

## EVALUATION OF THE RESULT IN INTRA CYTOPLASMIC SPERM INJECTION IN WOMEN WHO INDICATED CRYOPRESERVATION OF OOCYTE

Duong Thi Nhan<sup>1</sup>, Hua Minh Tuan<sup>1</sup>, Ha Hai Bang<sup>1</sup>, Hua Nguyet Mai<sup>2</sup>, Nguyen Phu Hung<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Thai Nguyen A hospital, <sup>2</sup>TNU - University of Sciences

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Received:</b> 05/5/2021</p> <p><b>Revised:</b> 14/7/2021</p> <p><b>Published:</b> 16/7/2021</p>	<p>In 1986, the first clinical pregnancy using cryopreserved oocytes was reported by Chen et al. Up to now, there have been different studies to evaluate the effectiveness of oocyte freezing in preserving fertility. In Vietnam, the oocyst freezing technique has been carried out since 2003, until now there have not been many research publications on frozen oocytes. The objectives of this study was to evaluate the result in intra cytoplasmic sperm injection in women who indicated cryopreservation of oocyte at A Thai Nguyen Hospital, we used methods of oocyte retrieval, cryopreserved oocyte and thawing oocyte, and analyzing the effect of micro-injection on 174 vitrified oocytes and 117 fresh oocytes. The fertilization rate of the vitrified oocyte was 90.43%, the one of fresh oocyte was 80.48%. The rate of good day 5 embryo between cryopreserved and fresh oocyte was 37.7% and 44.06%, respectively. The rate of ongoing pregnancy of patients transfer embryos from the vitrified oocyte was 33.3%, the fresh oocyte was 41.2%. This study showed that the rate of fertilization and the proportion of day 3 embryo and day 5 embryo between the cryopreserved and the fresh oocytes were similar.</p>
<p><b>KEYWORDS</b></p> <p>Oocyte</p> <p>Sperm</p> <p>Fertilization</p> <p>Cryopreservation of oocyte</p> <p>Fresh oocyte</p> <p>Intra cytoplasmic sperm injection (ICSI)</p>	

## ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ TIÊM TINH TRÙNG VÀO BÀO TƯƠNG NOÃN Ở NHỮNG PHỤ NỮ CÓ CHỈ ĐỊNH TRỮ LẠNH NOÃN

Dương Thị Nhan<sup>1</sup>, Hứa Minh Tuấn<sup>1</sup>, Hà Hải Bằng<sup>1</sup>, Hứa Nguyệt Mai<sup>2</sup>, Nguyễn Phú Hùng<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Bệnh viện A Thái Nguyên, <sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học – ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p><b>Ngày nhận bài:</b> 05/5/2021</p> <p><b>Ngày hoàn thiện:</b> 14/7/2021</p> <p><b>Ngày đăng:</b> 16/7/2021</p>	<p>Năm 1986, Tiến sĩ Christopher Chen đã báo cáo ca sinh đầu tiên từ noãn trữ lạnh. Tới nay đã có các nghiên cứu khác nhau nhằm đánh giá hiệu quả của việc trữ lạnh noãn trong bảo tồn khả năng sinh sản. Tại Việt Nam, kỹ thuật trữ lạnh noãn đã được tiến hành từ những năm 2003, tuy nhiên cho đến nay cũng chưa có nhiều công bố nghiên cứu về noãn trữ lạnh. Mục tiêu trong nghiên cứu này là đánh giá hiệu quả tiêm tinh trùng vào bào tương noãn ở những phụ nữ có chỉ định trữ lạnh noãn tại khoa Hỗ trợ sinh sản bệnh viện A Thái Nguyên. Chúng tôi đã sử dụng các phương pháp thu nhận, đông lạnh và rã đông noãn, đồng thời phân tích hiệu quả sau vi tiêm trên 174 noãn trữ và 117 noãn tươi. Tỷ lệ thụ tinh của noãn trữ là 90,43%, noãn tươi là 80,48%. Tỷ lệ lên phôi tốt ngày 5 giữa noãn trữ và noãn tươi lần lượt là 37,7% và 44,06%. Tỷ lệ thai diễn tiến của nhóm bệnh nhân chuyển phôi từ noãn trữ là 33,3%, noãn tươi là 41,2%. Nghiên cứu này cho thấy rằng tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ lên phôi ngày 3 và phôi ngày 5 giữa những noãn trữ đông và noãn tươi là như nhau.</p>
<p><b>TỪ KHÓA</b></p> <p>Noãn</p> <p>Tinh trùng</p> <p>Thụ tinh</p> <p>Trữ lạnh noãn</p> <p>Noãn tươi</p> <p>Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4455>

