

Tỷ lệ hình thành và chất lượng phôi nang trong nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy thấp

Rate of formation and quality of blastocyst in embryo culture with low oxygen levels

Nguyễn Thị Minh*,
Quản Hoàng Lâm**, Nguyễn Việt Tiến*

*Trung tâm Hỗ trợ sinh sản Quốc gia
**Trung tâm Công nghệ phôi, Học viện Quân y

Tóm tắt

Mục tiêu: So sánh tỷ lệ hình thành và chất lượng phôi nang. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu tiền cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng trên 659 phôi chất lượng tốt của 172 bệnh nhân được chia đều vào 2 nhóm nuôi cấy phôi ở điều kiện nồng độ oxy 5% và 20%. Các bệnh nhân đều được sử dụng FSH để kích thích buồng trứng. Chọc hút noãn sau tiêm hCG 36 giờ. Cấy noãn với tinh trùng bằng phương pháp IVF hoặc ICSI. Ở cả hai nhóm đều đánh giá phôi vào ngày 2 để lựa chọn 3 - 6 phôi để nuôi tiếp ngày 3. Bệnh nhân có ≥ 3 phôi tốt ngày 3 sẽ được nuôi tiếp đến ngày 5. **Kết quả:** Kết quả cho thấy đặc điểm bệnh nhân, dự trữ buồng trứng, kết quả kích thích buồng trứng, số lượng phôi không khác nhau ở hai nhóm nghiên cứu. Tỷ lệ trung bình hình thành phôi nang nhóm nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 5% là $90,04\% \pm 17,86\%$ cao hơn có ý nghĩa thống kê so với $74,44\% \pm 26,63\%$ ở nhóm nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 20% (với $p=0,0001$). Tỷ lệ phôi nang có chất lượng tốt ở nhóm nuôi cấy phôi nồng độ oxy 5% là $79,90\% \pm 26,04\%$ cao hơn có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ phôi nang có chất lượng tốt ở nhóm nuôi cấy phôi nồng độ oxy 20% là $73,61\% \pm 35,30\%$ (với $p=0,02$). **Kết luận:** Tỷ lệ hình thành phôi nang và chất lượng phôi nang ở nhóm nuôi cấy phôi nồng độ oxy 5% là cao hơn có ý nghĩa thống kê so với ở nhóm nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 20%.

Từ khóa: Phôi nang, chất lượng phôi nang, nồng độ oxy thấp trong nuôi phôi.

Summary

Objective: To compare rates of formation and quality of embryos. **Subject and method:** The patients were using FSH to stimulate ovaries. Oocytes retrieval after hCG injection 36 hours. Fertilization by conventional IVF or ICSI. In both groups, in day 2, 3 - 6 embryos were selected to culture in day 3. Patients with ≥ 3 good quality embryos in day 3 will be grown in the next 5th day. **Result:** There was not differences of characteristic, ovarian reserve, ovarian stimulation and embryos transfer in both groups. Embryo formation rate (%) in 5% oxygen concentration group was $90.04\% \pm 17.86\%$ significantly higher than $74.44\% \pm 26.63\%$ in 20% oxygen concentration group ($p=0.0001$). The percentage of good quality embryos cultured in 5% oxygen concentration group was $79.90\% \pm 26.04\%$ higher than $73.61\% \pm 35.30\%$ in 20% oxygen concentration group ($p=0.02$). **Conclusion:** The rate of formation embryos cultured in 5% oxygen concentration group was significantly higher than in 20% oxygen group.

Keywords: Formation rate and embryos quality, low oxygen levels.

Ngày nhận bài: 03/5/2018, ngày chấp nhận đăng: 30/5/2018

Người phản hồi: Nguyễn Thị Minh, Email: minh77@gmail.com - Trung tâm Hỗ trợ sinh sản Quốc gia

