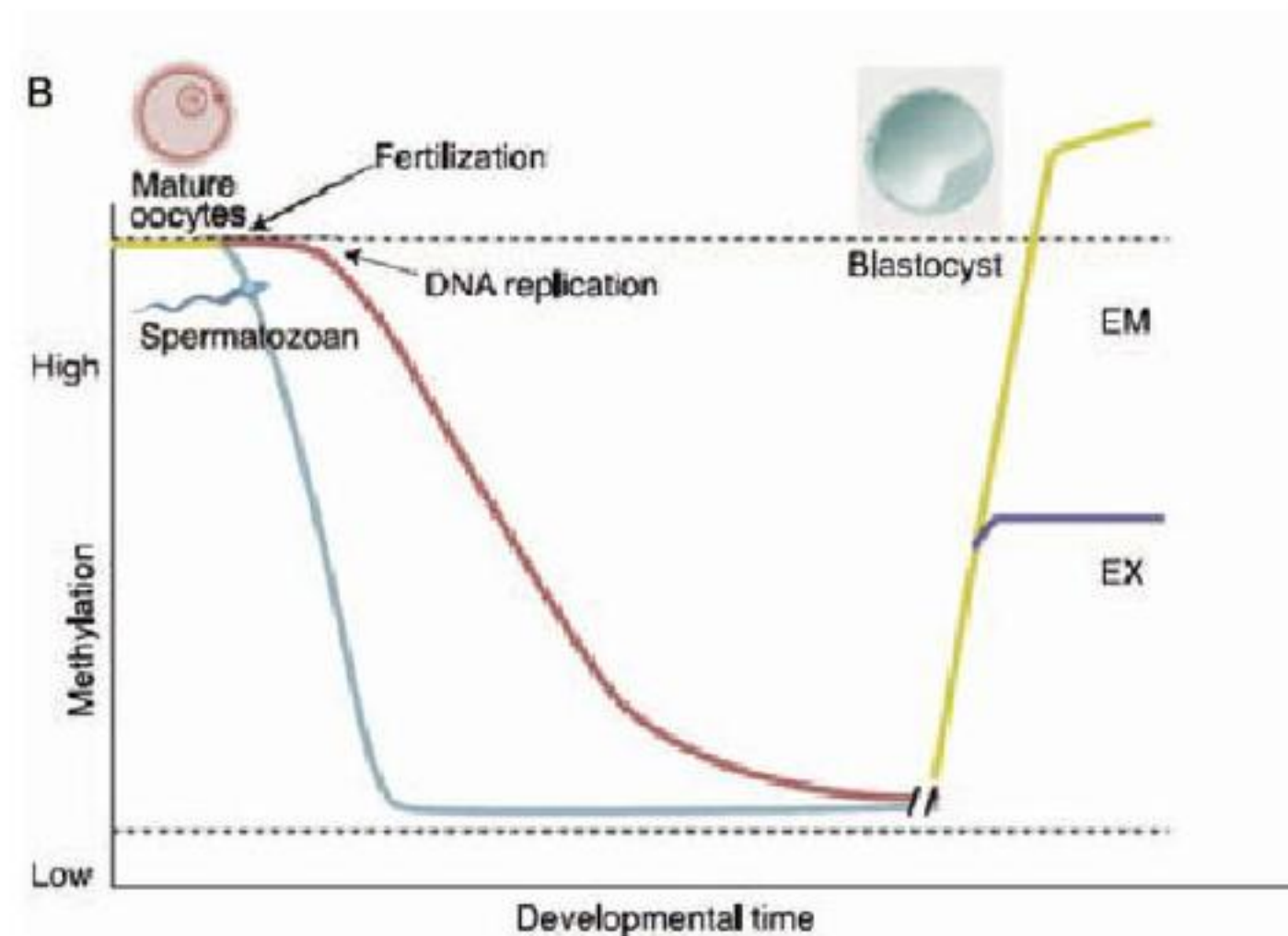


Fragouli and Wells (2011). Cytogenet Genome Res

22



Methylation reprogramming in pre-implantation embryos



Reik et al. (2001). Science, 293:10891093

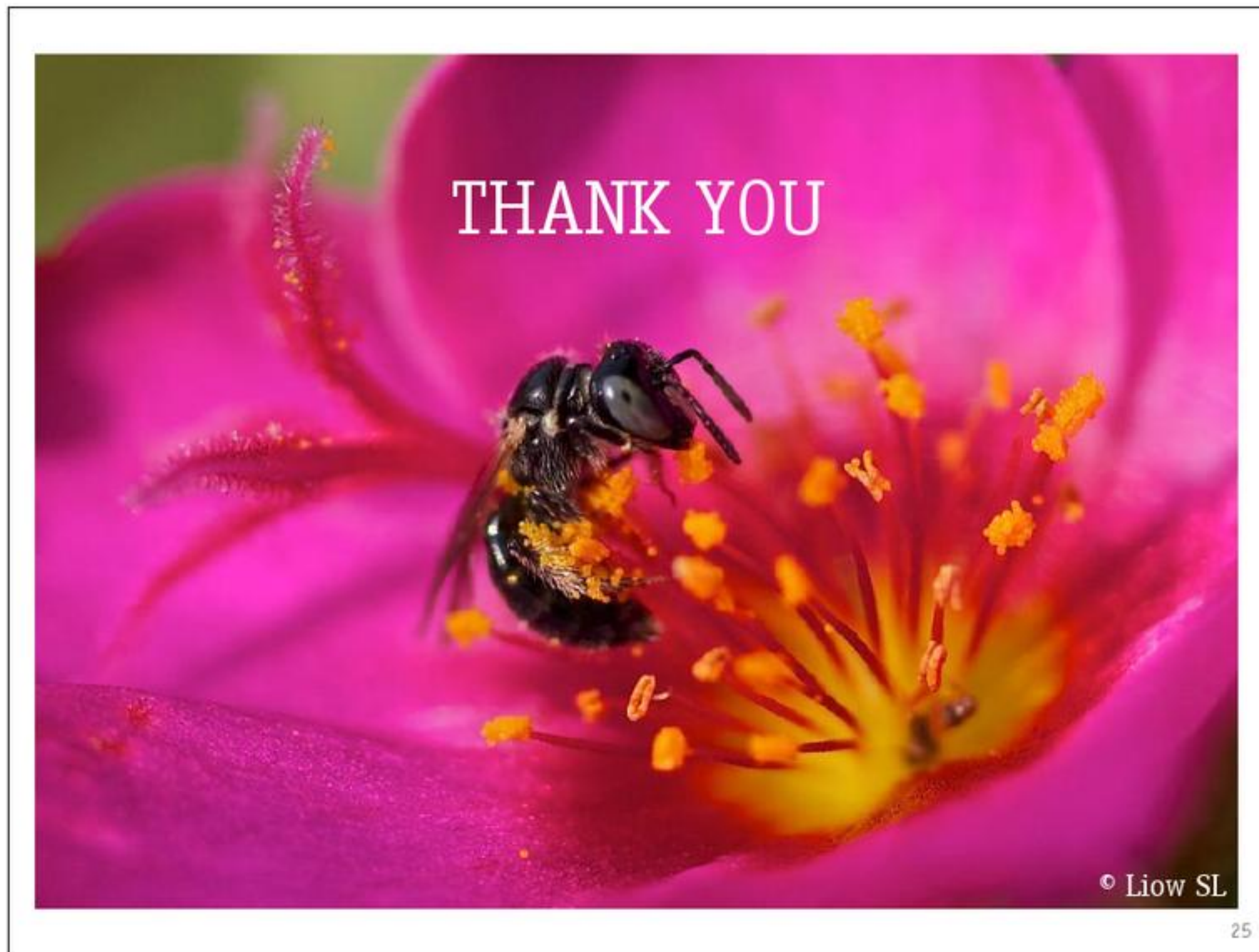
23

CONCLUSION

Blastocyst culture and transfer

Advantages	Limitations
– Higher clinical pregnancy rate – Higher live birth rate – Reduce multiple gestations – Permits more accurate preimplantation screening (PGS) for euploid embryos	– A minimum of 6 good quality Day 3 embryos – Fewer embryos for freezing – Lower cumulative pregnancy rate – Requires good ART practices to ensure optimal conditions for blastocyst culture

24



25



NUÔI CẤY VÀ CHUYỂN PHÔI NANG GIÚP CẢI THIỆN KẾT QUẢ IVF

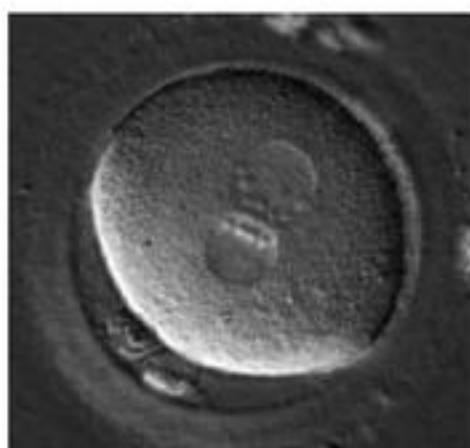
Liow Swee Lian DVM, PhD
Sincere IVF Center
Novena Specialist Center
Singapore

1

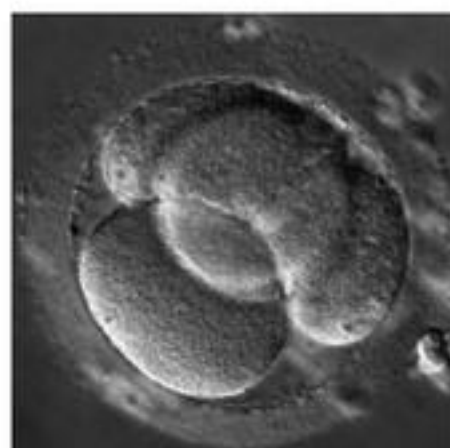
GIỚI THIỆU

Nuôi cấy phôi người

- Phôi được nuôi cấy từ hợp tử đến ngày 2 (4 tế bào) hoặc ngày 3 (8 tế bào)



Hợp tử
(giai đoạn 2PN)



Giai đoạn 4 tế bào
(ngày 2)



Giai đoạn 8 tế bào
(ngày 3)

2



GIỚI THIỆU

- Qui trình labo và hệ thống nuôi cấy đã cải thiện đáng kể tỉ lệ làm tổ của phôi.
- Chuyển nhiều hơn 1 phôi làm tăng tỉ lệ đa thai.
- Một số nước bắt buộc chuyển đơn phôi (SET).
- Ở phần lớn các nước không chuyển quá 2 phôi.

3



Chọn lựa phôi

Một trong những thách thức chính cho các chuyên viên phôi học:

- Chọn lựa được phôi có khả năng làm tổ cao nhất

Các phương pháp chọn lựa phôi hiện nay dựa trên các tiêu chuẩn hình thái ở các giai đoạn phát triển khác nhau.

4

Thất bại làm tổ

- >70% phôi thất bại làm tổ
(Patrizio & Sakkas, 2009)
- i. không có phôi có khả năng phát triển và làm tổ
- ii. không có khả năng chọn lựa phôi để chuyển

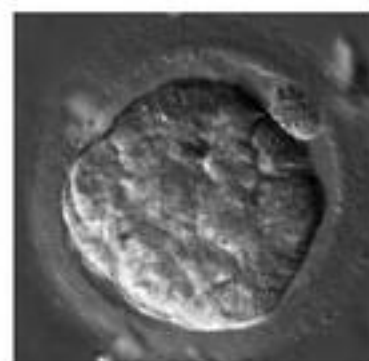
5

GIỚI THIỆU

- Cuối những năm 1990, cải tiến môi trường nuôi cấy cho phép có thể nuôi từ giai đoạn hợp tử đến phôi nang
 - Chọn lựa được nhiều phôi tốt cho chuyển phôi
 - Tỷ lệ làm tổ cao hơn
 - Giảm đa thai
 - Nuôi cấy phôi sau PGD đến phôi nang
 - Tạo các dòng tế bào gốc từ phôi



Phôi 8 tế bào (N3)



Phôi dâu (N4)



Phôi nang (N5)

6



Nuôi cấy hợp tử đến phôi nang

Có 3 cách:

1. Không thay môi trường mới
Không bị gián đoạn quá trình nuôi cấy do sử dụng một loại môi trường suốt 5 ngày.
2. Thay đổi môi trường đơn giản
Bị gián đoạn quá trình nuôi cấy, chỉ thay một loại môi trường vào ngày 3.
3. Môi trường chuyển tiếp
Gián đoạn quá trình nuôi cấy bởi hai môi trường khác nhau về thành phần.

7

MÔI TRƯỜNG CHUYỂN TIẾP

1. Sự thay đổi nhu cầu năng lượng của phôi trước làm tổ và ngăn chặn ảnh hưởng của glucose ở phôi giai đoạn phân chia sớm.
2. Ngăn chặn ảnh hưởng của EDTA lên sự phát triển phôi nang và ICM.
3. Sự phân hủy L-glutamine(Gln) trong nước và sản sinh ra amoniac gây ảnh hưởng lên sự phát triển phôi.
4. Vai trò của amino acid trong sự phát triển phôi trước làm tổ.

8

HỆ THỐNG ĐÁNH GIÁ PHÔI NANG



- Giai đoạn phát triển phôi nang
- Chất lượng ICM
- Chất lượng TE

9

HỆ THỐNG ĐÁNH GIÁ PHÔI NANG

Độ nở	Giai đoạn phát triển phôi nang
1	Khoang phôi ít hơn 1/2 thể tích phôi
2	Khoang phôi chiếm hơn 1/2 thể tích phôi
3	Phôi nang hoàn chỉnh, khoang phôi chiếm đầy thể tích phôi
4	Phôi nang nở rộng hoàn toàn, màng trong suốt mỏng dần
5	Phôi đang thoát màng
6	Phôi thoát màng hoàn toàn

10



HỆ THỐNG ĐÁNH GIÁ PHÔI NANG



4AA
Độ nở rộng tốt =4
ICM=A
TE=A



4AB
Độ nở rộng tốt =4
ICM=A
TE=B



4BB
Độ nở rộng tốt =4
ICM=B
TE=B

11

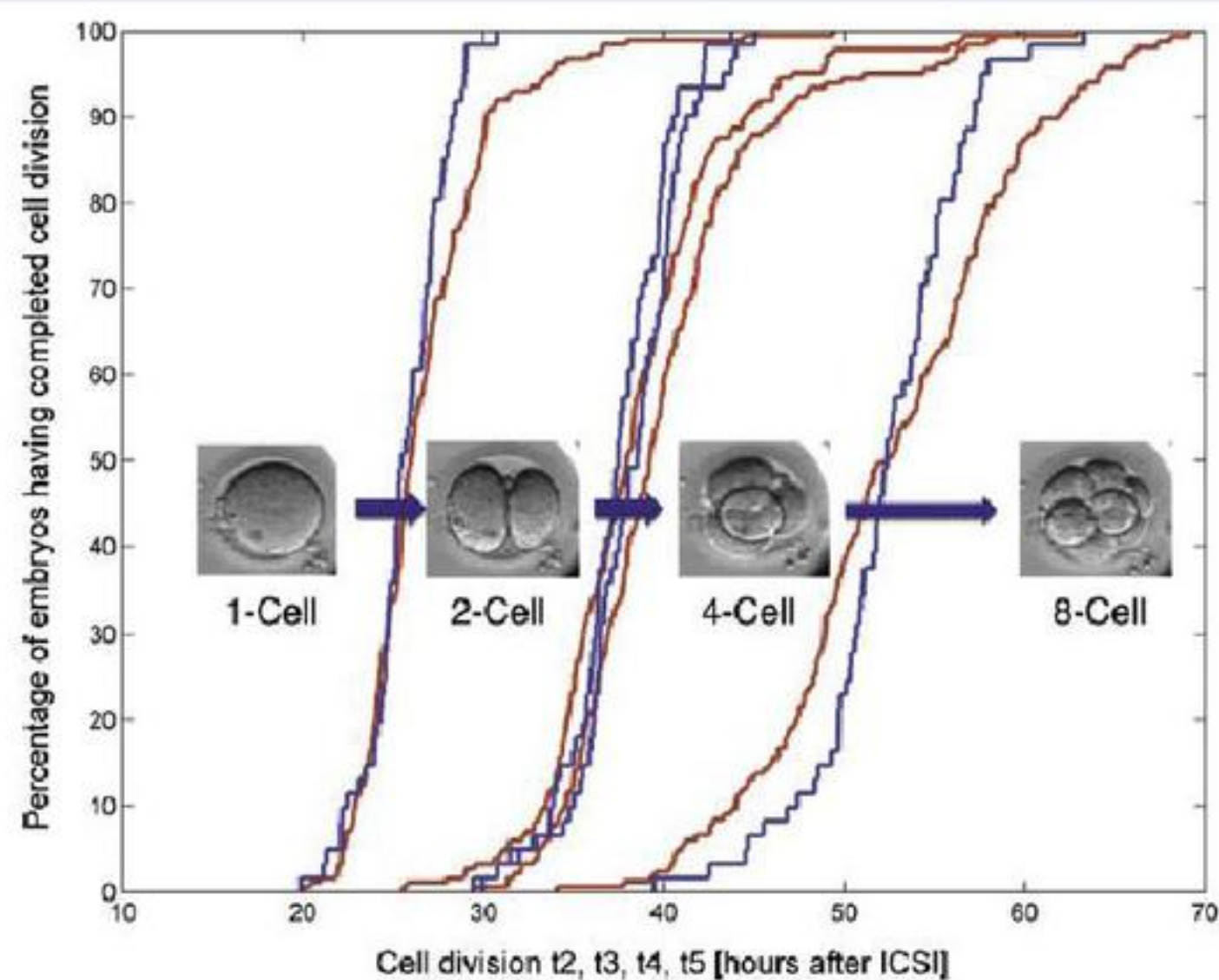
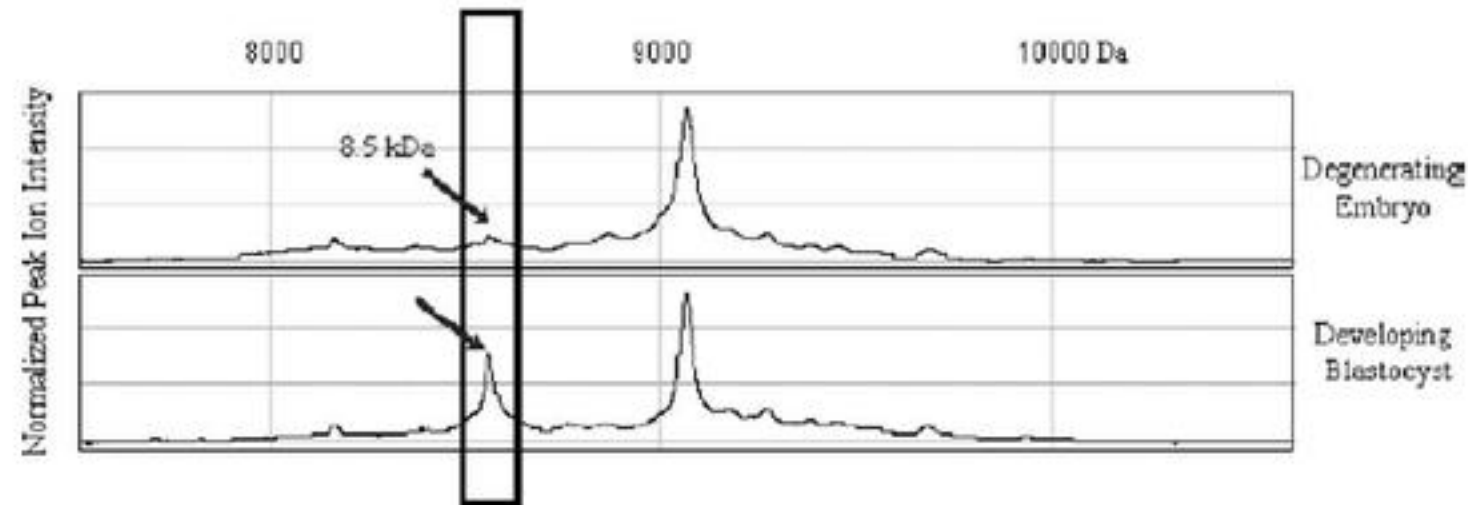