\* Corresponding author. Email: hungnguyennphu@tnu.edu.vn

## 1. Đặt vấn đề

Bảo tồn khả năng sinh sản (Fertility preservation- FP) đã trở thành một lĩnh vực hỗ trợ sinh sản mới cung cấp cho phụ nữ khả năng sinh con bằng cách sử dụng các giao tử của chính họ sau khi suy giảm khả năng sinh sản do tuổi tác hoặc sau các liệu pháp chống ung thư [1]. Xu hướng trữ lạnh noãn ngày càng gia tăng với 4 mục đích chính gồm: (1) Thành lập các ngân hàng tế bào trứng trữ lạnh của người hiến tặng, cho phép lớn hơn sự lựa chọn và tính linh hoạt cho những người tương lai nhận tế bào trứng của người hiến tặng [2]; (2) Bảo tồn khả năng sinh sản trước khi can thiệp phẫu thuật hoặc y tế có thể dẫn đến tổn hại dự trữ buồng trứng (ví dụ, gây độc cho tuyến sinh dục phương pháp điều trị ung thư hoặc các tình trạng tự miễn dịch, cắt bỏ buồng trứng hoặc chuyển đổi giới tính) và các điều kiện di truyền có liên quan với sự suy giảm nhanh chóng và sớm trong dự trữ buồng trứng (chẳng hạn như hội chứng Turner) [3]; (3) Trữ lạnh tế bào trứng để đề phòng sự suy giảm khả năng sinh sản do tuổi tác (cũng gọi là “trữ lạnh trứng xã hội”) [4]; (4) Trữ lạnh noãn trong điều trị thụ tinh ống nghiệm bằng liệu pháp thay thế ty thể hoặc trong ngày lấy noãn mà người chồng không lấy được tinh trùng.

Hiện nay có hai phương pháp trữ lạnh noãn được áp dụng là trữ lạnh chậm (slow freezing) và trữ lạnh cực nhanh (thủy tinh hóa – vitrification). Bao gồm các bước chính sau: cho noãn tiếp xúc trực tiếp với chất bảo quản đông lạnh, hạ nhiệt độ, cắt trừ và rã đông. Sự khác biệt chủ yếu là chất bảo quản đông lạnh được sử dụng ở mỗi phương pháp và tốc độ hạ nhiệt độ. Tuy nhiên, phương pháp thủy tinh hóa đã làm tăng đáng kể tỷ lệ sống sót của noãn trữ lạnh so với trữ lạnh chậm thông thường, chính điều này đã gia tăng các chu kỳ trữ lạnh noãn trong điều trị lâm sàng [5]. Năm 2006, Oktay và cộng sự đã tiến hành một phân tích gộp để so sánh hiệu quả của hạ nhiệt độ chậm so với thủy tinh hóa trong trữ lạnh noãn người, các số liệu ban đầu cho thấy thủy tinh hóa có khả năng cải thiện cơ hội thành công [6]. Trong một nghiên cứu ngẫu nhiên có nhóm chứng, Cao và cộng sự cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ noãn sống sau rã đông giữa hai nhóm noãn trữ lạnh bằng hạ nhiệt độ chậm và thủy tinh hóa (61% so với 91,8%,  $p < 0,01$ ) [7]. Tỷ lệ thụ tinh ở hai nhóm là tương đương nhưng tỷ lệ phân chia ở nhóm hạ nhiệt độ chậm là 54,4%, thấp hơn so với 78% ở nhóm thủy tinh hóa. Trong nghiên cứu của Cornet-Bartolome và cộng sự năm 2020 khi đánh giá hiệu quả của quá trình thủy tinh hóa trong 35.654 tế bào trứng anh chị em từ các chu kỳ hiến tặng cho thấy không có sự khác biệt giữa tỷ lệ thai diễn tiến và tỷ lệ trẻ sinh sống với những chu kỳ so sánh ở nhóm trứng được thủy tinh hóa [8].

Những nghiên cứu nhằm cải tiến kỹ thuật trữ lạnh và bảo quản trứng và các nghiên cứu trẻ sinh ra từ noãn trữ lạnh đã dẫn cung cấp những dữ liệu an toàn cho việc trữ lạnh noãn của những phụ nữ có mong muốn sinh con từ noãn của mình vì mục đích xã hội hoặc vì mục đích y tế. Cho đến nay, đã có hàng triệu trẻ sinh ra từ phôi trữ lạnh và trên 1000 trẻ từ kỹ thuật trữ lạnh noãn.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Toàn bộ 174 noãn trữ lạnh và 117 noãn tươi được thu nhận qua các chu kỳ kích thích buồng trứng của 29 bệnh nhân nữ thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm tại khoa Hỗ trợ Sinh sản - Bệnh viện A Thái Nguyên.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp thu nhận noãn

Người phụ nữ được tiêm thuốc kích trứng bắt đầu từ ngày thứ 2 của chu kỳ kinh và tiến hành thu nhận noãn sau khi kích thích nang noãn đạt kích thước tiêu chuẩn dưới siêu âm nang noãn qua đường âm đạo bằng kim lấy noãn chuyên dụng. Các dịch nang được thu nhận và chuyển cho phòng Labo tiến hành tìm và nhặt phức hợp noãn - tế bào hạt – Oocyte cumulus complex (OCC) dưới kính hiển vi soi nổi trong tủ thao tác vô trùng. Hút chuyên khối OCC sang đĩa rửa, tiến hành rửa, đánh giá sơ bộ OCC, nuôi cấy OCC trong tủ cấy tri-gas (37°C, 5% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub>) trong 2h.

