

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
HỌC VIỆN QUÂN Y**

**BỘ QUỐC PHÒNG**

**ĐOÀN THỊ HẰNG**

**NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI HÌNH THÁI CẤU TRÚC  
PHÔI NGƯỜI NGÀY 3, NGÀY 5 TRƯỚC ĐÔNG LẠNH  
VÀ SAU RÃ ĐÔNG BẰNG KỸ THUẬT THỦY TINH HÓA**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI – 2013**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
HỌC VIỆN QUÂN Y**

**BỘ QUỐC PHÒNG**

**ĐOÀN THỊ HẰNG**

**NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI HÌNH THÁI CẤU TRÚC  
PHÔI NGƯỜI NGÀY 3, NGÀY 5 TRƯỚC ĐÔNG LẠNH  
VÀ SAU RÃ ĐÔNG BẰNG KỸ THUẬT THỦY TINH HÓA**

**Chuyên ngành:  
Mã số:**

**Mô Phôi thai học  
62.72.01.03**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**Hướng dẫn Khoa học: 1. PGS.TS. QUẢN HOÀNG LÂM  
2. GS.TS. NGUYỄN ĐÌNH TẢO**

**HÀ NỘI - 2013**

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Sau trường hợp mang thai đầu tiên được thực hiện từ phôi trữ lạnh năm 1983 đến nay, kỹ thuật đông lạnh phôi đã trở thành phổ biến ở nhiều trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm của nhiều nước trên thế giới. Tuy nhiên, thực tế cho thấy tỷ lệ phôi làm tổ, cũng như tỷ lệ có thai của chuyển phôi đông lạnh thấp hơn so với chuyển phôi tươi, vì ít nhiều quá trình trữ lạnh cũng làm ảnh hưởng đến chất lượng phôi. Nhiều nghiên cứu trên thế giới nhằm nâng cao tỷ lệ sống của phôi sau rã đông, nâng cao tỷ lệ có thai của chuyển phôi đông lạnh. Các kỹ thuật trữ lạnh cũng được cải tiến, được chia thành 2 nhóm chính: hạ nhiệt độ chậm (slow-freezing) và kỹ thuật thủy tinh hoá (Vitrification).

Thủy tinh hóa là quá trình làm lạnh mẫu noãn hoặc phôi với thời gian rất nhanh. Trong suốt quá trình hạ nhiệt độ, toàn bộ khối vật chất bên trong và bên ngoài tế bào chuyển thành dạng kính (glass-like), đặc biệt không có sự hình thành tinh thể đá bên trong mẫu tế bào, tránh được những tổn thương do tinh thể đá gây nên. Đây là phương pháp đông lạnh đơn giản dễ thực hiện, tiết kiệm thời gian, tiết kiệm nguyên liệu và trang thiết bị...đồng thời cho tỷ lệ phôi sống, tỷ lệ phôi làm tổ cao hơn so với phương pháp đông lạnh chậm. Hiện nay, đông lạnh bằng thủy tinh hoá là một kỹ thuật đang được các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm trong khu vực và trên thế giới nghiên cứu ứng dụng trong điều trị. Tại Việt Nam phương pháp này được thực hiện đầu tiên ở bệnh viện phụ sản Từ Dũ vào tháng 5 năm 2006 và bước đầu thấy kết quả tốt. Trung tâm Công nghệ Phôi Học viện Quân y bắt đầu thực hiện đông phôi bằng kỹ thuật thủy tinh hoá từ tháng 11/2006.

Đông lạnh phôi có thể tiến hành ở bất kỳ giai đoạn phát triển nào của phôi. Đông lạnh phôi ở giai đoạn phôi tiền nhân (ngày 1) sẽ gặp khó khăn trong việc lựa chọn phôi để đông lạnh và xác định số lượng phôi để rã đông, đông lạnh phôi ở giai đoạn phôi phân chia (ngày 2 và ngày 3) thường phổ biến nhất, sự lựa