Figure 2 Percentage of embryos having completed a cell division by a given time after insemination. Blue curves represent implanting embryos; red curves represent embryos that did not implant. Four curves of each color represent completion of the four consecutive cell divisions from 1 to 5 cells i.e. t2, t3, t4 and t5.

Đánh giá phôi không xâm lấn

FIGURE 5

The expression of an 8.5-kDa protein biomarker appears to be directly associated with ongoing human blastocyst development. *Box* highlights differences in expression across morphological different day 5 human embryos. *Arrows* indicate significant increase of expression in developing blastocyst ($P < 0.05$).



Katz-Jaffe, *Mammalian embryo secretome*. *Fertil Steril* 2006.

13

Sử dụng glucose trong các giai đoạn phát triển khác nhau của phôi in vitro trước làm tổ

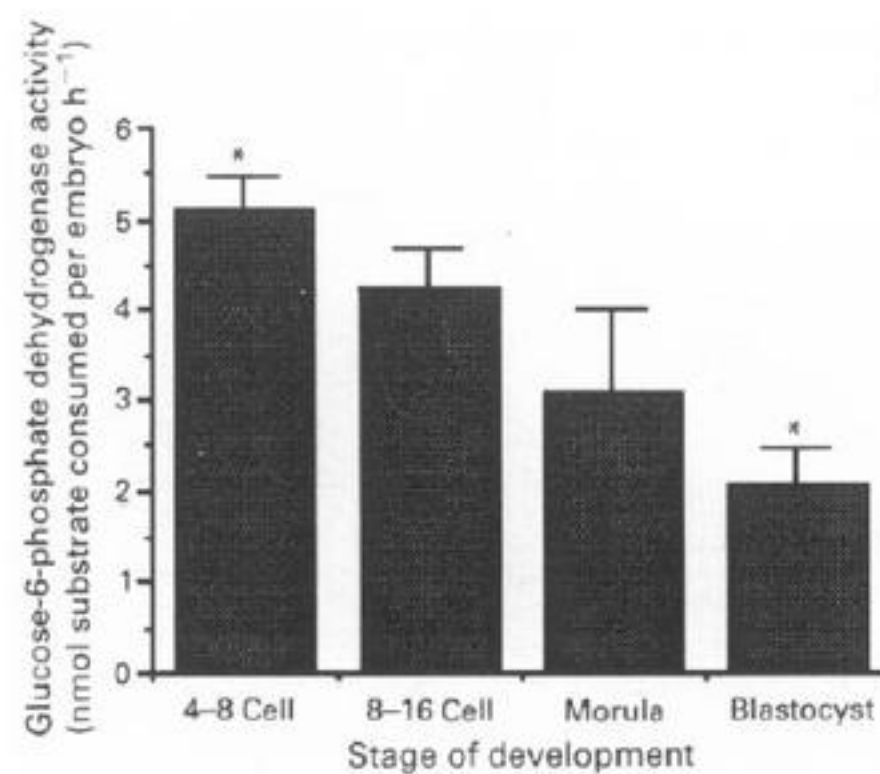


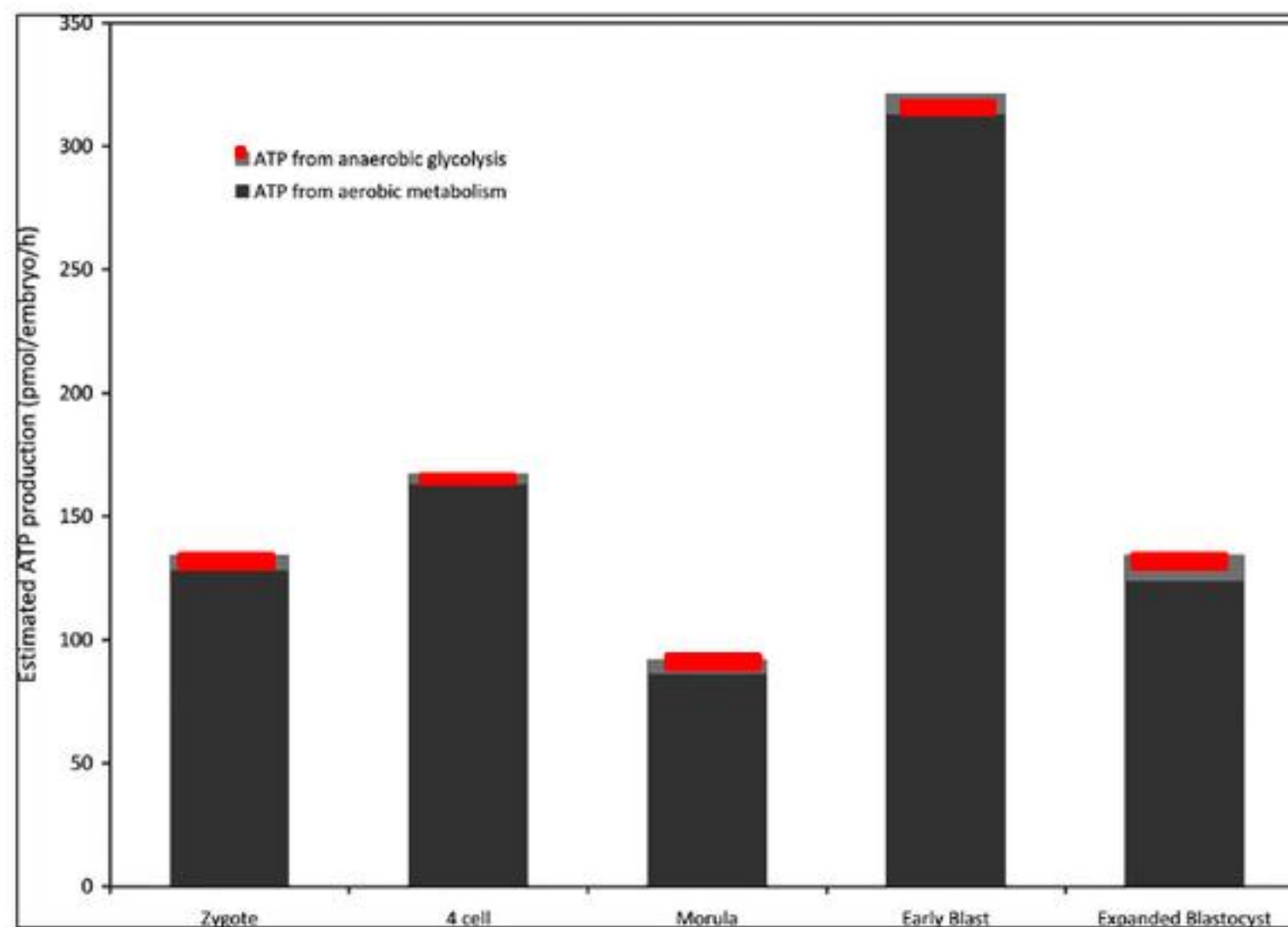
Fig. 5. Variation in activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase with development. Enzyme activities were measured in extracts from single human preimplantation embryos. Values are means of six (range 3–8) determinations for each stage of development and are expressed as nmol substrate consumed per embryo h⁻¹ ± SEM. G6PDH activity fell significantly with development (* $P < 0.001$, one-way analysis of variance).

Martin KL và cs. (1993). *J Reprod Fertil* 99:259-266

14



Sự hình thành ATP từ phôi in vitro

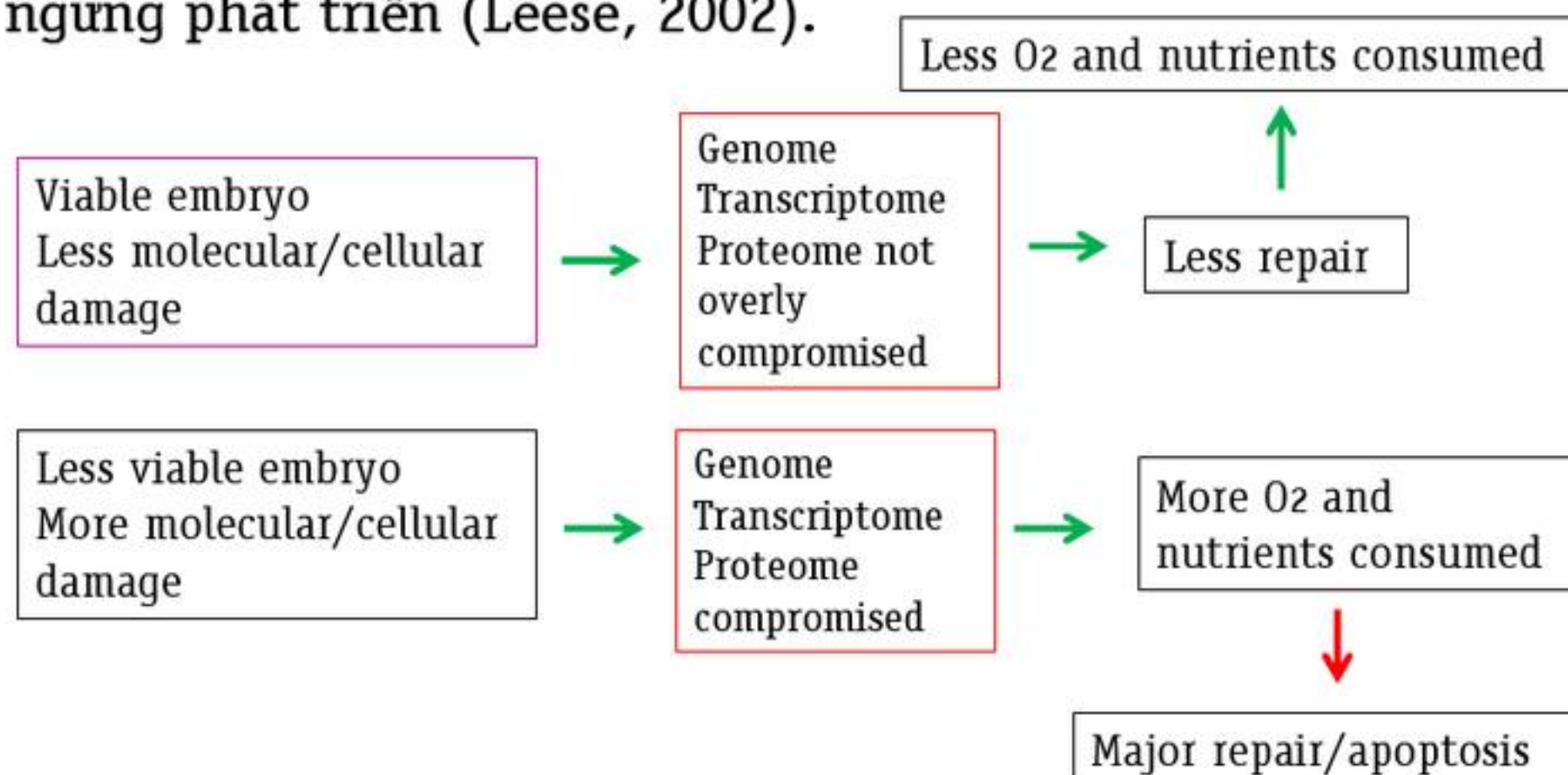


Sturmeý và Leese (2003). Reproduction 126:197-204

15

QUÁ TRÌNH CHUYỂN HÓA

‘Quiet embryo hypothesis’: những phôi có khả năng sống tốt chuyển hóa một cách “thầm lặng” so với những phôi ngưng phát triển (Leese, 2002).

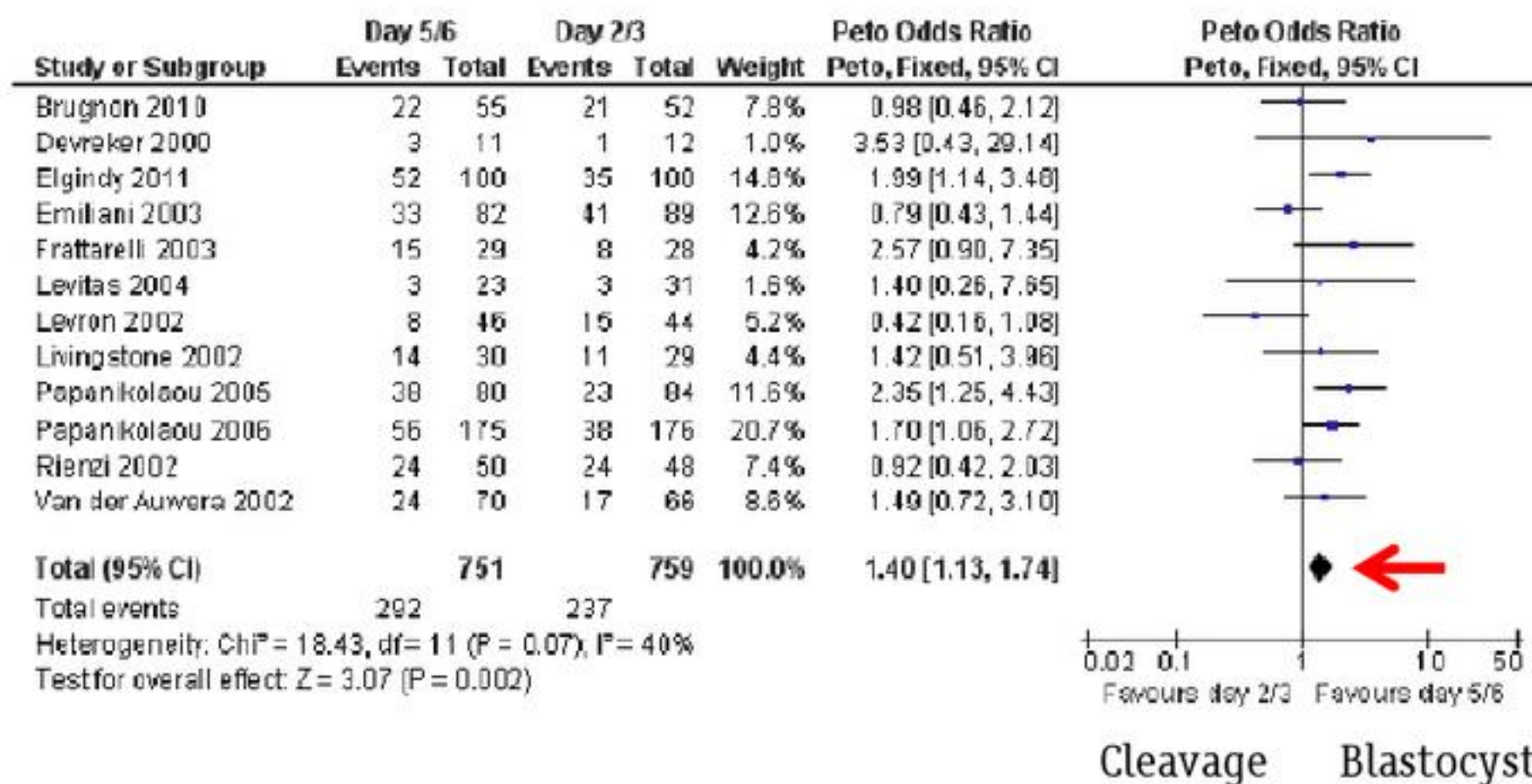


16

Cochrane Review (2012): Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in ART

Tỉ lệ sinh sống và tỉ lệ sinh sống/cặp vợ chồng

Figure 3. Forest plot of comparison: 1 Live birth rate, outcome: 1.1 Live birth per couple.