Sau đó tách khối OCC bằng môi trường chứa men Hyaruronidase và pipete đầu tù có đường kính nhỏ dần từ 150  $\mu\text{m}$  đến 135  $\mu\text{m}$  để loại bỏ hết tế bào hạt bao quanh noãn, đánh giá chất lượng noãn và sự trưởng thành noãn.

### 2.2.2. Phương pháp trữ lạnh noãn

Trữ lạnh noãn theo phương pháp thủy tinh hoá với môi trường Cryotec [8]. Ghi các thông tin nhận dạng bệnh nhân lên cọng đông noãn và hộp chứa cassette. Chuẩn bị môi trường trữ lạnh Cryotec, để cân bằng với nhiệt độ phòng trong vòng 2 giờ. Nhặt noãn bằng pipete pasteur đặt trong môi trường cân bằng – Equilibrium solution (ES) trong 11 phút để các chất bảo quản đông lạnh – Cryoprotective agent (CPA) thẩm thấu vào noãn. Chuyển phôi sang môi trường thủy tinh hóa – Vitrification solution (VS1, VS2) trong vòng tối đa 60 giây. Hút noãn đặt lên cọng trữ và nhúng lập tức cọng trữ vào nitơ lỏng ở nhiệt độ  $-196^{\circ}\text{C}$ , thời gian hút - đặt noãn không quá 30 giây. Tốc độ làm lạnh đảm bảo  $4000^{\circ}\text{C}/\text{phút}$  để tránh tạo tinh thể đá gây thoái hoá noãn. Cắt cọng chứa noãn vào hộp chứa và bảo quản hộp chứa ngay trong Nitơ lỏng.

### 2.2.3. Phương pháp rã đông noãn

Chuẩn bị môi trường rã đông (Warming Kit, Cryotech) để cân bằng môi trường warming solution (WS) ở nhiệt độ phòng và môi trường TS ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 2 giờ. Kiểm tra tên bệnh nhân ghi trên hộp môi trường rã đông, phiếu thông tin và cọng chứa noãn (cryotop) cần rã đông. Chiết môi trường TS vào đĩa  $\Phi 35\text{mm}$  đã được làm ấm. Nhúng đầu cọng chứa noãn vào môi trường TS, đặt đầu cryotop nằm sát đáy môi trường, kiểm tra số lượng noãn trên cryotop được rã đông so với số noãn ghi trên phiếu theo dõi trữ - rã đông. Thời gian nhúng cọng chứa noãn vào môi trường TS là 1 phút. Hút noãn từ môi trường TS với một lượng môi trường tối thiểu (khoảng cách từ vị trí trứng đến đầu pipete là 2 mm), sau đó thả nhẹ noãn vào lớp giữa môi trường DS ở giếng thứ 1. Để noãn ở môi trường DS và giữ trong 3 phút. Chuyển noãn qua WS ở giếng thứ 3 và giữ trong 5 phút. Chuyển noãn qua WS ở giếng thứ 4 và giữ trong 1 phút. Chuyển noãn từ WS qua môi trường nuôi cấy trong giếng 2 của hộp FET, rửa noãn nhiều lần ở môi trường và chuyển noãn vào giếng 1 của hộp FET để nuôi cấy. Ghi chú số noãn rã đông trên hộp FET, cắt hộp FET có chứa noãn sau rã đông vào tủ cấy  $\text{CO}_2$  cho ổn định.

### 2.2.4. Phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (Intra cytoplasmic sperm injection – ICSI)

Chuẩn bị và kiểm tra hệ thống kính hiển vi soi nổi, hệ thống vi tiêm, vi thao tác, bộ ấm. Đặt tinh trùng và noãn vào đĩa ICSI đã được chuẩn bị trước đó tối thiểu 6 giờ ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{O}_2$ , 6%  $\text{CO}_2$ ). Quan sát, lựa chọn tinh trùng để ICSI, bất động tinh trùng. Hút tinh trùng vào kim vi tiêm. Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn. Noãn sau ICSI được chuyển vào các vi giọt 20 $\mu\text{l}$  môi trường G-TL (Vitrolife) trong hộp nuôi cấy phôi thông thường và nuôi cấy qua đêm ở điều kiện  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{O}_2$ , 6%  $\text{CO}_2$ . Đĩa nuôi cấy phôi là đĩa  $\Phi 35\text{ mm}$  được chuẩn bị với môi trường G-TL (Vitrolife) sau thời điểm ICSI và được cân bằng qua đêm ở điều kiện  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{O}_2$ , 6%  $\text{CO}_2$  để sử dụng cho nuôi cấy hợp tử sau khi kiểm tra thụ tinh.