chọn phôi trước và sau rã đông dựa vào tiêu chuẩn hình thái rất thuận lợi, các phôi bào có tính toàn năng nên ít bị ảnh hưởng bởi các phôi bào thoái hóa. Phôi ở giai đoạn kết dính (ngày 4) là giai đoạn nhạy cảm và khó đánh giá về mặt hình thái nên thường không đông lạnh ở giai đoạn này. Đông lạnh phôi ở giai đoạn phôi nang (ngày 5, 6, 7) có lợi thế hơn giai đoạn phôi phân chia vì có rất nhiều tế bào nên việc thoái hóa một số lượng nhỏ tế bào sẽ không ảnh hưởng đến phôi. Nhiều nghiên cứu khẳng định rằng đông lạnh phôi ở ngày 5 có tỷ lệ phôi sống và tỷ lệ có thai cao hơn so với phôi ở ngày 6 và ngày 7 [68], [71]. Đông phôi ở giai đoạn phôi nang giúp làm giảm tỷ lệ đa thai, nhưng tỷ lệ tạo được phôi nang chỉ đạt khoảng 50 - 60%. Hiện nay, còn nhiều ý kiến khác nhau về kỹ thuật đông lạnh phôi và thời điểm thực hiện đông lạnh. Cơ sở của việc xác định những ảnh hưởng của qui trình đông lạnh và thời điểm đông lạnh đến hiệu quả của quá trình đông lạnh phôi chính là việc nghiên cứu đánh giá hình thái cấu trúc phôi trước đông lạnh và sau rã đông. Do đó, chúng tôi tiến hành đề tài:

***“Nghiên cứu biến đổi hình thái cấu trúc phôi ngày 3, ngày 5 trước đông lạnh và sau rã đông bằng kỹ thuật thủy tinh hóa”.***

### **Mục tiêu:**

- 1. Mô tả sự biến đổi hình thái cấu trúc phôi ngày 3, ngày 5 trước đông lạnh và sau rã đông bằng kỹ thuật thủy tinh hóa.***
- 2. So sánh tỷ lệ phôi sống, tỷ lệ phôi làm tổ và tỷ lệ có thai của phôi ngày 3 với phôi ngày 5 sau rã đông bằng kỹ thuật thủy tinh hóa.***

## CHƯƠNG 1

# TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### **1.1. Tình hình vô sinh trên thế giới và ở Việt Nam**

#### ***1.1.1. Khái niệm về vô sinh***

Vô sinh là tình trạng một cặp vợ chồng không có thai sau một năm chung sống, giao hợp bình thường, không sử dụng các biện pháp tránh thai nào (WHO, 2000) [7]. Đối với những trường hợp mà người vợ trên 35 tuổi thì thời gian này chỉ 6 tháng đã được đánh giá là vô sinh.

Vô sinh nguyên phát, còn được gọi là vô sinh loại I: là tình trạng vô sinh ở những cặp vợ chồng mà người vợ chưa có thai lần nào.

Vô sinh thứ phát, còn được gọi là vô sinh loại II: là tình trạng vô sinh ở những cặp vợ chồng mà người vợ đã từng có thai trước đó.

Vô sinh nữ là các trường hợp vô sinh nguyên nhân do người vợ. Vô sinh nam là các trường hợp vô sinh nguyên nhân do người chồng [65], [95]. Những trường hợp vô sinh không rõ căn nguyên là trường hợp vô sinh mà không tìm thấy các nguyên nhân gây vô sinh ở cả vợ và chồng [31].

#### ***1.1.2. Tình hình vô sinh trên thế giới***

Theo Tổ chức y tế thế giới năm 2010, tỷ lệ vô sinh chung trên thế giới dao động trong khoảng từ 6 – 13%, tùy theo từng quốc gia. Trong đó nhóm vô sinh biết rõ nguyên nhân chiếm tỉ lệ khoảng 80%, còn lại 20% là vô sinh không rõ nguyên nhân. Trong số các cặp vô sinh biết rõ nguyên nhân thì tỉ lệ vô sinh nữ chiếm 40%, vô sinh nam chiếm 40%, còn lại khoảng 20% là vô sinh do cả nam và nữ [107].

#### ***1.1.3. Tình hình vô sinh ở Việt Nam***

Theo Nguyễn Viết Tiến (2010), tỷ lệ vô sinh chung trên toàn quốc chiếm 7,7%. Trong đó tỷ lệ vô sinh nguyên phát là 3,9%, vô sinh thứ phát là 3,8%. Tỷ

lệ vô sinh ở Việt Nam có sự khác biệt giữa các vùng sinh thái và các nhóm cặp vợ chồng khác nhau [11].