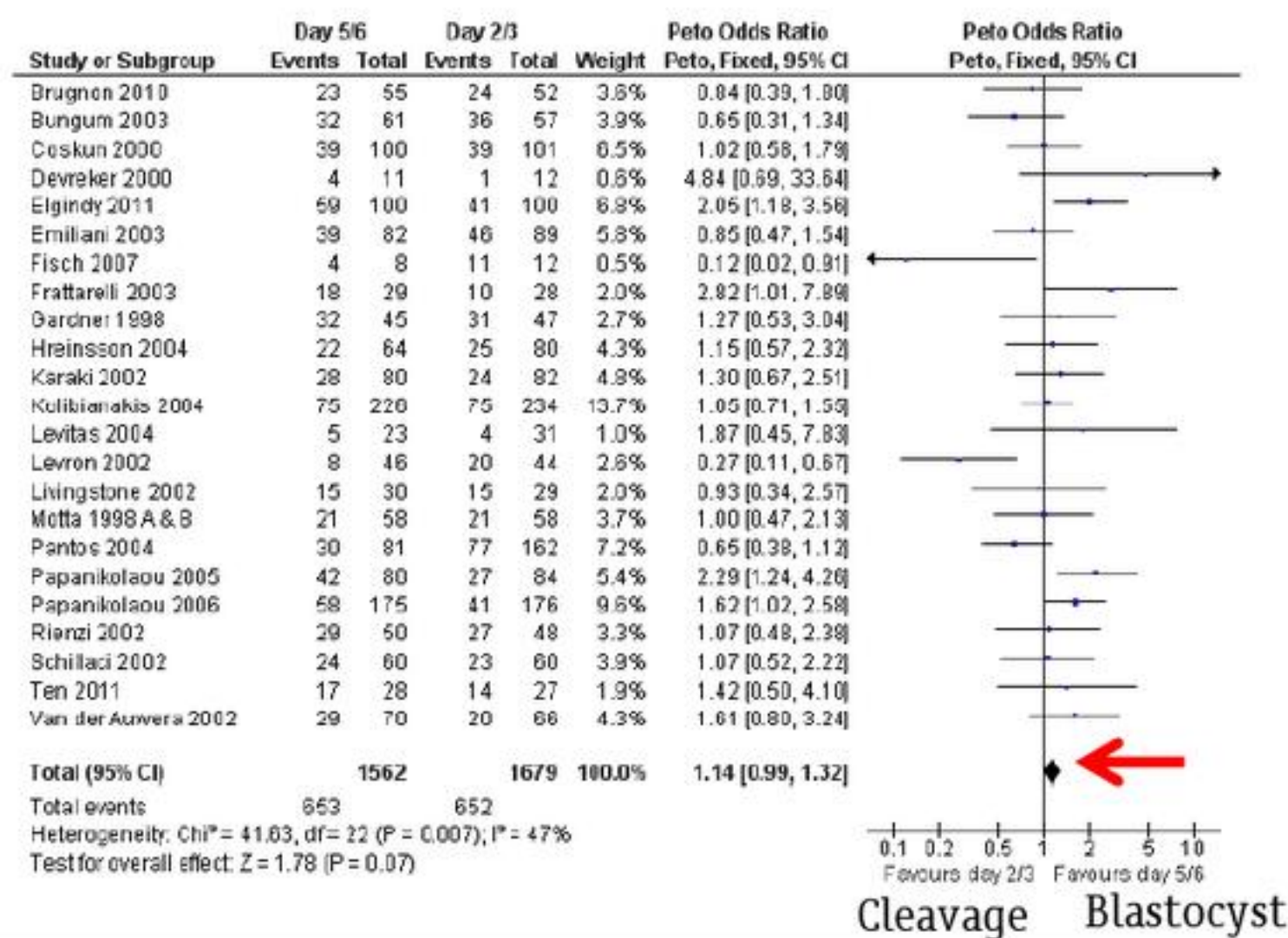


17

Cochrane Review (2012): Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in ART

Tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ thai lâm sàng/cặp vợ chồng

Figure 4. Forest plot of comparison: 2 Clinical pregnancy rate, outcome: 2.1 clinical pregnancy rate per couple.

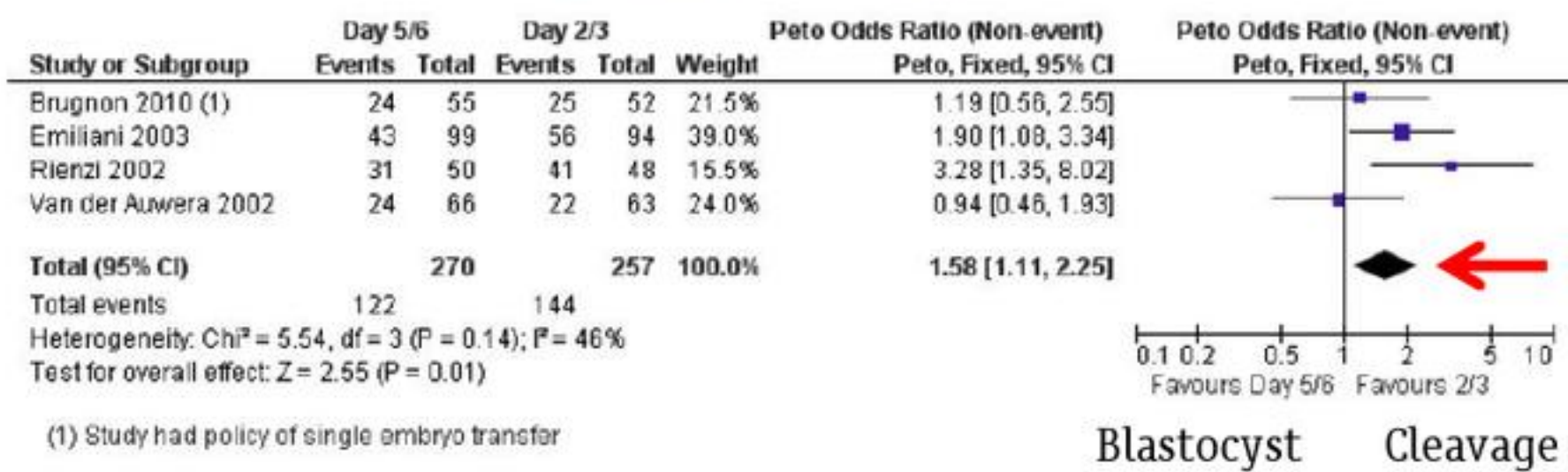


18

Cochrane Review (2012): Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in ART

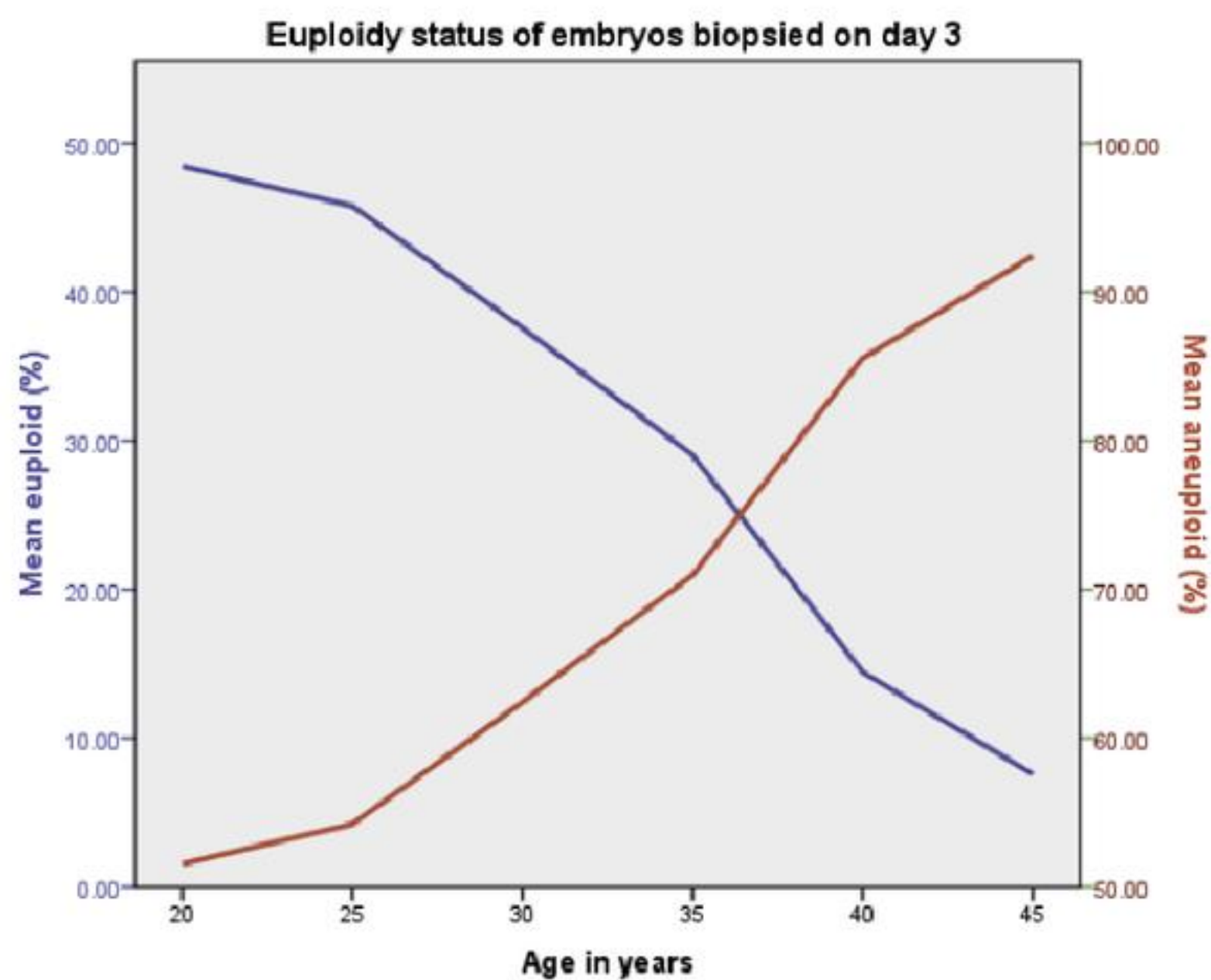
Tỉ lệ thai cộng gộp và tỉ lệ thai cộng gộp/cặp vợ chồng

Figure 5. Forest plot of comparison: 3 Cumulative pregnancy rate, outcome: 3.1 cumulative pregnancy rate from fresh and frozen transfers.