### 2.2.5. Phương pháp đánh giá thụ tinh, chất lượng phôi

Trong quá trình phát triển của phôi, đánh dấu các thời điểm quan trọng: Xuất hiện 2 tiền nhân đực và cái; Dấu hiệu noãn thụ tinh. Biến mất của 2 tiền nhân; Dấu hiệu hoà hợp nhân, chuẩn bị cho phân bào. Xuất hiện 2, 3, 4, 5, 8 phôi bào. Ghi nhận thời điểm có phân mảnh, tỷ lệ phân mảnh phôi bào. Ghi nhận thời điểm có các bất thường khác như có không bào lớn trong phôi (VAC), có hiện diện lưới nội sinh chất trơn (SER), thể vùi (Incl).

### 2.2.6. Phương pháp chuẩn bị niêm mạc và chuyển phôi

Nội mạc tử cung được chuẩn bị bằng cách tiêm chất chủ vận GnRH (GnRHa; Decapeptyl, Ipsen Pharma, Spain) trong chu kỳ kích thích buồng trứng cuối. Siêu âm đối chứng được thực

hiện trên những phụ nữ không có chu kỳ kinh nguyệt và những người có nguy cơ bị nội mạc tử cung mỏng (ví dụ: sau khi nạo sản khoa hoặc điều trị nhiều lần, thuyên tắc khối u xơ tử cung, xạ trị vùng chậu hoặc tiền sử có hội chứng tử cung) đối với các trường hợp có chỉ định chuyển phôi tươi. Với những trường hợp bệnh nhân chuyển phôi trữ lạnh, vào ngày đầu tiên của chu kỳ kinh nguyệt ngay sau đó, việc chuẩn bị estrogen được bắt đầu với 6 mg/ngày estradiol valerate, uống (Progynova, Bayer Hispania S.L., Tây Ban Nha) hoặc 150 mg/ngày estradiol hemihydrate qua da (Estradot Novartis Pharma GmbH, Đức). Điều trị này tiếp tục cho đến khi xét nghiệm beta-hCG đầu tiên trong máu 14 ngày sau chuyển phôi. Trong trường hợp kết quả thử thai dương tính, việc điều trị kéo dài đến tuần thứ 12 của thai kỳ.

### 2.2.7. Phương pháp phân tích xử lý số liệu

Dữ liệu thu được được phân tích thống kê theo kiểm định Fisher Test trên phần mềm R.

### 2.3. Đạo đức trong nghiên cứu

Tất cả các bệnh nhân tham gia đều được giải thích về mục tiêu của nghiên cứu và đồng ý tham gia nghiên cứu. Toàn bộ thông tin cá nhân của các bệnh nhân tham gia nghiên cứu đều được đảm bảo giữ kín. Nghiên cứu chỉ phục vụ cho mục đích khoa học. Bệnh nhân hoàn toàn không phải trả phí cho việc thực hiện các nghiên cứu này.

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân được nghiên cứu

Đặc điểm về tuổi, loại vô sinh, nguyên nhân hiếm muộn và nồng độ Anti-Mullerian Hormone (AMH), số nang thứ cấp – Antral Follicle Count (AFC) của 29 bệnh nhân đến điều trị tại khoa Hỗ trợ Sinh sản – Bệnh viện A Thái Nguyên trình bày trong bảng 1.

**Bảng 1.** Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân được nghiên cứu

Tuổi vợ (năm)	35,93 ± 4,11
Thời gian vô sinh (năm)	4,07 ± 2,90
<b>Loại vô sinh – n (%)</b>	
Nguyên phát	06 (20,7)
Thứ phát	23 (79,3)
<b>Nguyên nhân hiếm muộn ( n (%))</b>	
Giảm DTBT	11 (37,9)
Vòi trứng	09 (31,0)
Nam	05 (17,2)
Polyp	03 (10,3)
AMH (ng/mL)	1,44 ± 0,67
AFC (nang thứ cấp (n))	6,79 ± 3,50

*Nhận xét:* Theo số liệu thống kê, độ tuổi trung bình của bệnh nhân được chỉ định trữ lạnh noãn là 35,93 tuổi. Điều này cho thấy độ tuổi phụ nữ có chỉ định trữ lạnh noãn ở ngưỡng cao. Thời gian vô sinh trung bình là 4,07 năm. Ngoài ra, chỉ có 6 bệnh nhân chưa có thai lần nào nhưng buồng trứng đã có sự suy giảm về số lượng nang noãn hoặc đáp ứng buồng trứng kém khi thực hiện các phương pháp hỗ trợ sinh sản và 23 bệnh nhân (chiếm 79,3%) đã từng mang thai hoặc đã từng sinh con. Trong nhóm các nguyên nhân hiếm muộn, chỉ có 17,2% nguyên nhân xuất phát từ phía nam giới kèm theo sự suy giảm dự trữ buồng trứng hoặc số lượng nang thứ cấp ở phụ nữ giảm. Phần lớn là phụ nữ có dấu hiệu của sự giảm dự trữ buồng trứng chiếm 37,9%. Các yếu tố còn lại đi kèm là yếu tố về vòi trứng, polyp.