1. Đặt vấn đề

Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh, chuyển phôi nang gần với sinh lý hơn và lựa chọn được những phôi có chất lượng tốt, khả năng sống cao, giúp hạn chế số lượng phôi chuyển nhưng vẫn đảm bảo tăng tỷ lệ làm tổ, tỷ lệ có thai, tỷ lệ trẻ sinh sống do đó tránh được hiện tượng đa thai trong thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) [2], [3], [8]. Tuy nhiên, nuôi cấy phôi nang có nguy cơ không có phôi chuyển hoặc giảm số lượng phôi trữ lạnh do nuôi cấy dài có khả năng các phôi ngừng phát triển hoặc thoái hóa nếu điều kiện nuôi cấy không tốt [6]. Mặc dù, có sự cải tiến về môi trường nuôi cấy nhưng nuôi cấy phôi nang theo truyền thống ở nồng độ oxy trong không khí, tỷ lệ phôi tốt ở giai đoạn phân chia phát triển đến giai đoạn phôi nang chỉ vào khoảng 59 - 69% [1]. Để tăng tỷ lệ hình thành và chất lượng phôi nang một số nghiên cứu trên thế giới đã tiến hành nuôi cấy phôi nang nồng độ oxy thấp 5% để tương ứng với điều kiện oxy trong lòng vòi tử cung và tử cung vào khoảng 2 - 8%. Tuy nhiên, các kết quả vẫn còn chưa thống nhất. Tại Việt Nam, hầu hết các trung tâm hỗ trợ sinh sản đều sử dụng hệ thống tủ nuôi cấy với nồng độ oxy 20%, chưa có nghiên cứu nào đánh giá hiệu quả nuôi cấy phôi nang ở nồng độ oxy thấp. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu này nhằm góp phần nâng cao tỷ lệ phát triển thành phôi nang trong nuôi cấy phôi TTTON với mục tiêu: *So sánh tỷ lệ hình thành phôi nang và chất lượng phôi nang được nuôi cấy ở nồng độ oxy 5% với nuôi cấy ở nồng độ oxy 20%.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Đối tượng: 659 phôi ngày 3 chất lượng tốt của 172 bệnh nhân IVF được chia đều vào 2 nhóm nghiên cứu (bốc thăm ngẫu nhiên):

Nhóm 1: 314 phôi của 86 bệnh nhân được nuôi cấy ở nồng độ oxy 5%.

Nhóm 2: 345 phôi của 86 bệnh nhân được nuôi cấy ở nồng độ oxy 20%.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Các bệnh nhân thụ tinh trong ống nghiệm có tuổi ≤ 38 , tử cung bình thường không có polyp (siêu âm bơm nước buồng tử cung), ít nhất có 3 phôi chất lượng tốt ngày 3, niêm mạc tử cung 8mm - 14mm, chuyển phôi dễ, không có máu, đồng ý tham gia nghiên cứu.

Thời gian: Từ tháng 6/2011 đến tháng 9/2012.

Địa điểm: Bệnh viện Phụ sản Trung ương.

2.2. Phương pháp

Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng.

Môi trường nuôi cấy: G5 Series™ (Vitrolife, Thụy điển).

Tủ ấm nuôi cấy phôi: Heracell dung tích 150 lít.

Các vật tư tiêu hao đều được kiểm định an toàn và phù hợp cho nuôi cấy phôi người.

Các bệnh nhân được kích thích buồng trứng bằng FSH tái tổ hợp, khi đủ điều kiện sẽ tiêm hCG gây trưởng thành noãn và chọc hút noãn sau mũi tiêm hCG 36 giờ.

Noãn chọc hút ra được cho thụ tinh với tinh trùng bằng phương pháp IVF cổ điển hoặc ICSI.

Đánh giá thụ tinh sau 16 - 18 giờ. Phôi được nuôi cấy đến ngày 2 sẽ lựa chọn 3 - 5 phôi chất lượng tốt để tiếp tục nuôi cấy đến ngày 3, các phôi dư thừa ngày 2 cũng sẽ được trữ lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa (đông phôi ngày 2 được ưu tiên và áp dụng thường quy tại Trung tâm). Phôi được nuôi cấy đến ngày 3 sẽ lựa chọn 3 - 5 phôi chất lượng tốt để tiếp tục nuôi cấy đến ngày 5. Chuyển 2 - 4 phôi vào ngày 5, nếu còn phôi tốt tiếp tục trữ lạnh phôi ngày 5. Ngày 5 đánh giá tỷ lệ hình thành phôi nang, chất lượng phôi nang được đánh giá dựa vào hình

thái của nụ phôi (ICM), lá nuôi phôi (TE) và độ nở rộng của khoang phôi nang chia phôi thành 4 độ: Phôi chất lượng rất tốt (độ 4), phôi chất lượng tốt (độ 3), phôi chất lượng trung bình (độ 2), phôi chất lượng kém (độ 1).