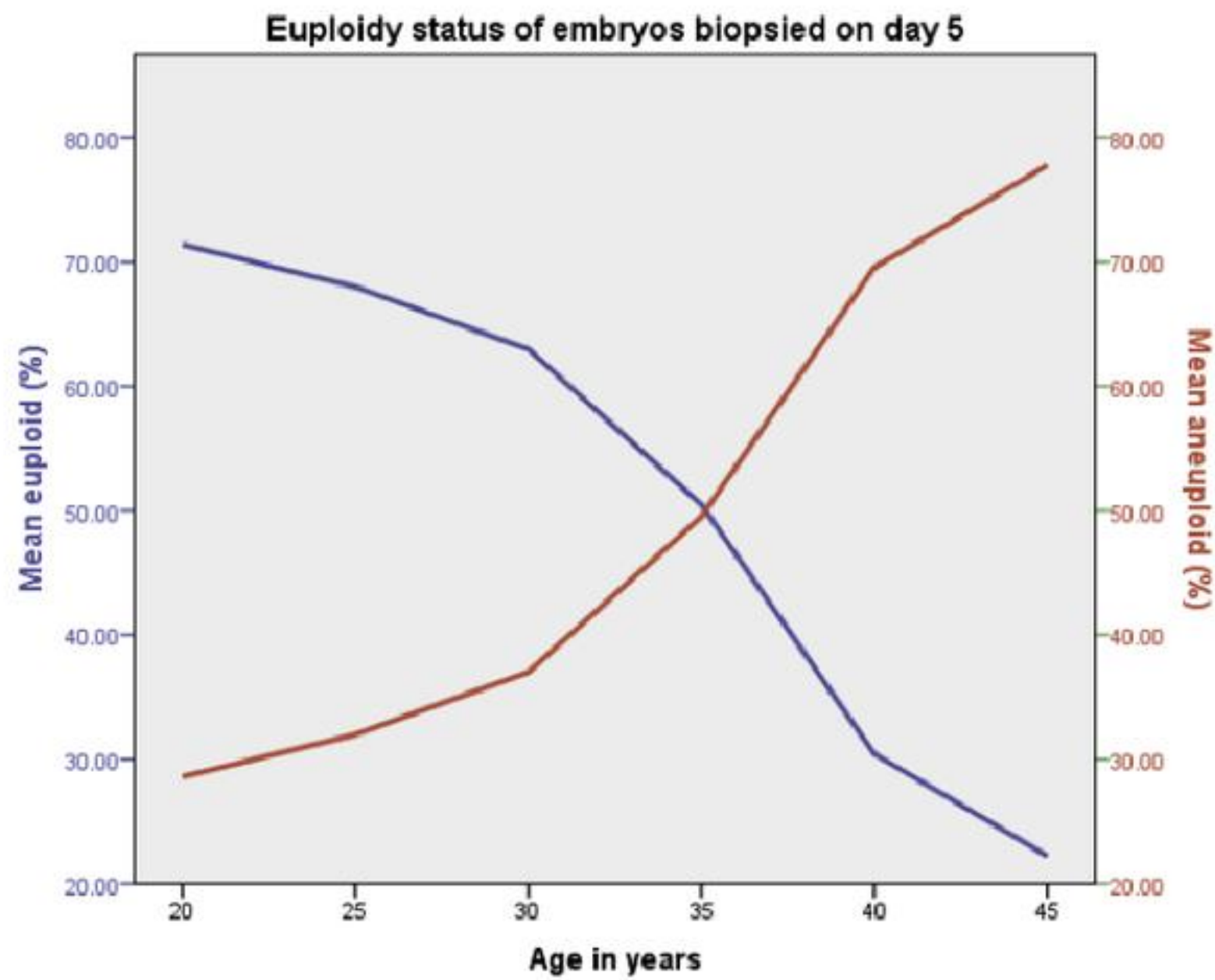
19

Nhiễm sắc thể phôi ngày 3



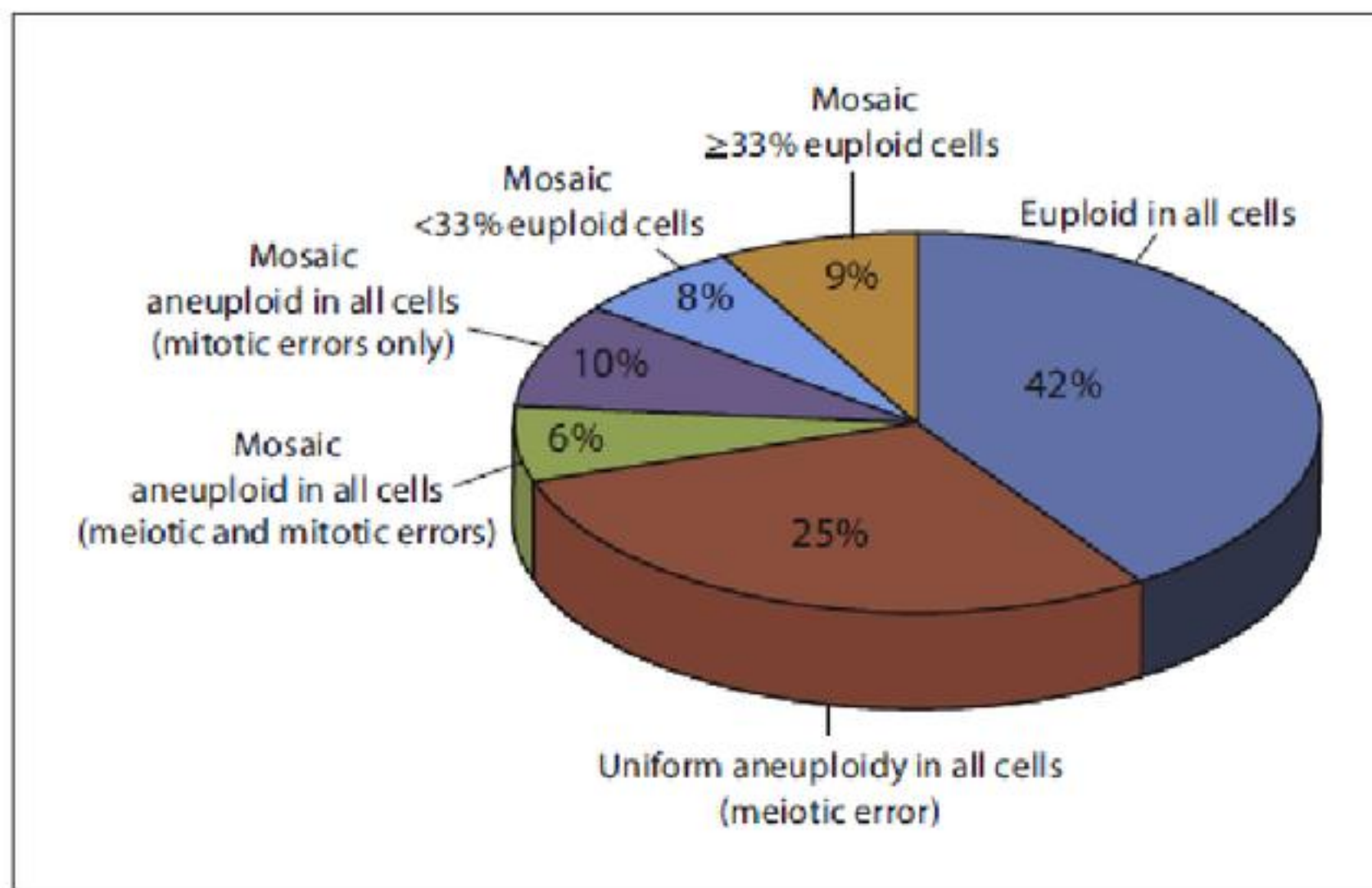
20

Nhiễm sắc thể phôi ngày 5



21

Thể lệch bội và thể khảm ở phôi nang người

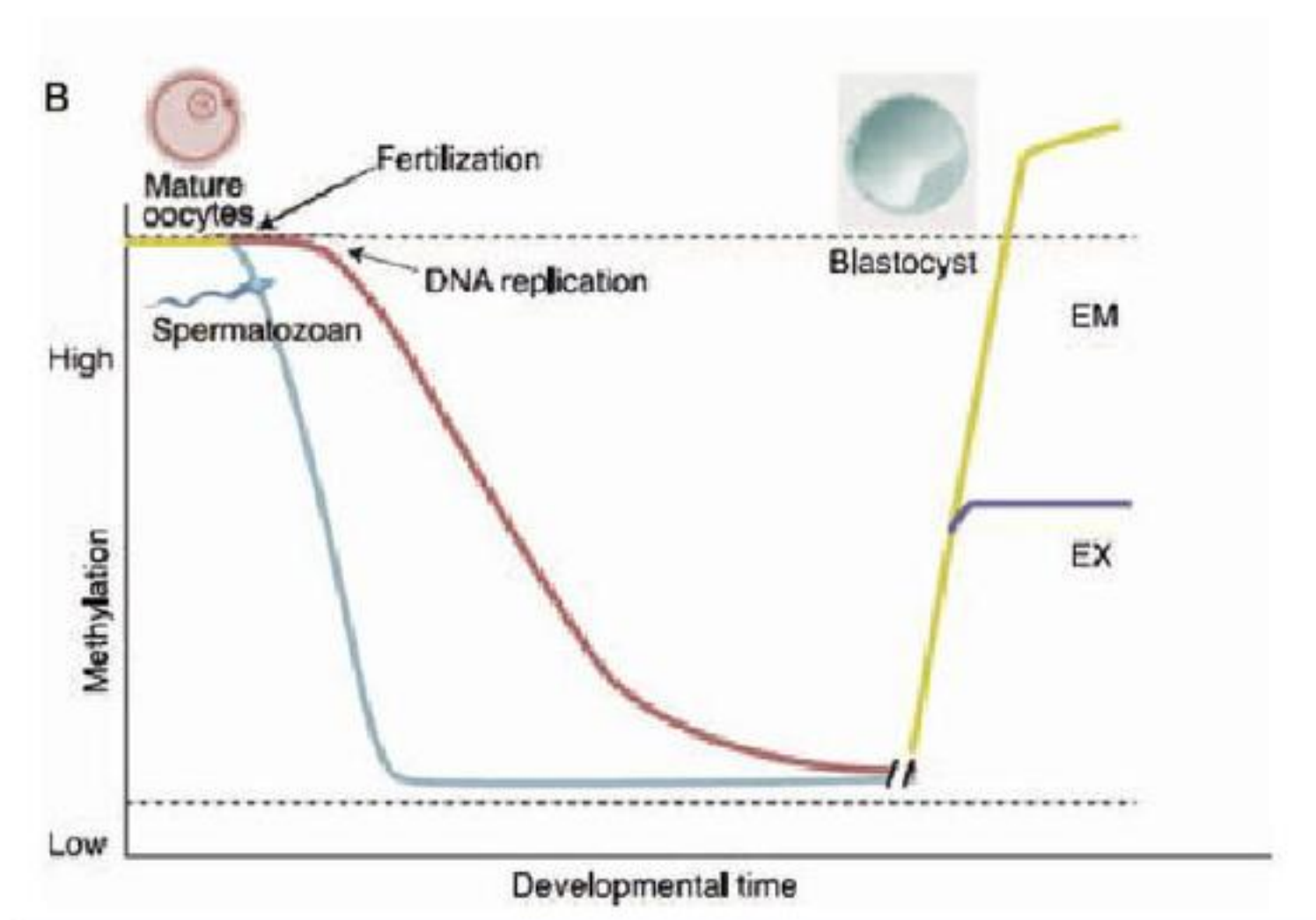


Fragouli và Wells (2011). Cytogenet Genome Res

22



Sự tái lập quá trình methyl hóa ở phôi trước làm tổ



Reik và cs. (2001). Science, 293:10891093

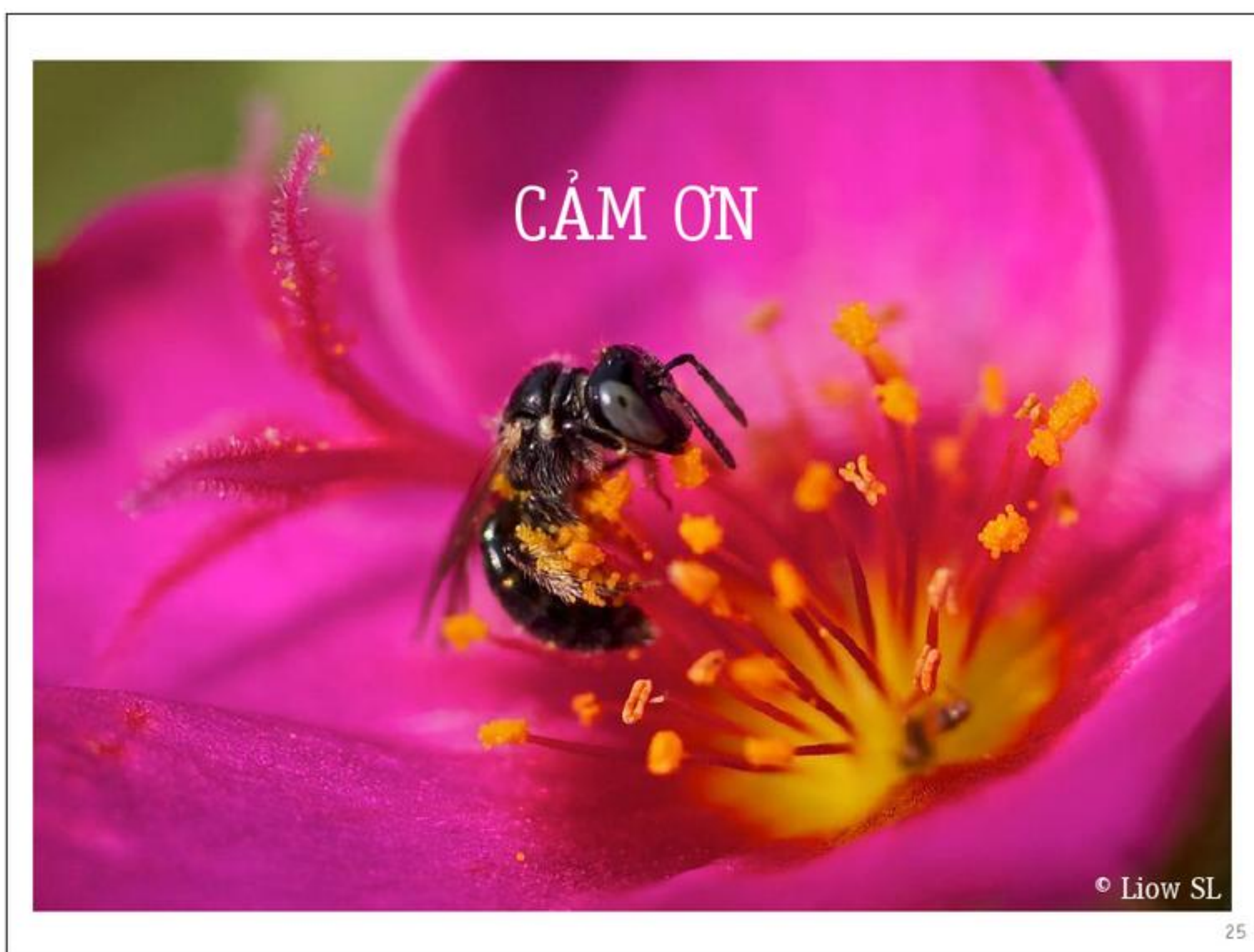
23

KẾT LUẬN

Nuôi cấy và chuyển phôi nang

Ưu điểm	Hạn chế
- Tỉ lệ thai lâm sàng cao hơn - Tỉ lệ trẻ sinh sống cao hơn - Giảm đa thai - Cho phép xác định thể bội chỉnh ở phôi bằng PGS	- Ít nhất phải có 6 phôi tốt vào ngày 3 - Ít phôi trữ hơn - Tỉ lệ thai cộng dồn thấp - Yêu cầu đảm bảo điều kiện nuôi cấy tối ưu cho phôi nang

24



KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU TRIỂN KHAI NUÔI CẤY PHÔI NANG TẠI TRUNG TÂM HỖ TRỢ SINH SẢN, BỆNH VIỆN QUỐC TẾ HẠNH PHÚC

Võ Thiện Ân, Nguyễn Thị Kim Phương, Huỳnh Thị Thu Thảo

Bệnh viện Quốc tế Hạnh Phúc

TÓM TẮT

Kỹ thuật nuôi cấy phôi nang ra đời đã mang lại nhiều ưu điểm trong việc lựa chọn được phôi tốt nhất để chuyển. Một số nghiên cứu cho thấy tỉ lệ thai lâm sàng cũng như tỉ lệ làm tổ cao hơn so với chuyển phôi ngày 2 hoặc 3 (Devreker và cs., 2000). Với mong muốn cải thiện tỉ lệ thai và tỉ lệ làm tổ, từ 07/2012 đến nay, Trung tâm IVF Hạnh Phúc đã triển khai kỹ thuật nuôi cấy và chuyển phôi nang, kết quả như sau: 7 chu kỳ nuôi cấy phôi nang, tỉ lệ phát triển thành phôi nang là 66,7%, tất cả ca đều có phôi nang chuyển với tỉ lệ có thai là 57,1%, tỉ lệ làm tổ là 42,9%. Với kết quả bước đầu rất khả quan này, chúng tôi mạnh dạn triển khai kỹ thuật nuôi cấy và chuyển phôi nang cho những đối tượng phù hợp và hướng đến mục tiêu chọn một phôi tốt nhất để chuyển nhằm hạn chế tỉ lệ đa thai.

GIỚI THIỆU

Sự kiện em bé đầu tiên ra đời trên thế giới bằng phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm năm 1978 đã đánh dấu một bước phát triển lớn của nền y học thế giới. Từ đó cho đến nay, các nhà khoa học đã không ngừng nghiên cứu để đưa ra các phương pháp mới nhằm nâng cao tỉ lệ có thai, giúp đem lại niềm vui cho các cặp vợ chồng hiếm muộn. Hiện nay trên thế giới, đa số các trung tâm IVF đều áp dụng chuyển phôi vào ngày 2 hoặc ngày 3. Về cơ chế tự nhiên điều này là không hợp sinh lý, do phải đến ngày 5 hoặc ngày 6 phôi mới đến được tử cung để làm tổ. Ngoài ra, việc chuyển nhiều phôi dễ dẫn đến hiện tượng đa thai. Nhận thức được



điều này, các nhà phôi học trên thế giới đã không ngừng cải tiến các phương pháp nuôi cấy, với mục đích lựa chọn được một phôi tốt nhất và chuyển vào buồng tử cung (single embryo transfer), nhằm giảm tối đa tỉ lệ đa thai. Phương pháp nuôi cấy phôi nang và chuyển một phôi nang đang dần trở thành một phương pháp được các trung tâm IVF trên thế giới lựa chọn. Bắt kịp xu hướng đó, IVF Hạnh Phúc cũng đã bắt đầu triển khai nuôi cấy phôi nang từ 07/2012. Mục đích của báo cáo này là nhằm đánh giá kết quả bước đầu triển khai việc nuôi cấy và chuyển phôi nang tại Trung tâm IVF Hạnh Phúc.

PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN

Thiết kế nghiên cứu

Hồi cứu, báo cáo loạt ca.

Thời gian: từ 07/2012 đến 10/2012.

Tiêu chuẩn chọn mẫu

- Bệnh nhân có ít nhất 4 phôi tốt và khá ngày 3.
- Bệnh nhân đồng ý nuôi cấy phôi nang và chuyển phôi ngày 5/6.

Qui trình thực hiện

Bệnh nhân được chọc hút trứng dưới siêu âm sau khi kích thích buồng trứng (KTBT) theo phác đồ chuẩn GnRH đồng vận hay đối vận. Phức hợp trứng-tế bào hạt thu được sẽ được xử lý và thực hiện IVF/ICSI. Qui trình thực hiện IVF/ICSI và đánh giá thụ tinh được thực hiện như thường qui.

66-68 giờ sau IVF/ICSI, chúng tôi sẽ đánh giá và phân loại phôi ngày 3 dựa trên tiêu chuẩn sau: (1) Phôi tốt: có 6-8 phôi bào, kích thước phôi bào đồng đều, tỉ lệ phân mảnh bào tương <10%, (2) Phôi khá: có 6-8 phôi bào, kích thước đồng đều hoặc không đồng đều, tỉ lệ phân mảnh bào tương 10-20%, (3) Phôi xấu: số lượng phôi không phải 6-8, tỉ lệ phân mảnh bào tương >20%. Chỉ những phôi tốt và khá mới được chọn và chuyển sang môi trường G2 (Vitrolife, Thụy Điển) và nuôi cấy trong tủ cấy 37°C, 5%O₂, 6%CO₂.

Vào ngày 5 (114-116 giờ sau IVF/ICSI), chúng tôi kiểm tra và đánh giá chất lượng phôi nang theo tiêu chuẩn của David Gardner (1999):

- i. Sự tạo nang (blastocoel formation) và độ nở rộng của phôi (expansion):
 1. Thể tích nang <1/2 thể tích phôi (early blastocyst)
 2. Thể tích nang $\geq$ 1/2 thể tích phôi (blastocyst)
 3. Thể tích nang chiếm đầy thể tích phôi (full blastocyst)
 4. Phôi nở rộng, thể tích phôi lớn hơn thể tích ban đầu, màng trong suốt mỏng hơn (expanded blastocyst)
 5. Phôi đang thoát màng (hatching blastocyst)
 6. Phôi thoát hoàn toàn khỏi màng trong suốt (hatched blastocyst)
- ii. ICM: được đánh giá khi phôi ở giai đoạn nở rộng 3 trở lên:
 - (A) Nhiều tế bào, khối tế bào liên kết chặt
 - (B) Có vài tế bào, liên kết lỏng lẻo
 - (C) Có rất ít tế bào
- iii. TE: được đánh giá khi phôi ở giai đoạn nở rộng 3 trở lên:
 - (A) Nhiều tế bào, dính liền liên tục
 - (B) Vài tế bào, rời rạc
 - (C) Có rất ít tế bào

Phôi nang được đánh giá là tốt khi $\geq$ 3AA.

Chuyển phôi được thực hiện vào ngày 5 dưới sự hướng dẫn của siêu âm.

KẾT QUẢ

Sau 3 tháng triển khai nuôi cấy phôi nang, IVF Hạnh Phúc đã thực hiện được 7 chu kỳ chuyển phôi nang.