Theo số liệu thống kê, nồng độ hormone AMH trong huyết thanh của nhóm bệnh nhân được chỉ định trữ lạnh noãn là 1,44 ± 0,67. Trong đó, bệnh nhân có chỉ số AMH thấp nhất là 0,4 và cao

nhất là 3,59. Ngoài ra, số lượng nang thứ cấp được đánh giá vào ngày thứ 2 của chu kỳ kinh có giá trị trung bình là 6,79 nang. Chỉ số AMH và AFC là 2 chỉ số được sử dụng chính và có mối liên hệ chặt chẽ trong việc phân loại bệnh nhân có tiên lượng thấp và cần có những phương pháp hỗ trợ phù hợp để đáp ứng nhu cầu mong có con bằng chính noãn của mình ở những đối tượng này. Và trong nghiên cứu gần đây nhất của Sandro và cộng sự (2021) đã chỉ ra sự thống nhất chặt chẽ giữa hai chỉ số AMH và AFC của những bệnh nhân tiên lượng thấp với AMH dưới 2,97 ng/ml và AFC là dưới 12 nang thứ cấp [9].

### 3.2. Đặc điểm về số lượng, chất lượng giữa noãn tươi và noãn được trữ lạnh

Số noãn thu nhận được qua các chu kỳ kích thích buồng trứng được thể hiện dưới bảng 2.

**Bảng 2.** Số noãn thu nhận được qua các chu kỳ trữ và chu kỳ lấy noãn tươi

Đặc điểm	Noãn trữ (N = 174)	Noãn tươi (N = 117)	p
Số noãn chọc hút	4,97 ± 1,84	4,24 ± 3,62	0,367
Số noãn MII	4,48 ± 1,64	3,78 ± 2,53	0,288
Số noãn sống sau trữ rã	4,45 ± 1,66		

*Nhận xét:* Số noãn trữ lạnh trung bình là 4,97; trong đó có 4,48 ± 1,64 noãn thu được ở dạng noãn trưởng thành (MII). Số noãn tươi thu nhận được ở chu kỳ kích thích buồng trứng cuối cùng với số lượng trung bình là 4,24 noãn và số noãn trưởng thành là 3,78. Tuy nhiên, số lượng noãn được trữ lại với các noãn MII ở các chu kỳ kích thích trước không khác biệt với số noãn tươi thu nhận được ở chu kỳ cuối với giá trị p lần lượt là 0,367 và 0,288.

Kết quả tương tự được chỉ ra trong nghiên cứu của Caligara và cộng sự năm 2001 [10]. Ngoài ra, tỷ lệ noãn sống sót sau trữ - rã bằng phương pháp Vitrification của Kuwajama khá cao với số noãn sống trung bình sau trữ - rã là 4,45 noãn. Kết quả này cũng tương tự với kết quả trong nghiên cứu của Cobo và cộng sự (2008) với tỷ lệ noãn sống sót sau trữ rã là 96,9% [11]. Hay trong nghiên cứu gần đây nhất của Cornet-Bartolome và cộng sự năm 2020 khi nghiên cứu trên một số lượng noãn trữ lạnh lớn với tỷ lệ sống sót noãn sau trữ - rã trên 90% [8]. Bên cạnh đó, trong nghiên cứu của Lê Thụy Hồng Khả và cộng sự năm 2020 khi thực hiện nghiên cứu trên 91 trường hợp bệnh nhân thực hiện thụ tinh ống nghiệm thuộc hệ thống IVFMD với chu kỳ ICSI trên noãn trữ lạnh có tỷ lệ sống của noãn sau rã đồng đạt 95,59 ± 13,60% [12]. Gần đây nhất là một nghiên cứu của Đỗ Thị Mỹ Linh và cộng sự năm 2021, báo cáo tại hội nghị Phôi học lâm sàng cũng chỉ ra tỷ lệ noãn sống sau rã đồng là 94,9% với 1678 noãn được tiến hành rã đồng [13]. Kết quả nghiên cứu này cũng tương ứng với kết quả nghiên cứu của chúng tôi.

### 3.3. Kết quả thụ tinh giữa noãn trữ lạnh và noãn tươi

Vào ngày lấy trứng cuối cùng của chu kỳ kích thích buồng trứng, số trứng đã được trữ lạnh lại ở các chu kỳ trước được rã và ủ ấm 2h trong môi trường nuôi cấy chứa HAS (GTL- Vitrolife-Thụy Điển). Số noãn tươi được lấy vào ngày bệnh nhân được chỉ định ICSI cũng được ủ sau 3h trong môi trường GM501 Cult with Gentamicin là dung dịch đệm bicarbonate (Gynmed – Đức). Các noãn này sẽ được tiêm tinh trùng vào bào tương (ICSI) cùng một thời điểm và đánh giá kết quả thụ tinh sau 16 - 18h tính từ thời điểm ICSI. Kết quả thụ tinh được thể hiện trong bảng 3.

**Bảng 3.** Kết quả thụ tinh giữa noãn trữ lạnh và noãn tươi

Đặc điểm	Noãn trữ (N = 174)	Noãn tươi (N = 117)	p
Số noãn ICSI	4,38 ± 1,59	3,24 ± 2,52	0,093
Số noãn thụ tinh	3,93 ± 1,53	2,79 ± 2,53	0,086
Tỷ lệ thụ tinh (%)	90,43 ± 13,48	80,48 ± 29,77	0,162

*Nhận xét:* Theo số liệu trong bảng 3, số lượng noãn ICSI giữa noãn trữ và noãn tươi không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê và tỷ lệ thụ tinh giữa noãn tươi và noãn trữ cũng không khác biệt với giá trị P lần lượt là 0,086 và 0,162.