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được thu thập theo mẫu, phân tích số liệu bằng phần mềm SPSS 16.0 và phần mềm Epi info. Sự khác biệt được xem là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm đối tượng

Bảng 1. Đặc điểm bệnh nhân nghiên cứu

Đặc điểm	Nhóm oxy 5%	Nhóm oxy 20%	p
Tuổi trung bình (năm)	30,16 ± 3,6	30,85 ± 3,41	0,202 ^c
FSH ngày 3 (IU/L)	5,65 ± 1,87	5,95 ± 1,8	0,31 ^f
LH ngày 3 (IU/L)	4,53 ± 3,03	5,13 ± 3,06	0,079 ^f
E2 ngày 3 (IU/L)	44,29 ± 40,79	37,1 ± 14,56	0,284 ^f
Số nang thứ cấp	11,23 ± 5,28	10,66 ± 4,51	0,81 ^f

c. T-student test. f. Mann - Withney test.

Bảng 1 cho thấy: Dự trữ buồng trứng của các bệnh nhân trong nghiên cứu còn tốt và không có sự khác biệt về các đặc điểm bệnh nhân giữa hai nhóm bệnh nhân nghiên cứu.

3.2. Đặc điểm và kết quả kích thích buồng trứng

Bảng 2. Đặc điểm và kết quả kích thích buồng trứng

Đặc điểm	Nhóm oxy 5%	Nhóm oxy 20%	p
Tổng liều FSH trung bình (UI)	2176,2 ± 504,9	2166,6 ± 584,3	0,91 ^c
Nồng độ E2 ngày tiêm hCG (UI/L)	6020,1 ± 3185,1	6705,7 ± 7538,7	0,88 ^f
Số noãn trung bình	10,58 ± 3,97	10,86 ± 3,9	0,64 ^c
Số noãn trưởng thành trung bình (MII)	10,42 ± 3,97	10,78 ± 3,87	0,55 ^c
Tỷ lệ thụ tinh (%)	89,3 ± 14,4	91,1 ± 11,9	0,534 ^f
Số phôi trung bình	8,72 ± 3,49	9,4 ± 3,5	0,21 ^c

c. T-student test . f. Mann – Withney test.

Bảng 2 cho thấy: Giữa hai nhóm không có sự khác biệt về tổng liều FSH sử dụng, nồng độ E2 ngày tiêm hCG, số noãn chọc hút được, số noãn trưởng thành, tỷ lệ thụ tinh và số phôi tạo thành giữa hai nhóm nghiên cứu với $p > 0,05$.

3.3. Kết quả nuôi cấy phôi nang nồng độ oxy thấp

Bảng 3. Tỷ lệ phần trăm hình thành phôi nang và chất lượng phôi nang

Đặc điểm	Nhóm oxy 5%	Nhóm oxy 20%	p
----------	-------------	--------------	---

Tổng số phôi ngày 3 nuôi tiếp N5	314	345	0,027 ^f
Trung bình số phôi ngày 3 nuôi tiếp N5	3,7 ± 0,8	4,0 ± 1,1	
Tỷ lệ hình thành phôi nang (%)	90,04 ± 17,86	74,44 ± 26,63	<0,001 ^f
Tỷ lệ phôi nang chất lượng tốt và rất tốt (%)	79,90 ± 26,04	73,61 ± 35,30	0,002 ^f

f. Mann - Withney test

Bảng 3 cho thấy: Số phôi trung bình ngày 3 nuôi tiếp ngày 5 của hai nhóm khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Về chất lượng phôi, tỷ lệ hình thành phôi nang và tỷ lệ phôi nang đạt chất lượng tốt và rất tốt (phôi độ 4 và độ 3) của nhóm nuôi cấy phôi nồng độ oxy 5% cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm nuôi cấy phôi nồng độ oxy 20% với $p < 0,05$.

4. Bàn luận

Phôi được chuyển ở giai đoạn phôi nang được cho là gần với sinh lý tự nhiên hơn, giúp cải thiện tỷ lệ trẻ sinh sống. Hơn nữa, nuôi cấy phôi nang sẽ lựa chọn được phôi tốt hơn để chuyển do đó hạn chế được số lượng phôi chuyển nhằm tránh hiện tượng đa thai trong TTTON.

Tuy nhiên, trong quá trình nuôi cấy có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành và phát triển của phôi trong giai đoạn phân chia sớm (phôi ngày 2, ngày 3) cũng như tỷ lệ hình thành và chất lượng phôi nang (phôi ngày 5). Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã cố gắng cải thiện môi trường nuôi cấy, trang thiết bị, điều kiện nuôi cấy nhằm nâng cao hơn nữa tỷ lệ phôi phát triển, chất lượng phôi và đặc biệt là tỷ lệ hình thành và chất lượng phôi nang.