Kết quả được tóm tắt ở các bảng sau:



Bảng 1. Đặc điểm bệnh nhân

	N=7
Tuổi trung bình	33 ± 3,7
Số lần thực hiện IVF/ICSI:	
– Lần 1	4
– Lần 2	2
– Lần 3	1
Nguyên nhân vô sinh:	
– Do yếu tố nam	3
– Suy buồng trứng sớm, chu kỳ xin trứng	1
– Buồng trứng đa nang, thất bại IUI	1
– Không rõ nguyên nhân	2
Phác đồ KTBV:	
– GnRH đối vận	6
– GnRH đồng vận	1
Số ngày KTBV trung bình	10 ± 1,3
Tổng liều FSH trung bình	1912,5 ± 665,6
Độ dày nội mạc tử cung	11,1 ± 2,2

Bảng 2. Các thông số kết quả nuôi cấy phôi nang của 7 ca

	TB $\pm$ ĐLC (Mean $\pm$ SD)
Số trứng thu được	18,7 $\pm$ 7,9
Số trứng trưởng thành	14,9 $\pm$ 7,3
Số trứng thụ tinh	12,1 $\pm$ 5,8
Số phôi ngày 3	10,9 $\pm$ 4,8
Số phôi tốt ngày 3	6,3 $\pm$ 1,9
Số phôi ngày 3 chọn nuôi cấy phôi nang (27)	3,86 $\pm$ 1,1
Số phôi phát triển thành phôi nang (18)	2,57 $\pm$ 1,7
Tỉ lệ phát triển thành phôi nang (18/27)	66,7%
Tỉ lệ phôi nang tốt (5/18)	27,8%
Số phôi nang chuyển/ca	2
Số ca không có phôi nang chuyển	0

Bảng 3. Kết quả có thai của các chu kỳ chuyển phôi ngày 5

	Số ca	Tỉ lệ (%)
Thai lâm sàng	4	57,1
Đơn thai	2	50
Song thai	2	50
Thai ngừng phát triển	0	0
Tỉ lệ làm tổ		42,9 (6/14)



BÀN LUẬN

Khi tiến hành nuôi cấy, chuyển phôi ngày 5, một trong những điều lo lắng là không có phôi nang để chuyển cho bệnh nhân. Tại Trung tâm IVF Hạnh Phúc, chúng tôi đều có phôi chuyển cho 7 ca nuôi cấy phôi nang đầu tiên, đạt tỉ lệ 100% bệnh nhân có phôi nang chuyển. Tỉ lệ phát triển thành phôi nang trong báo cáo của chúng tôi là 66,7% cao hơn so với các báo cáo của Bungum (2003) 55,2%, Emiliani (2003) 48,3%, Coskun (2000) 28%. Tỉ lệ có thai của chúng tôi 57,1% tương đương với báo cáo của Bungum (2003) 52,5% nhưng thấp hơn nghiên cứu của Frattarelli (2003) 69,2%, có thể do cỡ mẫu của chúng tôi còn ít. Tỉ lệ làm tổ trong báo cáo chúng tôi là 42,9% tương đương với nghiên cứu của Frattarelli (2003) 43,4%.

KẾT LUẬN

Mặc dù số lượng nuôi cấy phôi nang tại IVF Hạnh Phúc còn ít nhưng bước đầu đã đạt được những thành công rất đáng khích lệ. Đồng thời kết quả cũng khẳng định sự hoạt động ổn định của Trung tâm IVF Hạnh Phúc. Với kết quả bước đầu đáng khích lệ này, chúng tôi mạnh dạn triển khai kỹ thuật nuôi cấy phôi nang và chuyển phôi nang. Và trong tương lai, chúng tôi sẽ chuyển 1 phôi nang tốt nhằm hạn chế tỉ lệ đa thai, bắt kịp với xu hướng của thế giới là chuyển 1 phôi và phù hợp với mục tiêu của hỗ trợ sinh sản là sinh ra 1 bé khỏe mạnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bungum M, Bungum L, Humaidan P, Yding Andersen C. Day 3 versus day 5 embryo transfer: a prospective randomized study. Reproductive Biomedicine Online April 2003; 7(1):98-104.
2. Coskun S, Hollanders J, Al-Hassan S, Al-Sufyan H, Al-Mayman H, Jaroudi K. Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. Human Reproduction 2000; 15(9):1947-52.
3. Emiliani S, Delbaere A, Vannin A, Biramane J, Verdoodt M, Englert Y, Devreker F. Similar delivery rates in a selected group of patients, for day 2 and day 5 embryos both cultured in sequential medium: a randomized study. Human Reproduction 2003; 18(10):2145-50.
4. Frattarelli JL, Leondires MP, McKeeby JL, Miller BT and Segars JH (2003). Blastocyst transfer decreases multiple pregnancy rates in in vitro fertilization cycles: a randomized controlled trial. Fertil Steril 79,228-229.

5. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Human Reproduction* 1998; 13(12):3434-40.
6. Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocysts. In Jansen R, Mortimer D (eds). *Toward Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond 1999*. London: Parthenon Publishing 1999a, 378-388.



TƯƠNG QUAN GIỮA CHẤT LƯỢNG PHÔI NGÀY 3 VÀ SỰ HÌNH THÀNH PHÔI NGÀY 5

Vũ Đình Tuấn, Mai Kim Châu, Tăng Kim Hoàng Văn

Bệnh viện Hùng Vương

ĐẶT VẤN ĐỀ

Điều trị hiếm muộn bằng kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm đã được ứng dụng rộng rãi trong nhiều thập kỷ qua trên thế giới. Phác đồ điều trị ngày càng hiệu quả hơn với số lượng nang noãn vừa phải và chất lượng nang tối ưu. Tỷ lệ thụ tinh cao, chất lượng phôi tốt đạt được nhiều và đặc biệt là hệ thống nuôi cấy phôi ngày càng hoàn thiện đã cho phép một số trung tâm nuôi cấy phôi tiếp đến ngày 5, thậm chí ngày 6^[6]. Phôi ở giai đoạn này được gọi là phôi nang. Tỷ lệ phôi phát triển tiếp đến giai đoạn phôi nang đạt gần 66% với tỷ lệ làm tổ trên 50%^[5,6].

Ứng dụng hệ thống nuôi cấy phôi nang, bệnh nhân đạt được những kết quả như:

- Phôi được lựa chọn có khả năng làm tổ cao.
- Chuyển ít phôi nên hạn chế khả năng đa thai.
- Tỷ lệ trẻ sinh sống từ chuyển phôi nang cao hơn 1,35 lần so với chuyển phôi ở giai đoạn phôi sớm.

Nhưng bên cạnh đó, bệnh nhân phải chấp nhận số phôi dư trữ đông ít vì một tỷ lệ khá cao số phôi không thể tiếp tục phát triển đến giai đoạn phôi nang.

Nghiên cứu của chúng tôi đặt ra vấn đề ở đây là liệu có mối tương quan nào giữa chất lượng phôi phân chia (ngày 3) đến sự phát triển tiếp theo giai đoạn phôi nang (ngày 5). Nếu như chúng ta có thể xác định được mối tương quan này sẽ giúp hạn chế việc chọn nhầm những phôi không có khả năng nuôi cấy tiếp. Từ đó, có thể nâng tỷ lệ phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang lên đến 80%, thay vì chỉ khoảng 60% như hiện nay.



Để lựa chọn chính xác phôi nuôi cấy tiếp đến giai đoạn phôi nang, cần căn cứ vào rất nhiều yếu tố và tiêu chí như: số lượng tế bào, mức độ phân mảnh, sự xuất hiện sớm giai đoạn nén của phôi vào ngày 3, độ đồng đều của phôi bào, độ mịn của bào tương, thời điểm đánh giá phôi, đặc điểm phân mảnh bào tương (phân mảnh tập trung, phân mảnh rời rạc), trạng thái nhân của mỗi phôi bào, sự phân bố về mặt không gian của phôi bào, mức độ nén của phôi bào... Nhưng do hạn chế về thời gian đầu triển khai, nên chúng tôi chỉ mới tập trung căn cứ vào các đặc điểm đánh giá chất lượng phôi ngày 3 và ngày 5 dựa theo đồng thuận Alpha, từ đó xác định mối tương quan giữa hai nhóm phôi này để có những số liệu cơ bản trong việc lựa chọn phôi sao cho đạt hiệu quả tối ưu nhất.

MỤC TIÊU

Phân tích mối tương quan giữa chất lượng phôi ngày 3 và sự hình thành phôi ngày 5. Từ đó xác định một số đặc điểm để lựa chọn phôi ngày 3 sao cho đạt hiệu quả phôi phát triển tối ưu nhất vào ngày 5.

TỔNG QUAN Y VẤN

Một số đặc điểm về hệ thống nuôi cấy phôi nang

Nguồn năng lượng

Trứng ở giai đoạn tiền nhân, tương tự như trứng ở giai đoạn MII, tiêu thụ lượng oxygen khá ít và đặc biệt đòi hỏi carboxylic acid (ví dụ như pyruvate) là nguồn cung cấp năng lượng chủ yếu. Ở giai đoạn phôi phân chia sớm, glucose được sử dụng với lượng rất nhỏ (các hoạt động sinh tổng hợp của phôi ít xảy ra ở những giai đoạn đầu).

Ở giai đoạn phôi nang, phôi có nhu cầu sử dụng nhiều oxygen hơn và liên tục sử dụng glucose cùng các nguồn cung cấp năng lượng khác.

Dịch bên trong vôi trứng có nồng độ cao pyruvate (0,32 mmol/l) và lactate (10,5 mmol/l), đồng thời nồng độ thấp glucose (0,5 mmol/l). Ngược lại, dịch bên trong buồng tử cung lại có nồng độ thấp pyruvate (0,1 mmol/l) và lactate (5,87 mmol/l), đồng thời nồng độ glucose cao (3,15 mmol/l).

Amino acid

Sau giai đoạn compact, các amino acid không thiết yếu và glutamin làm tăng sự hình thành blastocoel (khoang phôi) và tăng sự thoát màng, trong khi các amino acid thiết yếu kích thích tốc độ phân chia và sự phát triển của ICM trong blastocyst.

Tỉ lệ làm tổ của phôi blastocyst được cải thiện khi trứng giai đoạn tiền nhân được nuôi cấy với các amino acid không thiết yếu đến giai đoạn 8 tế bào, sau đó tiếp tục nuôi cấy với đủ 20 loại amino acid từ giai đoạn 8 tế bào đến giai đoạn blastocyst.

Mặc dù các amino acid được phôi sử dụng, nhưng việc nó được phân hủy liên tục tạo nên lượng lớn ammonium được sản sinh trong môi trường nuôi cấy. Ammonium được tạo ra trong môi trường nuôi cấy không những có ảnh hưởng xấu đến sự phát triển của phôi trong môi trường mà còn ảnh hưởng việc phát triển bình thường của thai ở nồng độ khoảng 300 $\mu\text{mol/l}$. Hơn nữa, ammonium đã được chứng minh có ảnh hưởng đến sự trao đổi chất, độ pH, sự điều hòa và sự biểu hiện gen của phôi. Cách giải quyết tốt nhất là thay đổi môi trường nuôi cấy nhằm kiểm soát nồng độ ammonium.

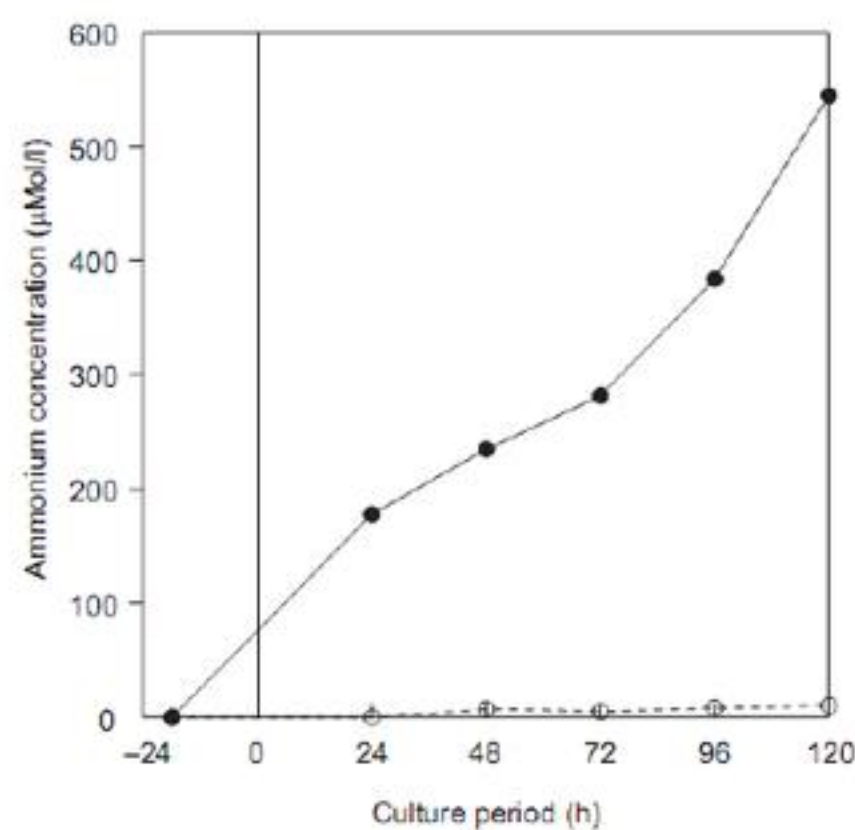


Fig 16.3 Production of ammonium into the culture medium (lacking embryos) by the spontaneous breakdown of amino acids in culture media.

Oxygen

Sự thật là phôi người có thể phát triển ở nồng độ oxygen trong không khí (khoảng 20%). Nồng độ oxygen trong buồng tử cung thấp hơn nhiều so với trong vôi trứng. Người ta chứng minh rằng phôi động vật hữu nhũ phát triển tốt nhất ở nồng độ oxygen dưới 10%. Hơn nữa, nhiều nghiên cứu cho thấy phôi được nuôi cấy đến giai đoạn blastocyst ở nồng độ 20% bị biến đổi sự biểu hiện gen. Ngược lại, khi được



nuôi cấy ở nồng độ oxygen khoảng 5% phôi ít bị ảnh hưởng đến sự biểu hiện của cả gene và proteome. Ngoài ra, có nghiên cứu cho thấy những phôi được nuôi cấy trong môi trường oxygen thấp sẽ tạo ra phôi nang với số tế bào nhiều hơn đáng kể so với những phôi được nuôi cấy trong môi trường oxygen cao (20%).

Tủ nuôi cấy

Điểm mấu chốt để nuôi cấy phôi thành công là giảm thiểu việc làm nhiễu không khí chung quanh phôi. Hai vấn đề cần lưu ý tránh gây nhiễu là sự thay đổi pH và nhiệt độ.

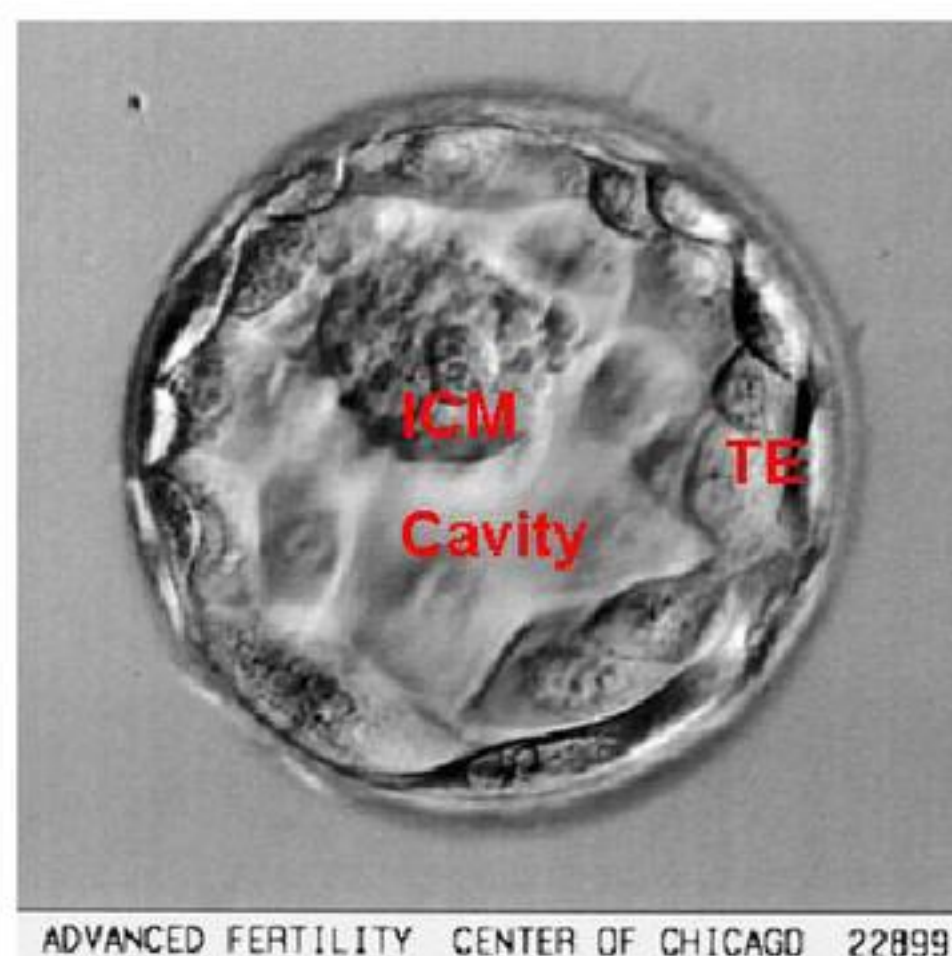
Phôi phải được duy trì trong khoảng cho phép khi được nuôi cấy ở pH 7,4. Mặc dù các hệ thống môi trường được khuyến cáo sử dụng ở pH 7,2 đến 7,4, tốt hơn chúng ta cần đảm bảo pH không vượt quá 7,4. Vì vậy, nồng độ CO₂ được khuyến nên đảm bảo ở khoảng 6% và 7% để đạt pH môi trường trong khoảng 7,3.