Theo một nghiên cứu cộng gộp của Cobo và cộng sự (2011) khi đánh giá giữa 4282 noãn trữ lạnh và 3524 noãn tươi từ năm 2005 đến năm 2009 tại các trung tâm thụ tinh ống nghiệm ở Brazil, Spain, China, Italy, kết quả thụ tinh giữa noãn trữ và noãn tươi cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với OR 1,02; 95% CI [14]. Như vậy, noãn đã trải qua quá trình trữ - rã vẫn xảy ra quá trình thụ tinh giống với noãn tươi ở cùng 1 bệnh nhân khi trải qua các chu kỳ kích thích buồng trứng khác nhau. Một kết quả tương tự cũng được chỉ ra trong nghiên cứu của Lê Thụy Hồng Khả và cộng sự năm 2020 tại IVFMD với tỷ lệ thụ tinh của noãn trữ lạnh là  $78,96 \pm 24,88\%$  [12]. Tuy nhiên, nghiên cứu của nhóm tác giả này mới chỉ ra tỷ lệ thụ tinh của noãn trữ lạnh và chưa so sánh với các noãn tươi trên cùng bệnh nhân.

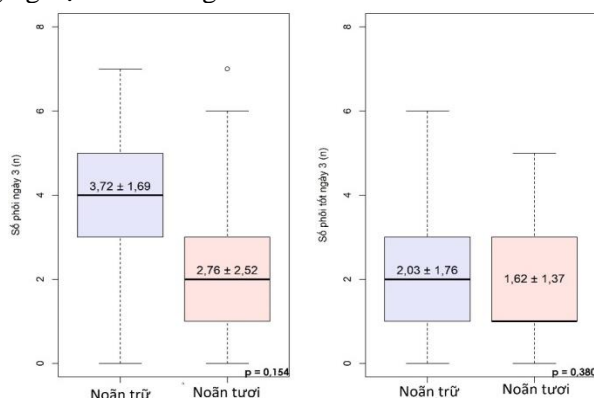
### 3.4. Kết quả về số lượng và chất lượng phôi tốt ngày 3 giữa noãn trữ lạnh và noãn tươi

**Bảng 4.** Tỷ lệ lên phôi và phôi tốt ngày 3 giữa noãn tươi và noãn trữ

Đặc điểm	Noãn trữ (N = 174)	Noãn tươi (N = 117)	p
Số phôi ngày 3	$3,72 \pm 1,69$	$2,76 \pm 2,52$	0,154
Tỷ lệ phôi ngày 3	$88,10 \pm 28,68$	$81,61 \pm 38,41$	0,510
Số phôi tốt ngày 3	$2,03 \pm 1,76$	$1,62 \pm 1,37$	0,380

Nhận xét: Số liệu bày trong bảng 4 cho thấy tỷ lệ lên phôi ngày 3 giữa noãn tươi và noãn trữ là gần tương đương nhau hay không có sự khác biệt giữa chúng với giá trị p là 0,51. Bên cạnh đó, tỷ lệ lên phôi tốt ngày 3 giữa noãn tươi và noãn trữ cũng như nhau hay không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p = 0,380) (Hình 1).

Dấu hiệu đánh giá sự thụ tinh là sự xuất hiện 2 PN – tiền nhân (Pronuclear), 1 tiền nhân cái và tiền nhân đực. Sau khi noãn đã có sự kết hợp giữa tinh trùng và noãn, các tế bào xảy ra quá trình phân chia nguyên phân đầu tiên để từ 1 tế bào thành 2 tế bào, 2 tế bào thành 4 và thành 8 tế bào sau  $68h \pm 1h$  sau ICSI. Tại thời điểm này, sẽ tiến hành đánh giá và xếp loại phôi ngày 3. Chất lượng phôi được đánh giá dựa vào số lượng tế bào và tỷ lệ mảnh vỡ tế bào và dựa vào những tiêu chuẩn đánh giá phôi được xây dựng và thống nhất cao giữa các chuyên viên phôi học và các trung tâm thụ tinh ống nghiệm trên thế giới.



**Hình 1.** Tỷ lệ lên phôi và phôi tốt ngày 3 giữa noãn tươi và noãn trữ

Một kết quả tương tự cũng được chỉ ra trong nghiên cứu cộng gộp của Cobo và cộng sự năm 2011 khi đánh giá tỷ lệ lên phôi ngày 3 và lên phôi tốt ngày 3 giữa noãn tươi và noãn trữ với OR lần lượt là 0,91 và 0,96 [14]. Hay trong nghiên cứu của nhóm tác giả Buderatsk và cộng sự năm 2020 cũng chỉ ra sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ lên phôi và lên phôi tốt ngày 3 của noãn trữ lạnh và noãn tươi lần lượt là  $88,2 - 67,6\%$  với  $87,6 - 69,7\%$  [15].