Xét về đặc điểm phân bố của nguyên nhân dẫn đến vô sinh theo các tác giả nghiên cứu đưa ra những kết quả khác nhau. Theo nghiên cứu của Trần Thị Trung Chiến, Trần Văn Hanh, Phạm Gia Khánh và cs. thì nguyên nhân gây vô sinh nam chiếm khoảng 40,8% trong số các trường hợp vô sinh [1]. Một nghiên cứu khác của Nguyễn Khắc Liêu và cs. được thực hiện trên 1000 cặp vô sinh tại bệnh viện phụ sản Trung ương thì tỉ lệ vô sinh nữ chiếm khoảng 54%, và vô sinh nam chiếm khoảng 36%, còn lại 10% là vô sinh không rõ căn nguyên [7].

Những con số nêu trên cũng phần nào cho thấy thực trạng tình hình vô sinh không chỉ là vấn đề y học, mà còn ảnh hưởng đến các mặt đời sống xã hội.

## **1.2. Quá trình thụ tinh và nuôi cấy phôi ở người**

### ***1.2.1. Sự thụ tinh ở người***

- Sự thụ tinh là sự kết hợp giữa giao tử đực (tinh trùng) với giao tử cái (noãn) tạo thành hợp tử có bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội đặc trưng của loài.

- Tinh trùng và noãn được thụ tinh trong đĩa cấy (IVF) hoặc tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) được đánh giá sau 18 – 20 giờ dựa vào sự hình thành 2 tiền nhân.

Xét về khía cạnh sinh học, sự thụ tinh liên quan đến 4 bước theo tuần tự sau:

- Sự lựa chọn tinh trùng sẽ tham gia quá trình thụ tinh.
- Sự xâm nhập của tế bào tinh trùng qua các lớp vỏ của noãn.
- Sự gắn kết giữa tinh trùng và màng bào tương của noãn.
- Sự hòa hợp nhân dẫn đến việc hình thành bộ nhiễm sắc thể của phôi.

### ***1.2.2. Nuôi cấy phôi***

Sau khi noãn và tinh trùng thụ tinh tạo thành phôi, những phôi có 2 tiền nhân được nuôi cấy trong môi trường IVF, G1 đến ngày thứ 2 và tiếp tục nuôi cấy trong môi trường G2 từ ngày 3 đến ngày 5.

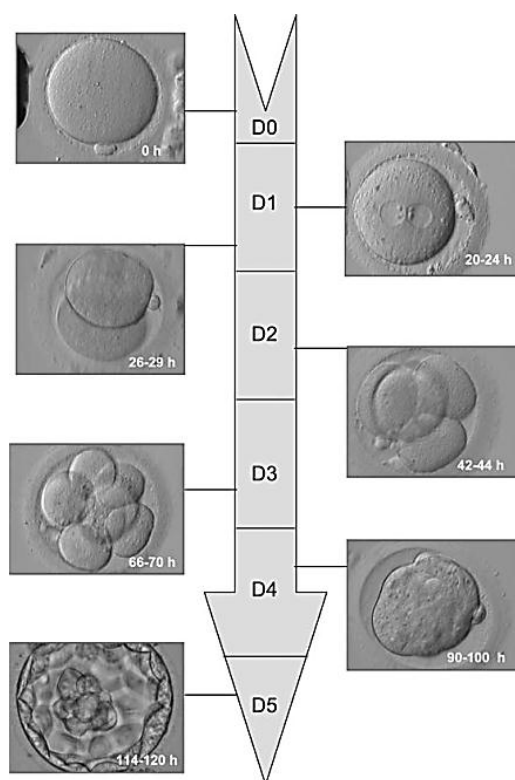
Phôi giai đoạn tiền nhân (2PN – phôi ngày 1) phân cắt phôi theo quy luật hoàn toàn đều nhưng không đồng thời thành 2 tế bào.

Phôi ngày 2 sẽ có từ 2 – 4 tế bào, hình thái phôi được đánh giá dựa vào số tế bào, độ đồng đều các phôi bào, tỷ lệ phần trăm các mảnh vỡ bào tương.

Phôi ngày 3 có từ 6 - 8 tế bào, hình thái phôi đánh giá cũng dựa vào số tế bào, độ đồng đều các phôi bào, tỷ lệ phần trăm các mảnh vỡ bào tương.