Đánh giá phôi ngày 3 (theo đồng thuận Alpha)

Đánh giá phôi ngày 5

Định nghĩa phôi ngày 5 (phôi nang)

Là phôi phát triển đến giai đoạn bao gồm 2 thành phần tế bào khác nhau và một khoang phôi chứa dịch.



Phôi người được nuôi cấy trong điều kiện lab, hoặc phát triển tự nhiên trong cơ thể, thường đạt đến giai đoạn phôi nang 5 ngày sau khi thụ tinh.

Sự phát triển của phôi blastocyst và các tiêu chí đánh giá

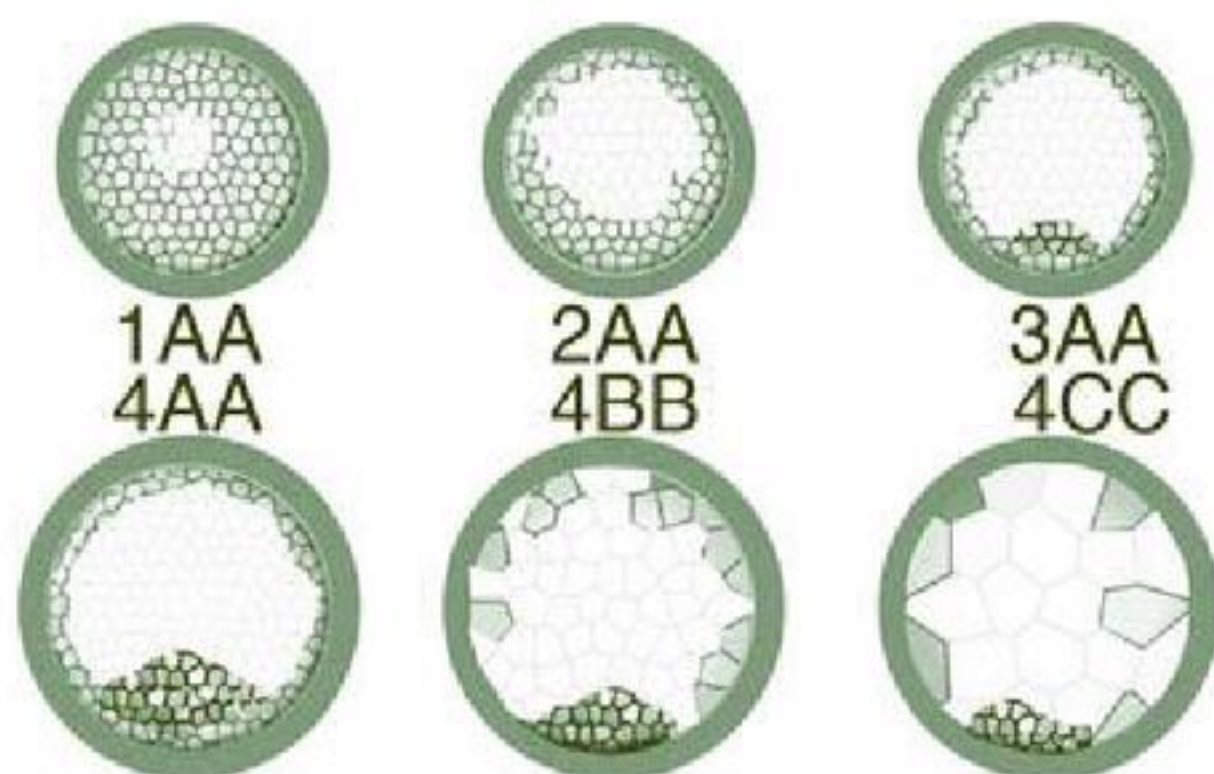
Độ giãn nở	Giai đoạn phát triển của phôi blastocyst và trạng thái
1	Khoang phôi chiếm ít hơn 1/2 thể tích phôi
2	Khoang phôi chiếm nhiều hơn 1/2 thể tích phôi
3	Full blastocyst – khoang phôi gần như chiếm toàn bộ thể tích
4	Expanded blastocyst – khoang phôi giãn nở hơn so với thể tích phôi lúc đầu đồng thời làm mỏng màng ngoài
5	Đang thoát ra khỏi màng
6	Đã thoát ra khỏi màng

ICM	Chất lượng của ICM
A	Rất nhiều tế bào, liên kết chặt chẽ
B	Nhiều tế bào, gắn kết rời rạc
C	Rất ít tế bào

TE	Chất lượng của TE
A	Nhiều tế bào, hình thành một lớp dính kết
B	Ít tế bào, hình thành lớp lỏng lẻo
C	Rất ít tế bào, tế bào có kích thước lớn

Phôi được chấm điểm cho cả 3 tiêu chí nói trên và điểm được biểu hiện thành ký hiệu gồm 1 số và 2 ký tự theo thứ tự độ giãn nở, chất lượng ICM và chất lượng TE (4AA hoặc 3AB). Một số trung tâm còn có thể chia thành các thang đánh giá D hoặc thậm chí E cho các phôi có chất lượng xấu hơn.





Early blastocyst



Early blastocyst



1AB



2BB



2BC



3BB



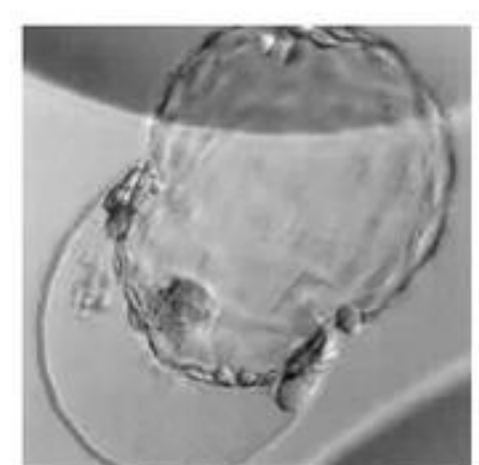
4AA



4AB



4BB



5AA



6AA

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Phương pháp: mô tả cắt ngang.
- Đối tượng: tất cả những ca thực hiện IVF vào ngày chọc hút trứng, số lượng trứng thu nhận được từ 10 trứng trở lên, tuổi người vợ (hoặc Donor) dưới 40 tuổi, đồng ý tham gia thực hiện và có ít nhất 4 phôi tốt vào ngày 3.
- Tiêu chuẩn loại trừ: không đạt những tiêu chuẩn trên hoặc không đồng ý tham gia.
- Thời gian: từ ngày 01/01/2012 đến 30/09/2012.

* Tiến hành

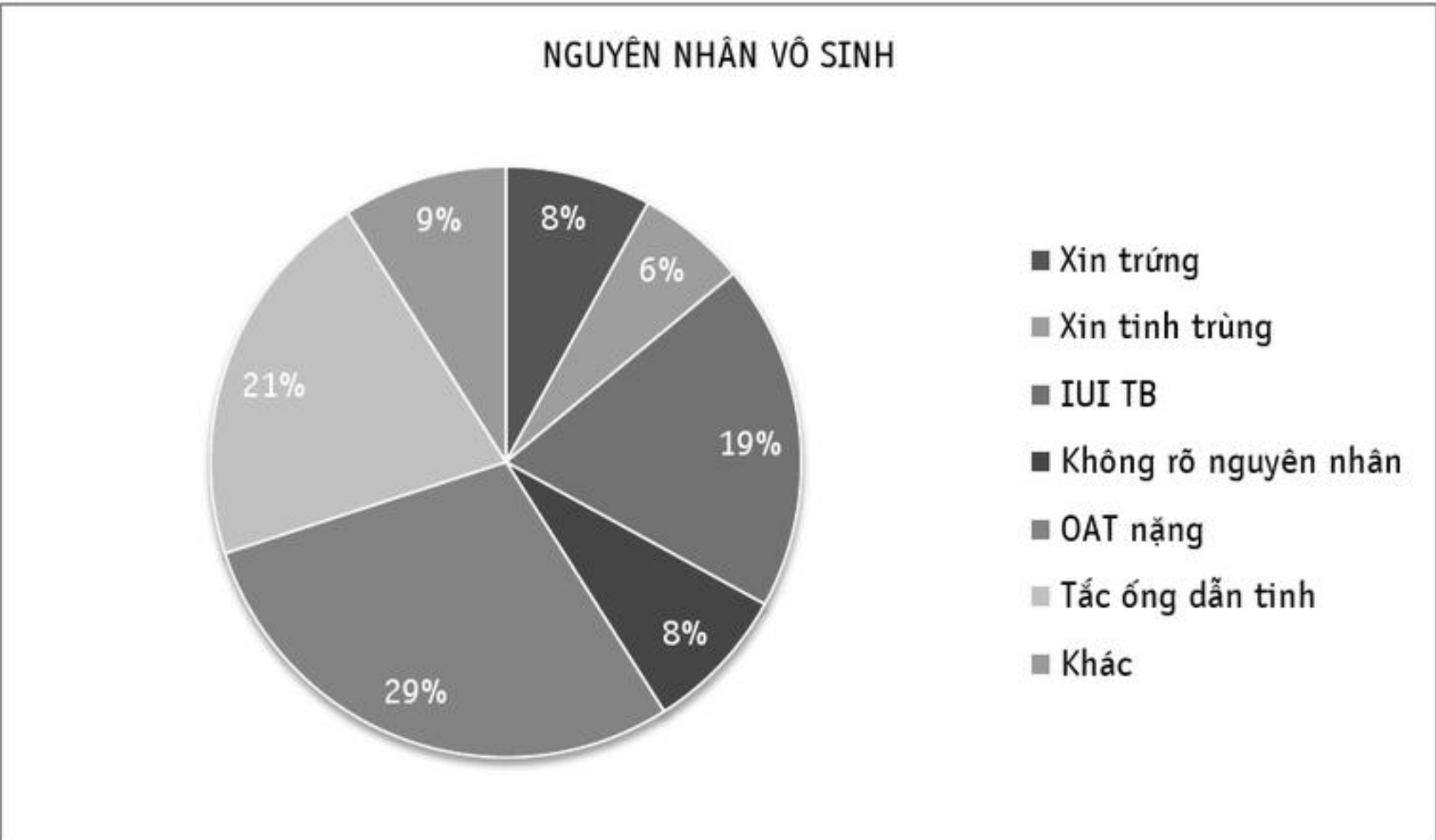
- Làm các bước tương tự qui trình chọc hút trứng (bắt đầu lúc 8 giờ sáng), ICSI 4-5 giờ sau và nuôi cấy trứng sau chích ICSI.
- Chuẩn bị đĩa cấy (từ ngày 3 đến ngày 5): Vào sáng ngày 3 (68 ± 1 giờ), tiến hành kiểm tra phôi và quyết định chuyển phôi hoặc nuôi cấy tiếp đến blastocyst. Đối với những ca nuôi cấy tiếp đến blastocyst, chúng tôi chia đều 2 nhóm, nửa số phôi hữu dụng được đông vào ngày 3, phân nửa còn lại sẽ được nuôi cấy tiếp, tiến hành tạo đĩa cấy với môi trường G2 plus (hệ thống giọt nuôi cấy nhỏ có phủ dầu). Sau khi để đĩa môi trường trong tủ ủ tối thiểu 2 tiếng cho cân bằng trước khi được sử dụng cho việc nuôi cấy phôi, tiến hành chuyển phôi từ môi trường G1 plus sang môi trường G2 plus.
- Vào sáng ngày 5 (116 ± 1 giờ), tiến hành đánh giá phôi và quyết định số lượng phôi chuyển và phôi đông (nếu có).
- Đối với những phôi không/chưa phát triển thành blastocyst, chúng tôi tiến hành chuyển phôi vào đĩa môi trường G2 plus mới nuôi tiếp đến ngày 6 và tiến hành đánh giá vào sáng ngày 6 (vẫn có thể tiến hành chuyển hoặc đông phôi vào ngày này nếu có phôi blastocyst).



KẾT QUẢ

Bảng 1. Đặc điểm bệnh nhân

Thông số	
Tổng số ca nuôi cấy phôi ngày 5	63
Tuổi trung bình BN ($X \pm SD$)	$30,5 \pm 3,9$
Phác đồ sử dụng	Antagonist
Tổng số ca chuyển phôi	22
Số phôi chuyển ($X \pm SD$)	$1,86 \pm 0,46$
Tỉ lệ chuyển phôi	34,9%



Bảng 2. Kết quả nuôi cấy ngày 5

Thông số	X ± SD	Tỉ lệ (%)
Số noãn chọc hút	17,4 ± 5,2	-
Số phôi hữu dụng vào ngày 3	12,5 ± 4,1	71,7
Số phôi nuôi cấy tiếp ngày 5	6,0 ± 2,0	48,3
Số phôi hữu dụng ngày 5	3,5 ± 2,0	58,7
Số phôi tốt ngày 5	1,3 ± 1,1	36,8
Số phôi hữu dụng ngày 6	4,1 ± 2,0	67,9; p=0,008
Số phôi tốt ngày 6	1,8 ± 1,3	44,6; p=0,08

Bảng 3. Kết quả có thai chuyển phôi ngày 5

Thông số	Số ca (tỉ lệ %)
Chuyển phôi tươi	10 (45,5)
Tỉ lệ làm tổ	34,1
Chuyển phôi đông	10/17 (58,8)
Tỉ lệ có thai tích lũy	20/29 (68,9)

Bảng 4. So sánh tương quan giữa chất lượng phôi ngày 3 và phôi ngày 5

		Ngày 3			Tổng	
		Tốt (A)	Trung bình (B)	Xấu (C)		
Ngày 5	Tốt (1)	46	32	4	82	P _{A1B1} =0,0002 P _{B1C1} =0,0127
	Trung bình (2)	49	71	13	133	P _{A2B2} =0,909 P _{A2C2} =0,0027 P _{B2C2} =0,0013
	Xấu (3)	32	78	55	165	
	Tổng	127	181	72	380	



BÀN LUẬN

Vấn đề nuôi cấy phôi đến ngày 5 đã và đang thực hiện ở rất nhiều trung tâm trên thế giới. Trung tâm chúng tôi đã bắt đầu triển khai từ quý IV năm 2011 và hiện đang dần đi vào ổn định về tỉ lệ có phôi blastocyst hình thành vào ngày 5 (58,7%) tương đương với hầu hết các trung tâm khác và có sự khác biệt nếu nuôi cấy phôi tiếp tục đến ngày 6 (67,9%; $p=0,008$). Nhằm cải thiện hơn nữa hiệu quả chọn lựa phôi ngày 3 sao cho phôi đi đến được giai đoạn phôi ngày 5 với tỉ lệ tối ưu nhất, chúng tôi tiến hành nghiên cứu mối tương quan giữa chất lượng phôi ngày 3 và sự hình thành phôi ngày 5. Việc đánh giá chất lượng phôi dựa theo đồng thuận Alpha vừa ban hành, để có một số liệu khách quan và thống nhất với các trung tâm khác. Ban đầu chúng tôi đánh giá mối tương quan giữa các nhóm phôi tốt, trung bình, xấu của ngày 3 và sự hình thành phôi tốt, trung bình và xấu khi đến ngày 5. Bảng 4 cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nhóm phôi tốt, trung bình và xấu từ ngày 3 đạt được phôi tốt vào ngày 5, nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm phôi tốt so sánh với nhóm phôi trung bình từ ngày 3 đạt được phôi trung bình vào ngày 5. Còn nhóm phôi xấu ngày 3, khả năng đạt được phôi tốt và trung bình vào ngày 5 là rất thấp và khác biệt có ý nghĩa so với hai nhóm phôi còn lại. Như vậy, nên chăng khi chọn lựa phôi để nuôi cấy tiếp, ưu tiên lựa chọn những phôi tốt và trung bình để có khả năng phôi phát triển tiếp tục? Tuy nhiên, với một tỉ lệ #24% số phôi xấu đạt đến giai đoạn phôi ngày 5, chúng ta không nên bỏ hẳn những phôi xấu mà nên tiếp tục nuôi cấy để tăng thêm số lượng phôi cho bệnh nhân.

Chúng tôi cũng thống kê tỉ lệ có thai khi chuyển phôi tươi và chuyển phôi đông, điều đáng ngạc nhiên là tỉ lệ có thai khi chuyển phôi đông cao hơn chuyển phôi tươi, điều này cũng phù hợp với một nghiên cứu mới đây của tác giả Bruce và cộng sự (năm 2011), nhưng do số liệu của chúng tôi còn thấp nên cần có thời gian để đưa ra một kết luận chính xác.

Như trên đã trình bày, việc nuôi cấy phôi tiếp tục đến ngày 6 cho thấy có sự khác biệt về số phôi blastocyst hữu dụng cho chuyển hoặc đông phôi. Đây là một kết quả thống kê chúng tôi nhận thấy khi thực hiện. Do vậy, có nên chăng nuôi cấy tiếp và chuyển phôi ngày 6 nếu như chưa có phôi hữu dụng vào ngày 5?