### 3.5. Kết quả về số lượng và chất lượng phôi tốt ngày 5 giữa noãn trữ lạnh và noãn tươi

Nhận xét: Theo số liệu thống kê trong bảng 5, tỷ lệ lên phôi trung bình và tỷ lệ lên phôi nang

tốt ngày 5 giữa noãn tươi và noãn trữ là không khác biệt với p lần lượt là 0,518 và 0,902.

**Bảng 5.** Tỷ lệ lên phôi và phôi tốt ngày 5 giữa noãn tươi và noãn trữ

Đặc điểm	Noãn trữ (N = 174)	Noãn tươi (N = 117)	p
Số phôi ngày 5	1,66 ± 1,97	1,66 ± 2,93	0,999
Tỷ lệ phôi ngày 5	37,70 ± 43,48	44,06 ± 65,33	0,518
Số phôi tốt ngày 5	0,62 ± 1,35	0,66 ± 1,65	0,902

Trong đánh giá phôi giai đoạn phôi nang (phôi ngày 5), mốc thời gian quan sát tốt nhất được thông qua trong hội thảo đồng thuận Istanbul là 116h ± 2h sau khi ICSI. Phôi nang được đánh giá các tiêu chí bao gồm: độ nở rộng của khoang phôi nang, hình thái khối tế bào bên trong (Inner cell mass – ICM) và lớp tế bào bên ngoài (Trophectoderm cell – TE) [3]. Tại thời điểm này, phôi nang tốt nhất là phôi có khoang phôi nang nở rộng hoàn toàn hoặc đang thoát màng, ICM nén chặt gồm nhiều tế bào, TE cũng nhiều tế bào gắn kết chặt chẽ với nhau.

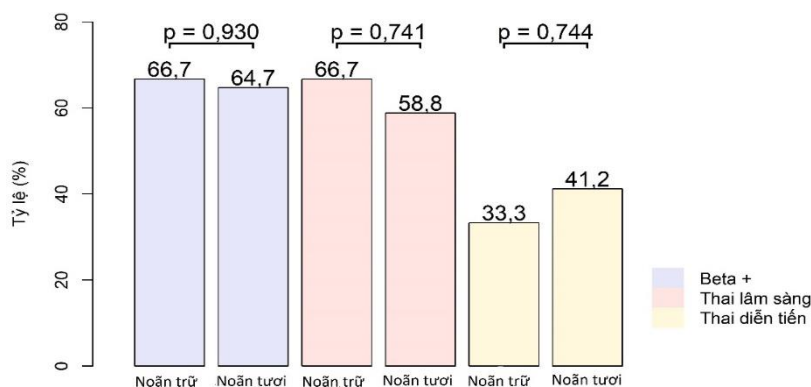
Kết quả tương tự cũng được chỉ ra trong nghiên cứu cộng gộp của Cobo và cộng sự năm 2011 [14].

### 3.6. Kết quả chuyển phôi từ noãn trữ và noãn tươi

Trong tổng số 29 bệnh nhân được nghiên cứu, có 6 bệnh nhân chuyển phôi từ noãn trữ và 17 bệnh nhân chuyển phôi từ noãn tươi. Kết quả có thai được thể hiện trong bảng 6.

**Bảng 6.** Kết quả có thai giữa chuyển phôi từ noãn trữ và noãn tươi

Đặc điểm	Noãn trữ (N=6)	Noãn tươi (N=17)	OR [95%CI]; p
Tỷ lệ beta dương	04 (66,7)	11 (64,7)	1,09 [0,15-7,80]; 0,930
Tỷ lệ thai lâm sàng	04 (66,7)	10 (58,8)	1,40 [0,20-9,87]; 0,741
Tỷ lệ thai diễn tiến	02 (33,3)	07 (41,2)	0,71 [0,10-5,04]; 0,744



**Hình 2.** Tỷ lệ beta dương, tỷ lệ thai lâm sàng và thai diễn tiến giữa chuyển phôi từ noãn tươi và noãn trữ

Nhận xét: Tỷ lệ bệnh nhân có beta dương khi chuyển phôi từ noãn trữ là 66,7%; tỷ lệ thai lâm sàng là 66,7%. Trong khi đó, tỷ lệ có thai và tỷ lệ thai lâm sàng của những bệnh nhân chuyển phôi từ noãn tươi thấp hơn so với noãn trữ với tỷ lệ lần lượt là 64,7% và 58,8%. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với OR lần lượt là 1,09 và 1,40.

Tỷ lệ thai diễn tiến là tỷ lệ quan trọng trong thực hiện các phương pháp hỗ trợ cho các cặp vợ chồng hiếm muộn. Theo số liệu trong hình 2, tỷ lệ thai diễn tiến của bệnh nhân chuyển phôi từ noãn tươi cao hơn so với chuyển phôi từ noãn trữ là gần 8%, tuy nhiên lại không có khác biệt có ý nghĩa thống kê với P = 0,744.

Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Cobo và cộng sự năm 2011 và trong nghiên cứu gần đây nhất của Cornet-Bartolome và cộng sự năm 2020 cũng không chỉ ra sự khác biệt về tỷ lệ thai diễn tiến giữa noãn tươi và noãn trữ [4], [8]. Tỷ lệ thai lâm sàng giữa noãn trữ và noãn tươi cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong nghiên cứu của Đỗ Thị Mỹ Linh, trong đó tỷ lệ thai lâm sàng khi chuyển phôi trên noãn trữ lạnh

là 26,5%, noãn tươi là 21,2%. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của tác giả này đã đánh giá tỷ lệ trẻ sinh sống từ noãn trữ và noãn tươi lần lượt là 16,3% và 16,5% [13]. Đây cũng là nghiên cứu lớn nhất về hiệu quả chuyển phôi từ noãn trữ và noãn tươi được tiến hành tại Việt Nam.

#### 4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chỉ ra rằng, những bệnh nhân có dấu hiệu của sự suy giảm dự trữ buồng trứng (AMH thấp) với số lượng nang thứ cấp vào ngày 2 ít có thể tiến hành kích trứng nhiều lần để gom đủ số trứng trước khi tiến hành tiêm tinh trùng vào bào tương noãn mà vẫn đảm bảo tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ hình thành phôi ngày 3, ngày 5 tương đương với noãn tươi.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] C. Niederberger *et al.*, "Forty years of IVF," *Fertility and Sterility*, vol. 110, no. 2, pp. 185-324.e5, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.06.005.
- [2] A. M. Quaas and G. Pennings, "The current status of oocyte banks: domestic and international perspectives," *Fertility and Sterility*, vol. 110, no. 7, pp. 1203-1208, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.07.013.
- [3] E. Yasmin, M. Davies, G. Conway, and A. H. Balen, "British Fertility Society: 'Ovulation induction in WHO Type 1 anovulation: Guidelines for practice' Produced on behalf of the BFS Policy and Practice Committee," *Human Fertility*, vol. 16, no. 4, pp. 228-234, Dec. 2013, doi: 10.3109/14647273.2013.829673.
- [4] J. Saumet, A. Petropanagos, K. Buzaglo, E. McMahon, G. Warraich, and N. Mahutte, "No. 356-Egg Freezing for Age-Related Fertility Decline," *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, vol. 40, no. 3, pp. 356-368, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.jogc.2017.08.004.
- [5] L. Rienzi *et al.*, "Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance," *Hum. Reprod. Update*, Nov. 2016, doi: 10.1093/humupd/dmw038.
- [6] K. Oktay, A. P. Cil, and H. Bang, "Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis," *Fertility and Sterility*, vol. 86, no. 1, pp. 70-80, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.03.017.
- [7] Y.-X. Cao *et al.*, "Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification," *Fertility and Sterility*, vol. 92, no. 4, pp. 1306-1311, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.08.069.
- [8] D. Cornet-Bartolomé, A. Rodriguez, D. Garcia, M. Barragan, and R. Vassena, "Efficiency and efficacy of vitrification in 35 654 sibling oocytes from donation cycles," *Human Reproduction*, vol. 35, no. 10, pp. 2262-2271, Oct. 2020, doi: 10.1093/humrep/deaa178.
- [9] S. C. Esteves, H. Yarali, L. N. Vuong, J. F. Carvalho, İ. Y. Özbek, M. Polat, H. L. Le, T. D. Pham, and T. M. Ho, "Antral follicle count and anti-Müllerian hormone to classify low-prognosis women under the POSEIDON criteria: a classification agreement study of over 9000 patients," *Human Reproduction*, vol. 36, no. 6, pp. 1530-1541, June 2021.
- [10] C. Caligara, "The effect of repeated controlled ovarian stimulation in donors," *Human Reproduction*, vol. 16, no. 11, pp. 2320-2323, Nov. 2001, doi: 10.1093/humrep/16.11.2320.
- [11] A. Cobo, J. Domingo, S. Pérez, J. Crespo, J. Remohí, and A. Pellicer, "Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients," *Clin Transl Oncol*, vol. 10, no. 5, pp. 268-273, May 2008, doi: 10.1007/s12094-008-0196-7.
- [12] T. H. K. Le, T. C. Tran, and D. T. Pham, "The results of in-vitro fertilization with frozen - thaw oocytes", *The Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 18, no. 1, pp. 45-48, doi: 10.46755/vjog.2020.1.778.
- [13] T. M. L. Do, "Active oocyte cryopreservation," Clinical Embryology Conference 2021, Sesión I, Saturday, April 10, 2021.
- [14] A. Cobo and C. Diaz, "Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials," *Fertility and Sterility*, vol. 96, no. 2, pp. 277-285, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.06.030.
- [15] N. Buderatsk, J. Gontar, I. Ilyin, S. Lavrinenko, M. Petrushko, and T. Yurchuk, "Does human oocyte cryopreservation affect equally on embryo chromosome aneuploidy?," *Cryobiology*, vol. 93, pp. 33-36, 2020, doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.03.002.