Mặc dù, hiện tại hầu hết các phòng nuôi cấy phôi tại các trung tâm hỗ trợ sinh sản chủ yếu sử dụng hệ thống nuôi cấy cung cấp oxy với nồng độ tương tự nồng độ oxy trong không khí (~20%) vì không đòi hỏi thêm trang thiết bị. Tuy nhiên, gần đây một số tác giả lại cho rằng nồng độ oxy thấp (~ 5%) mới thật sự hợp sinh lý và tương tự nồng độ oxy trong tử cung và lòng vòi tử cung, và như vậy nếu nuôi cấy phôi ở điều kiện này có

thể cho phôi chất lượng tốt hơn, từ đó cải thiện được kết quả IVF.

Hai nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi đều có độ tuổi và thời gian vô sinh tương đương nhau. Các chỉ số đánh giá dự trữ buồng trứng bao gồm nồng độ FSH, nồng độ LH và số lượng nang thứ cấp cũng tương đương nhau ở cả hai nhóm nghiên cứu với $p > 0,05$ (Bảng 1).

So sánh kết quả kích thích buồng trứng giữa hai nhóm cho thấy không có khác biệt về tổng liều FSH sử dụng, nồng độ estradiol (E2) ngày tiêm hCG, số noãn chọc hút được, số noãn trưởng thành, tỷ lệ thụ tinh và số phôi tạo thành giữa hai nhóm nghiên cứu với $p > 0,05$ (Bảng 2). Như vậy, 2 nhóm trong nghiên cứu này là đồng nhất, đảm bảo tính chính xác và tin cậy của kết quả nghiên cứu.

Bảng 3 cho thấy, số phôi trung bình ngày 3 nuôi tiếp ngày 5 của hai nhóm khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Về chất lượng phôi, tỷ lệ hình thành phôi nang và tỷ lệ phôi nang đạt chất lượng tốt và rất tốt (phôi độ 4 và độ 3) của nhóm nuôi cấy phôi nồng độ oxy 5% cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm nuôi cấy phôi nồng độ oxy 20% với $p < 0,05$ (tương ứng với 79,9% so với 73,41%). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự kết quả nghiên cứu của David BGS và cộng sự (2011), khi nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy thấp cho tỷ lệ hình thành phôi nang cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy trong không khí với $p < 0,05$ (tương ứng 73,2% so với 63,1%) [5]. Một số nghiên cứu khác cũng cho kết quả tỷ lệ hình thành phôi nang khi nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 5% cao hơn tỷ lệ hình thành phôi nang khi nuôi cấy ở nồng độ oxy

trong không khí, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê [5], [7].

Đánh giá về chất lượng phôi, kết quả của chúng tôi nhận thấy, tỷ lệ phôi nang rất tốt và tốt (độ 4, độ 3) ở nhóm nuôi cấy phôi nồng độ oxy 5% cao hơn có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ phôi nang rất tốt, tốt ở nhóm nuôi cấy phôi nồng độ 20% với $p < 0,05$. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Ciray HN và cộng sự (2009) [4].

5. Kết luận

Tỷ lệ hình thành và chất lượng phôi nang được nuôi cấy ở điều kiện nồng độ oxy 5% cao hơn tỷ lệ hình thành và chất lượng phôi nang được nuôi cấy ở điều kiện nồng độ oxy 20% có ý nghĩa thống kê.

Tài liệu tham khảo

1. Ariff B (1999) *Blastocyst culture*. Handbook, Sydney Press Indusprint (S) Pte Ltd: 15-20.
2. Blake D, Farquahar C, Johnson N, Proctor M (2009) *Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception*. Published by John Wiley and Sons, td.
3. Chui-Yee F, Ariff B, Soon-Chye N et al (1997) *Ongoing normal pregnancy after transfer of zona-free blastocysts: implications for embryo transfer in the human*. Human Reproduction 12(3): 557-560.
4. Ciray HN, Aksoy T, Yaramanci K, Karayaka I, Bahceci M (2009) *In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: A prospective randomized survey on sibling oocytes*. Fertil Steril 91: 1459-1461.
5. David BGS, Oliveira JBA (2011) *IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis*. Reproductive Biology and Endocrinology 9: 143 doi 10.1186/1477-7827-9-143.
6. Genetics & IVF Institute (2013) *Blastocyst stage embryo transfer*.
<http://www.givf.com/aboutgivf/library/blastocyst.shtml>
7. Kovacic B, Sajko MC, Vlaisavljevic V (2010) *A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles*. Fertil Steril 94: 511-519.
8. Mark P, Michael JT (2007) *Fewer risks, new hope: The reality of blastocyst transfer*. Copyright IVF. Com, Alanta, GA, USA.