KẾT LUẬN

Việc nuôi cấy phôi đến ngày 5 là phương pháp lựa chọn những phôi tốt nhất để chuyển cho bệnh nhân, nhằm nâng cao hơn nữa tỉ lệ có thai, giảm số phôi chuyển giúp giảm tỉ lệ đa thai cho bệnh nhân. Lựa chọn những phôi phù hợp vào ngày 3 sẽ giúp tăng tỉ lệ số phôi đạt được đến ngày 5 và nếu tiếp tục nuôi cấy đến ngày 6 sẽ giúp tăng hơn nữa tỉ lệ thành công cho việc nuôi cấy phôi đến giai đoạn blastocyst.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. IVF Blastocyst Pictures & Blastocyst Stage Embryo Grading Photos & Images. www.advancedfertility.com/blastocystimages.
2. Alfarawati S and al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality and embryo gender. Fertil Steril 2011.
3. Bruce S. Shapiro, M.D., Ph.D and al. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. Fertility and Sterility Vol. 96, No. 2, August 2011.
4. David K.Gardner and Michelle Lane. Culture of viable human blastocyst in defined sequential serum-free media. European Society for Human Reproduction and Embryology Human Reproduction Volume 13, Supplement 3, 1998.
5. Gardner DK, Surrey E, Minjarrez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. Fertil Steril 2004, 81:551-555.
6. Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. Cochrane Database Syst Rev. 2012 Jul 11; 7:CD002118.
7. Papanikolaou EG and al. Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study. Hum Reprod. 2005 Nov; 20(11):3198-203.



TẠI SAO CẦN CÂN NHẮC KHI TRIỂN KHAI NUÔI CẤY PHÔI NANG Ở VIỆT NAM HIỆN NAY?

Hồ Mạnh Tường

CGRH & IVFAS

Y văn thế giới và thực hành lâm sàng hiện nay có khuynh hướng ủng hộ nuôi cấy phôi nang do nhiều lý do chính:

1. Có thể chọn lựa được phôi tốt, loại bỏ các phôi chất lượng kém
2. Phôi được đưa vào buồng tử cung ở thời điểm phù hợp sinh lý hơn

Qua đó, giúp tăng tỉ lệ có thai và giảm tỉ lệ đa thai.

Tuy nhiên, trước khi áp dụng nuôi cấy phôi nang, mỗi trung tâm cần nhìn nhận vấn đề một cách toàn diện và cân nhắc đầy đủ các vấn đề trên cơ sở khoa học và thực tiễn để có chiến lược phù hợp cho việc triển khai nuôi cấy phôi nang, cũng như tư vấn phù hợp cho bệnh nhân.

MỘT SỐ VẤN ĐỀ CẦN CÂN NHẮC TRƯỚC KHI THỰC HIỆN NUÔI CẤY PHÔI NANG, ĐẶC BIỆT LÀ MỘT TRUNG TÂM TRONG ĐIỀU KIỆN VIỆT NAM

1. Cơ sở lý luận về sinh lý về nuôi cấy phôi nang có hoàn toàn đúng không?
2. Bằng chứng y học về vấn đề nuôi cấy phôi nang hiện nay như thế nào?
3. Ảnh hưởng của nuôi cấy phôi nang lên chất lượng, sự phát triển của thai và em bé sau này?
4. Các bất lợi khi nuôi cấy phôi nang ở Việt Nam là gì?
5. Có cách cải thiện kết quả nào tốt hơn là nuôi cấy phôi nang không?



Chúng tôi sẽ lướt qua những vấn đề trên để trình bày các ý kiến liên quan, làm cơ sở cho việc thảo luận sâu về vấn đề này.

CƠ SỞ LÝ LUẬN CỦA NUÔI CẤY PHÔI NANG CÓ HOÀN TOÀN CHÍNH XÁC?

- Môi trường của buồng tử cung và nội mạc tử cung có thể không phù hợp với phôi giai đoạn phân chia, nếu so với môi trường vòi trứng. Tuy nhiên, không có gì đảm bảo môi trường nhân tạo trong đĩa cấy sẽ tốt hơn so với môi trường buồng tử cung. Nói cách khác, có chắc chắn là phôi sẽ phát triển tốt hơn trong môi trường nhân tạo trong lab IVF so với trong môi trường tự nhiên của buồng tử cung hay không?
- Cơ sở lý luận của nuôi cấy phôi nang dựa trên sinh lý của một chu kỳ bình thường. Trong chu kỳ IVF, toàn bộ môi trường sinh lý của cơ thể đều bị sai lệch do quá trình kích thích buồng trứng làm tăng quá mức nồng độ các nội tiết tố trong máu, đặc biệt là nội tiết tố steroid. Trong đó, nội mạc tử cung có khuynh hướng phát triển nhanh hơn. Do đó, chưa chắc là môi trường buồng tử cung vào ngày 2/3 trong chu kỳ IVF thật sự bất lợi cho sự phát triển của phôi.
- Phôi người từ ngày 3 trở đi có nhu cầu về chuyển hóa nhiều hơn và có sự hoạt hóa của bộ gen. Do đó, việc nuôi cấy phôi kéo dài phức tạp hơn và có thể ảnh hưởng nhiều đến sự phát triển của phôi sau này.
- Trung bình, hơn 50% số phôi IVF không phát triển được đến blastocyst. Số liệu về phân tích nhiễm sắc thể các phôi phát triển được đến phôi nang gần đây cho thấy khoảng 50% phôi nang có bất thường về số lượng nhiễm sắc thể.

BẰNG CHỨNG Y HỌC VỀ HIỆU QUẢ CỦA NUÔI CẤY PHÔI NANG

Báo cáo phân tích gộp và tổng quan hệ thống công bố gần đây của Glujovsky và cộng sự trên thư viện Cochrane năm 2012 đã cung cấp các chứng cứ mới nhất về hiệu quả của phác đồ nuôi cấy phôi kéo dài. Báo cáo này tổng hợp số liệu của 23 nghiên cứu với hơn 3.000 bệnh nhân để đánh giá hiệu quả của nuôi cấy phôi nang so với phôi ngày 2 hoặc ngày 3. Đây là báo cáo lớn nhất từ trước đến nay. Hiện tại, Thư viện Cochrane được xem là chứng cứ y học đáng tin cậy nhất.

Kết luận của các tác giả cho thấy tỉ lệ có thai lâm sàng giữa một lần chuyển phôi sớm và chuyển phôi nang là tương đương. Chuyển phôi nang có thể giúp tỉ lệ có

thai sinh sống tăng nhẹ. Tuy nhiên, chuyển phôi nang đi kèm với nhiều bất lợi hơn, bao gồm:

- Nhiều nguy cơ không có phôi để chuyển hơn do các phôi bị ngưng nửa chừng. Nguy cơ này tăng khoảng 3 lần so với chuyển phôi sớm.
- Chỉ còn 1/3 cơ hội còn phôi dư để trữ lạnh so với chuyển phôi sớm.
- Tỷ lệ có thai cộng dồn, tính chung cả chuyển phôi tươi và chuyển phôi đông lạnh chỉ bằng khoảng 2/3 so với chuyển phôi sớm.

Dữ liệu này cho thấy, nói chung, nuôi cấy phôi nang làm giảm cơ hội có thai của bệnh nhân.

ẢNH HƯỞNG CỦA NUÔI CẤY PHÔI NANG LÊN SỰ PHÁT TRIỂN CỦA THAI VÀ EM BÉ SAU NÀY

- Sự biểu hiện và hoạt hóa của bộ gen (epigenetics) của phôi được quyết định và diễn ra ở phôi người ngày thứ 3 trở đi. Tác động bất lợi của môi trường nhân tạo có thể ảnh hưởng lên các quá trình quan trọng này và gây bất thường cho thai và trẻ sinh ra.
- Số liệu công bố gần đây của Mỹ, thống kê hơn 69.039 trẻ sinh từ IVF, cho thấy trẻ sinh ra từ cấy phôi phân chia tốt hơn so với trẻ sinh từ cấy phôi nang. Tỷ lệ sinh non và sinh nhẹ cân giảm ở nhóm phôi phân chia, trong khi nhóm chuyển phôi nang là nhóm dễ ra có tiên lượng sản khoa tốt hơn. Sự khác biệt này được thấy ở cả 2 nhóm đơn thai và song thai.
- Nuôi cấy phôi nang có thể làm tăng tỷ lệ song thai cùng trứng.
- Ảnh hưởng lâu dài của nuôi cấy phôi nang lên sự phát triển của trẻ, nếu có, chỉ có thể phát hiện trong tương lai, khi có nhiều trẻ sinh ra từ phôi nang trưởng thành.

CÁC BẤT LỢI KHI NUÔI CẤY PHÔI NANG Ở VIỆT NAM LÀ GÌ?

- Đa số các trung tâm chưa có hệ thống nuôi cấy phôi mạnh và ổn định do thiếu nhân sự có kinh nghiệm, thiết bị hoạt động không ổn định. Với một số trung tâm, phác đồ lâm sàng chưa ổn định, điều này thể hiện ở tỷ lệ có thai và tỷ lệ làm tổ thấp.



- Không kiểm soát được rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi: kiểm soát chính xác các thông số của tủ cấy, chất lượng không khí, chất lượng khí chuyên dụng (CO_2 , N_2), chất lượng dụng cụ tiêu hao, sự ổn định của môi trường nuôi cấy, trình độ chuyên viên... Trong điều kiện như thế, việc nuôi cấy phôi dài ngày sẽ có nhiều nguy cơ cho sự phát triển, khả năng sống và các rối loạn epigenetics ở phôi.
- Tăng chi phí đầu tư: đào tạo nhân sự, tủ cấy, dụng cụ tiêu hao, hóa chất môi trường... Hiện nay, chi phí của IVF ở Việt Nam đã khá cao, tăng chi phí làm tăng gánh nặng điều trị. Trong khi đó, hiệu quả nuôi cấy phôi nang chưa thể chứng minh rõ ràng, thậm chí có thể làm giảm cơ hội có thai của bệnh nhân.
- Điều chỉnh qui trình chuyển phôi: bệnh nhân có thể đến nhiều lần hơn, bị động hơn, tư vấn nhiều hơn. Điều này tạo nguy cơ sai sót, nhầm lẫn giữa nhân viên và bệnh nhân.
- Đa thai sau IVF hiện nay chưa là vấn đề lớn ở Việt Nam. Do đó, hiệu quả giảm đa thai do chuyển phôi nang là không nhiều.
 - Giảm thai được chấp nhận về phía chuyên môn và cộng đồng. Kỹ thuật được hiện hiệu quả và an toàn ở hầu hết các trung tâm.
 - Hầu hết bệnh nhân muốn song thai. Chi phí chăm sóc thai kỳ và sơ sinh của song thai không cao.

CÓ HƯỚNG PHÁT TRIỂN NÀO KHÁC TỐT HƠN NUÔI CẤY PHÔI NANG KHÔNG?

- Cải tiến hệ thống nuôi cấy phôi kèm với cải thiện các qui trình lâm sàng.
- Tìm các tiêu chí đánh giá phôi phân chia chính xác hơn.
 - Kết hợp nhiều chỉ tiêu: noãn, hợp tử, phôi.
 - Các tiêu chuẩn động của phôi phân chia: thời điểm, tốc độ phân chia.
- Chọn lựa tinh trùng tốt hơn.
- Điều chỉnh phác đồ hỗ trợ hoàng thể.
- Giảm con co và tăng tưới máu nội mạc tử cung.

- Nếu làm tốt, chuyển phôi giai đoạn phân chia có thể cho tỉ lệ có thai và tỉ lệ có thai dồn cao.

KẾT LUẬN

- Chuyển phôi nang chưa cho thấy hiệu quả rõ ràng. Các số liệu gần đây cho thấy hiệu quả có thể kém hơn cả về tỉ lệ có thai và kết quả sản khoa.
- Hệ thống nuôi cấy phôi của đa số các trung tâm còn chưa tốt. Việc nuôi cấy phôi kéo dài có thể làm tăng chi phí và giảm hiệu quả điều trị.
- Cần cải thiện các quy trình lâm sàng và lab thật tốt để có tỉ lệ có thai và tỉ lệ làm tổ với phôi phân chia cao và ổn định. Sau đó, có thể bắt đầu triển khai nuôi cấy phôi nang ở một số chỉ định tiềm năng.



KẾT QUẢ THAI CỦA CHUYỂN PHÔI NGÀY 2 Ở CÁC TRƯỜNG HỢP TIÊN LƯỢNG TỐT

Lê Hoàng Anh, Lâm Anh Tuấn, Hồ Mạnh Tường

IVFAS, CGRH

MỞ ĐẦU

Hiện nay, ở các trung tâm hỗ trợ sinh sản trên toàn thế giới, chuyển phôi cho bệnh nhân có thể được thực hiện vào ngày 2/ngày 3 (phôi giai đoạn phân chia) hoặc phôi ngày 5/ngày 6 (phôi nang). Những cải thiện của hệ thống nuôi cấy phôi hiện nay đã dần dần hình thành xu hướng mới trong chuyển phôi là chuyển phôi giai đoạn phôi nang thay cho chuyển phôi giai đoạn phân chia trong những trường hợp nhóm bệnh nhân có tiên lượng tốt.

Cơ sở lý luận của xu hướng này là môi trường tử cung thích hợp cho sự phát triển của phôi nang, trong khi phôi giai đoạn phân chia phù hợp với môi trường sinh lý tự nhiên ở vòi trứng hơn. Việc nuôi cấy phôi kéo dài cũng được cho là giúp các chuyên viên phôi học có điều kiện lựa chọn phôi có sức sống tốt nhất để chuyển cho bệnh nhân. Tuy nhiên, các số liệu gần đây trên y văn không giúp chứng minh ưu điểm của nuôi cấy phôi nang trong thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON), ngay cả ở những trường hợp tiên lượng tốt.

Gần đây, một số trung tâm ở Việt Nam đã báo cáo kết quả bước đầu của nuôi cấy phôi nang ở những trường hợp tiên lượng tốt. Tuy nhiên, chưa có báo cáo nào về kết quả có thai của chuyển phôi giai đoạn phân chia cho những trường hợp tiên lượng tốt. Việc so sánh các kết quả này sẽ góp phần định hướng cho việc phát triển kỹ thuật nuôi cấy phôi nang ở Việt Nam.

MỤC TIÊU

Đánh giá kết quả có thai của chuyển phôi tươi ngày 2 cho những trường hợp tiên lượng khá trở lên.



PHƯƠNG PHÁP

Nghiên cứu hồi cứu, đánh giá kết quả có thai của những trường hợp chuyển phôi ngày 2 có tiên lượng khá trở lên tại IVFAS, Bệnh viện An Sinh.

Đối tượng nghiên cứu là các trường hợp chuyển phôi tươi ngày 2 có tiên lượng khá tốt tại IVFAS trong thời gian từ tháng 01 đến tháng 09 năm 2012.

Tiêu chuẩn nhận:

- Bệnh nhân có tối đa 2 chu kỳ thất bại trước đó
- Bệnh nhân <38 tuổi
- Bệnh nhân có tối thiểu 4 phôi loại I vào ngày 2

Tiêu chuẩn loại:

- Các chu kỳ xin-cho trứng
- Các chu kỳ nuôi trưởng thành trứng non trong ống nghiệm (IVM: In vitro maturation)

Các yếu tố đánh giá kết quả bao gồm:

- Tỷ lệ β hCG dương tính
- Tỷ lệ thai lâm sàng
- Tỷ lệ làm tổ của phôi
- Tỷ lệ đơn thai và song thai

Các số liệu được theo dõi và xử lý bằng phần mềm Excel.

KẾT QUẢ

Từ tháng 01/2012 đến tháng 09/2012, tại IVFAS, có tổng cộng 371 trường hợp thỏa tiêu chuẩn nghiên cứu.

Số lượng phôi chuyển và số lượng phôi tốt chuyển trung bình lần lượt là 3,6 và 3,0.

Tỉ lệ β hCG dương tính và tỉ lệ thai lâm sàng của nhóm này lần lượt là 51,9% và 42,0%.

Tỉ lệ làm tổ của phôi là 21,6% và tỉ lệ có 1 hoặc 2 thai ở nhóm bệnh này là 82,2%.

100% bệnh nhân chuyển phôi giai đoạn phân chia trên đều có phôi trữ lạnh sau khi đã chuyển phôi tươi.

BÀN LUẬN

Kết quả có thai của các trường hợp trong nghiên cứu là khá cao. Ngoài ra, tất cả các trường hợp trên đều có phôi dư đủ điều kiện đông lạnh. Tỉ lệ thai lâm sàng của chuyển phôi rã đông của chúng tôi hiện nay dao động 25-30% (Tỉ lệ β hCG dương tính 35-40%). Do đó, tỉ lệ có thai tích lũy ở nhóm bệnh nhân này còn cao hơn, có thể lên đến 60-70% cho một chu kỳ điều trị.

Quan điểm hiện nay cho rằng việc chuyển phôi giai đoạn phôi nang chỉ có tác dụng hỗ trợ các nhà phôi học và bác sĩ lâm sàng chọn được phôi có sức sống tốt nhất để chuyển phôi, việc nuôi cấy kéo dài không giúp bản thân phôi phát triển tốt hơn. Thực tế, việc nuôi cấy phôi kéo dài trong môi trường nhân tạo có thể gây stress lên phôi và làm giảm khả năng sống và làm tổ của phôi.

Những cặp vợ chồng điều trị hiếm muộn được chỉ định chuyển phôi nang có nguy cơ hủy chu kỳ điều trị, do không có phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang hoặc sẽ có số phôi trữ ít hơn rất nhiều so với chuyển phôi giai đoạn phân chia.

So với chuyển phôi nang, chuyển phôi giai đoạn phân chia đơn giản và thuận tiện hơn. Việc nuôi cấy phôi đơn giản, không đòi hỏi nhiều tủ cấy riêng biệt, công việc của lab ít hơn, qui trình đối với bệnh nhân đơn giản hơn, tác động của sự không ổn định của hệ thống nuôi cấy lên kết quả ít hơn.

Trong nuôi cấy phôi nang, để kết quả nuôi cấy ổn định, tỉ lệ phát triển phôi nang cao, duy trì khả năng sống của phôi và giảm các tác động bất lợi lên quá trình phát triển của phôi in vitro, đòi hỏi phải có một hệ thống nuôi cấy phôi hoàn chỉnh với các qui trình kiểm soát chất lượng tốt. Chi phí đầu tư cho hệ thống này là rất tốn kém.

Số lượng phôi chuyển ở chuyển phôi giai đoạn phân chia cao hơn so với chuyển phôi nang, số phôi chuyển trung bình 2-4 phôi tùy thuộc vào độ tuổi của bệnh nhân, nguyên nhân vô sinh và tổng số chu kỳ điều trị trước đó. Do đó, đa thai có



thể là một vấn đề đối với chuyển phôi giai đoạn phân chia. Tuy nhiên, ở Việt nam, kỹ thuật giảm thai được chấp nhận và áp dụng rộng rãi. Các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) đều có thể áp dụng kỹ thuật này với tỉ lệ thành công cao. Do đó, đây có thể không phải là một vấn đề lớn của hỗ trợ sinh sản ở Việt Nam hiện nay.

Chi phí triển khai nuôi cấy phôi nang ở Việt Nam có thể rất tốn kém nếu đầu tư đúng mức:

- Nhân sự
- Trang thiết bị
- Dụng cụ tiêu hao, hóa chất, môi trường
- Hệ thống kiểm soát chất lượng
- Thay đổi trong qui trình tư vấn bệnh nhân về ngày chuyển phôi

Điều này càng làm tăng chi phí TTTON vốn đã khá cao so với thu nhập bình quân hiện nay ở Việt Nam.

Bảng 1. Kết quả chuyển phôi ngày 5 đã báo cáo ở Việt Nam

	Chuyển phôi ngày 5			Chuyển phôi ngày 2 tại IVFAS
	Minh và cs. (2012)	Tuyền và cs. (2012)	Hiền và cs. (2012)	Anh và cs. (2012)
Số trường hợp	N=175	N=24	N=99	N=371
Số phôi chuyển trung bình	3,5 ± 1	-	1,4 ± 0,9	3,6 ± 0,5
Tỉ lệ βhCG	46,24%	-	49,5%	51,9%
Tỉ lệ thai lâm sàng	42,85%	38,9%	43,9%	42,0%
Tỉ lệ làm tổ	14,05%	34,5%	26,1%	21,6%
Tỉ lệ bệnh nhân có phôi trữ lạnh	-	-	-	100%

Theo kết quả của một số báo cáo về chuyển phôi ngày 5 mới nhất tại các hội nghị khoa học trong nước, chúng tôi nhận thấy số phôi nang chuyển một số nơi còn nhiều, tỉ lệ phôi làm tổ chưa cao và kết quả thai lâm sàng không khác biệt so với báo cáo của chúng tôi. Thật sự, nếu tính cả kết quả chuyển phôi trữ, chúng tôi có thể đạt tỉ lệ có thai dồn cao hơn nhiều.

Dựa vào kết quả và các phân tích trên chúng tôi cho rằng các trung tâm TTTON hiện nay ở Việt Nam cần đầu tư cải thiện qui trình TTTON và hệ thống nuôi cấy phôi để cải thiện kết quả điều trị của chuyển phôi giai đoạn phân chia. Ngoài ra, hệ thống phân loại, đánh giá noãn, phôi cần được đầu tư để giúp chọn lựa phôi tốt nhất. Các trung tâm đã có qui trình kỹ thuật tốt, kết quả điều trị cao và ổn định với chuyển phôi giai đoạn phân chia có thể nghiên cứu triển khai nuôi cấy phôi nang.

KẾT LUẬN

Kết quả có thai là khá cao khi chuyển phôi ngày 2 ở nhóm bệnh nhân tiên lượng khá trở lên. Kết quả này có thể tương đương với các kết quả nuôi cấy phôi nang đã báo cáo ở Việt Nam. Nếu tính tỉ lệ có thai dồn, kết quả có thai khi chuyển phôi ngày 2 có thể cao hơn.

Việc triển khai nuôi cấy phôi nang ở Việt Nam hiện nay khá tốn kém, có thể chưa phù hợp và không cải thiện đáng kể tỉ lệ thành công của TTTON.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ariel Weissman et al. Blastocyst culture and transfer: lessons from an unselected, difficult IVF population. RBM Online, 2008, Vol 17, No 2, 220-228.
2. Basak Balaban. Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. RBM Online, 2004, 8(6):695-700
3. Claude Giogetti. Early Cleavage: an additional predictor of high implantation rate following elective single embryo transfer.
4. Dermián Glujovsky et al. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology (Review). The Crochane Library 2012, Issue 7.
5. Edwards RG, Brody SA. History and ethics of assisted human conception. In: Principles and Practice of Assisted Human Reproduction, Philadelphia: WB Saunders, 1995, 17-47.



6. Fanchin R et al. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfer, *Hum Reprod*, 2001, 16:1115-1119.
7. Gardner DK et al. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells, *Fertil Steril*, 1996, 65 (2):349-353.
8. Gábor Vajta et al. Embryo culture: can we perform better than nature?, *RBM online* (2010), 20, 453-469.
9. Laverge H et al. A prospective, randomized study comparing day 2 and day 3 embryo transfer in human IVF, *Hum Reprod*, 2001, 16(3):476-480.
10. Lynette Scott. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development, *RBM Online*, 2003, 6(2):201-214.
11. Magli MC et al. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocyst in vitro, *Hum Reprod*, 2000, 15:1781-1786.
12. Mariabeatrice Dal Canto et al. Cleavage kinetics analysis of human embryos predict development to blastocyst and implantation. *RBM Online*, 2012, 25:474-480.
13. Phillipe Terriou. Relationship between even early cleavage and day 2 embryo score and assessment of their predictive value for pregnancy. *RBM Online*, 2007, 14(3):294-299.

BÁO CÁO POSTER



TÀNG KIM HOÀNG VĂN

tangkimhoangvan@yahoo.com.vn

ĐƠN VỊ CÔNG TÁC

Khoa Hiếm muộn, Bệnh viện Hùng Vương

BẰNG CẤP CHUYÊN MÔN

2005-2009 Cử nhân Công nghệ sinh học, Đại học Mở TPHCM

CHỨNG CHỈ / CHỨNG NHẬN

04-06/2011 Chứng chỉ Kiến thức và Kỹ năng cơ bản trong labo hỗ trợ sinh sản, Khoa Y, Đại học Quốc gia TPHCM

QUÁ TRÌNH LÀM VIỆC VÀ NƠI CÔNG TÁC

07/2011-nay Nhân viên Phòng xét nghiệm Nam khoa, Khoa Hiếm muộn, Bệnh viện Hùng Vương

05/2010-06/2011 Nhân viên labo IVF, Khoa Hiếm muộn, Bệnh viện Hùng Vương

BÀI ĐĂNG TẠP CHÍ, SÁCH VÀ BÁO CÁO KHOA HỌC

1. Đánh giá hiệu quả của các kỹ thuật trữ đông tinh trùng. Báo cáo poster, 07/2012
2. Khảo sát đặc điểm bệnh nhân vô sinh nam đến khám và điều trị tại Khoa Hiếm muộn, Bệnh viện Hùng Vương. Báo cáo poster, 06/2012
3. ROS và vô sinh nam. Báo cáo poster, 04/2012



4. Tổng kết quá trình triển khai tinh dịch đồ theo chuẩn WHO 2010 tại Khoa Hiếm muộn. Đồng tác giả báo cáo hội trường. Bệnh viện Hùng Vương, 01/01/2012-30/04/2012.
5. Sổ tay xét nghiệm và xử lý tinh dịch người, 2010
6. Thử nghiệm tinh dịch đã phân tách (sorted semen) để sản xuất phôi bò in vitro. Luận văn tốt nghiệp đại học, 2009

CÁC HOẠT ĐỘNG CHUYÊN NGÀNH KHÁC

Hội viên Hội Nội tiết sinh sản và Vô sinh TPHCM (HOSREM)

HÌNH DẠNG TINH TRÙNG VÀ PHÂN MẢNH DNA

Tăng Kim Hoàng Văn, Lâm Sơn Bích Trâm, Lê Đăng Khoa, Vũ Đình Tuấn

Bệnh viện Hùng Vương

ĐẶT VẤN ĐỀ

Phân tích tinh dịch theo tiêu chuẩn nghiêm ngặt, thông qua đánh giá các thông số như mật độ, độ di động, hình dạng bình thường của tinh trùng đến nay vẫn được xem là một công cụ hữu ích và cho phép đánh giá chức năng bình thường của tinh trùng. Tuy nhiên, các thông số này không phải lúc nào cũng đánh giá đúng tính toàn vẹn DNA của tinh trùng khi mà các tinh trùng có phân mảnh DNA (dạng bất thường DNA phổ biến) có thể sống, di động và có hình thái bình thường. Với sự phát triển của các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản, đặc biệt là sự ra đời của ICSI, cho phép vượt qua các rào cản tự nhiên trong thụ tinh, các tinh trùng có phân mảnh DNA có khả năng được tiêm vào trứng làm giảm tỉ lệ thụ tinh, phát triển bình thường của phôi và thai nhi. Do đó, chọn lựa tinh trùng có hình dạng nào có tỉ lệ phân mảnh DNA thấp nhất đóng vai trò quan trọng trong kỹ thuật ART.

MỤC TIÊU

Xác định mối tương quan giữa hình dạng và mức độ phân mảnh DNA của tinh trùng.

PHƯƠNG PHÁP

Tổng quan y văn.



KẾT QUẢ

Phân mảnh DNA ở tinh trùng có hình dạng bình thường ở những người có khả năng bình thường

Việc có hay không phân mảnh DNA ở những người bình thường đã được Saleh và cộng sự nghiên cứu vào năm 2004. Theo kết quả này, nam giới có các thông số tinh dịch cơ bản bình thường vẫn có thể có bất thường về tổn thương DNA.

Do đó, phân mảnh DNA là hiện tượng phổ biến ở tinh trùng nên vấn đề quan tâm là hình dạng nào của tinh trùng có tỉ lệ phân mảnh DNA thấp nhất. Giải đáp vấn đề này, Nasrin Sheikh và cộng sự (2008) thực hiện nghiên cứu mối tương quan giữa tỉ lệ phân mảnh DNA ở 75 người có khả năng sinh sản bình thường với các thông số tinh dịch đồ, kết quả cho thấy không có sự khác biệt về tỉ lệ phân mảnh DNA ở tất cả các hình dạng của tinh trùng. Kết quả tương tự cũng được Avendano và cộng sự (2009) xác nhận.

Ngoài ra, tinh trùng có hình dạng bình thường vẫn có bất thường về DNA (Celik Ozanci và cs., 2004), do đó, kích thước và hình dạng tinh trùng không phải là yếu tố đáng tin cậy để chọn lựa tinh trùng cho ICSI trong trường hợp vô sinh không do yếu tố nam. Vấn đề cần quan tâm trong trường hợp này là xác định tỉ lệ phân mảnh DNA trong toàn bộ mẫu tinh trùng của người nam.

Mối tương quan giữa phân mảnh DNA ở tinh trùng của những người nam vô sinh

Nghiên cứu của Nasrin Sheikh và cộng sự (2008) cũng chỉ ra rằng, tổn thương DNA ở những người nam vô sinh cao hơn đáng kể so với những người có khả năng sinh sản bình thường.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng có mối tương quan nghịch về mức độ tổn thương DNA của tinh trùng ở những người nam vô sinh với các thông số như mật độ, độ di động và hình dạng bình thường trong phân tích tinh dịch thường qui (Irvine và cs., 2000; Sun và cs., 1997), trong đó, tinh trùng có hình dạng bất thường có nhiều tổn thương DNA hơn những tinh trùng có hình dạng bình thường (Zini và cs., 2009).

Tỉ lệ phân mảnh DNA ở các dạng bất thường của tinh trùng ở những người nam vô sinh

Barbara Darin (2010) xác định mối quan hệ giữa hình thái bất thường của tinh trùng, phân mảnh DNA và tỉ lệ thụ tinh trong ICSI. Kết quả cho thấy tinh trùng đầu bất định có mức độ phân mảnh DNA cao hơn so với các dạng tinh trùng khác.

Các nghiên cứu khác cũng khuyến cáo không nên lựa chọn tinh trùng đầu dài, thường liên quan đến sự phát triển bất thường của acrosome (Menkveld R và cs., 1991) và sự gia tăng tỉ lệ dị bội nhiễm sắc thể (NST) của tinh trùng (Prisant N và cs., 2007), để lựa chọn cho ICSI.

Tinh trùng có không bào ở nhân đã được nhiều tác giả phát hiện có liên quan đến thất bại trong đóng gói DNA của tinh trùng (Franco và cs., 2008; Garolla và cs., 2008; Perdrix và cs., 2011). Do đó, các tác giả khuyến cáo không nên sử dụng những tinh trùng này trong ICSI.

Nghiên cứu của Muratori và cộng sự (2000) cũng phát hiện thấy mối quan hệ giữa bất thường đuôi và sự phân mảnh DNA, trong khi nghiên cứu khác cho thấy có sự tương quan giữa tinh trùng còn sót tế bào chất ở cổ và phân mảnh DNA (Said TM và cs., 2005). Tuy nhiên những bất thường này có thể dễ dàng tránh được trong ICSI.

KẾT LUẬN

Ở những người có khả năng sinh sản bình thường: không có sự khác biệt về tỉ lệ phân mảnh DNA với hình dạng của tinh trùng.

Ở những người nam vô sinh:

- Mẫu tinh trùng có tỉ lệ bất thường đầu cao có mức độ tổn thương DNA cao.
- Các dạng bất thường đầu như đầu dài, đầu bất định và có không bào nhân có tỉ lệ phân mảnh DNA cao và nên tránh sử dụng trong ICSI.
- Tinh trùng có bất thường đuôi, có tế bào chất ở cổ nên tránh trong ICSI.



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Antinori, M., Licata, E., Dani, G., Cerusico, F., Versaci, C., d'Angelo, D., Antinori, S., 2008. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod. Biomed. Online* 16, 835-841.
2. Avendano C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril* 2009; 91:1077-84.
3. Barbara Darin, Alen Goropevnek, Nina Hojnik, Veljko Vlaisavljević. Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. *Arch Gynecol Obstet* (2010) 281:363-367
4. Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosowski, A., Menezo, Y., Barak, Y., 2002. Relationship between human sperm subtle morphological characteristics and IVF-ICSI outcome. *J. Androl.* 23, 1-8.
5. Berkovitz, A., Eltes, F., Lederman, H., Peer, S., Ellenbogen, A., Feldberg, B., Bartoov, B., 2006. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection *Reproductive. BioMed. Online* 12, 634-638.
6. Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di Benedetto D, De Palma A. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod* 2004; 19:2298-302.
7. Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray- Ward P, et al. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod* 2004; 19:2052-9.
8. Franco, J.G., Baruffi, R.L., Mauri, A.L., Petersen, C.G., Oliveira, J.B., Vagnini, L., 2008. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod. Biomed. Online* 17, 42-45.
9. Garolla, A., Fortini, D., Menegazzo, M., De Toni, L., Nicoletti, V., Moretti, A., Selice, R., Engl, B., Foresta, C., 2008. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod. Biomed. Online* 17, 610-616.
10. Hazout, A., Dumont-Hassan, M., Junca, A.M., Cohen Bacrie, P., Tesarik, J., 2006. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod. Biomed. Online* 12, 19-25.
11. Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E et al. (2000). Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 21:903-912
12. Nasrin Sheikh, Iraj Amiri, Marzieh Farimani, Rezvan Najafi, Jafar Hadeie. Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Iranian J of Rep Med* 2008; 6:13-18.

13. Perdrix, A., Travers, A., Chelli, M.H., Escalier, D., Do Rego, J.L., Milazzo, J.P., Mousset-Sime´on, N., Mace´, B., Rives, N., 2011. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Hum. Reprod.* 26, 47-58.
14. Prisant N, Escalier D, SouWt J-C, Morillon M, Schoevaert D, Misrahi M, Tachdjian G (2007). Ultrastructural nuclear defects and increased chromosome aneuploidies in spermatozoa with elongated heads. *Hum. Reprod* 22:1052-1059.
15. Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ, Sikka SC (2005). Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by α -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil Steril* 83:95-103.
16. Saleh, R.A., Agarwal, A., Sharma, R.K., Said, T.M., Sikka, S.C. and Thomas, A.J., Jr. (2003). Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 80:1431-1436.