Phôi ngày 4 (phôi dâu – morula embryo): các tế bào liên kết chặt chẽ không còn nhìn thấy ranh giới giữa các tế bào, hoặc đã bắt đầu quan sát thấy khoang chứa dịch giữa các tế bào.

Phôi ngày 5 (phôi nang – blastocyst embryo): Phôi dẫn rộng, màng trong suốt đã dẫn mỏng, khoang chứa dịch lớn, phôi đã có tế bào nụ phôi và lớp tế bào lá nuôi. Sự đánh giá hình thái phôi dựa vào độ dẫn rộng của phôi, đám tế bào bên trong (nụ phôi), lớp tế bào lá nuôi [39].



**Hình 1.1. Các mốc thời gian phát triển phôi từ giai đoạn tiền nhân đến giai đoạn phôi nang**

\* Nguồn: Theo Ebner T, 2003 [34].

### **1.3. Lược sử, nguyên tắc, chỉ định và các phương pháp đông lạnh phôi**

#### ***1.3.1. Lược sử nghiên cứu đông lạnh phôi***

Phôi động vật đầu tiên được trữ thành công là phôi chuột vào năm 1972 (trích dẫn từ [20]). Tiếp sau đó, kỹ thuật trữ phôi được phát triển và áp dụng cho trữ phôi gia súc. Đến năm 1983, phôi người đầu tiên mới được trữ thành công được báo cáo tại Monash, Úc [96]. Tại Việt Nam, đứa trẻ đầu tiên ra đời từ phôi trữ lạnh tại Bệnh viện Phụ Sản Từ Dũ năm 2002 [14].

Trong một thời gian ngắn kỹ thuật đông phôi đã phát triển với các quy trình đông lạnh được đơn giản và tối ưu hóa. Công nghệ đông lạnh hiện nay có thể áp dụng để lưu trữ giao tử (noãn, tinh trùng), phôi ở các giai đoạn phát triển khác nhau (phôi tiền nhân, phôi phân chia, phôi nang) và gần đây là đông lạnh mô buồng trứng.

Phương pháp đông lạnh bằng kỹ thuật thủy tinh hóa được Rall và Fahy thực hiện thành công lần đầu tiên trên phôi bò vào năm 1985 [78]. Kỹ thuật này được thực hiện rộng rãi trên gia súc vào nhiều năm sau đó. Tuy nhiên, quy trình trữ lạnh thủy tinh hóa chỉ được Kuleshova L. ứng dụng đầu tiên trên noãn người vào năm 1999 và sau đó vài tháng, được thực hiện đầu tiên trên phôi người đang phát triển ở giai đoạn phôi nang. Ngày 20 tháng 6 năm 1999, em bé đầu tiên trên thế giới từ phôi đông lạnh bằng kỹ thuật thủy tinh hóa ra đời [53].

Hiện nay, đông lạnh phôi bằng phương pháp thủy tinh hóa đang là một kỹ thuật được các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm lớn trong khu vực và trên thế giới ứng dụng trong điều trị và đang từng bước thay thế phương pháp hạ nhiệt độ chậm trước đây. Bên cạnh đó, các nhà khoa học cũng không ngừng thực hiện những kiểm chứng lâm sàng nhằm chứng minh kỹ thuật này thật sự an toàn và hiệu quả đối với con người.

#### ***1.3.2. Nguyên tắc đông lạnh phôi***

Nguyên tắc của đông lạnh là làm giảm nhiệt độ của môi trường chứa mẫu tế bào hay mẫu mô xuống nhiệt độ  $-196^{\circ}\text{C}$ . Ở nhiệt độ này, hầu hết các hoạt động sinh học bên trong tế bào gồm các phản ứng sinh hóa và hoạt động trao đổi



chất đều bị ngừng lại. Do đó, tế bào sống ở dạng tiềm sinh (không phát triển) và có thể bảo quản trong một thời gian dài. Với điều kiện nhiệt độ thấp, các phân tử nước, các chất hòa tan trong môi trường xung quanh, các vật chất bên trong tế bào tồn tại dưới dạng kết hợp (dạng tinh thể và dạng kính) do đó không có bất kỳ yếu tố nào từ môi trường bên trong cũng như bên ngoài có thể tác động đến tế bào trong giai đoạn này [8], [57].

Trong quá trình làm lạnh và rã đông, một số thay đổi trong môi trường chứa tế bào và cả bản thân tế bào có thể ảnh hưởng đến cấu trúc, chức năng, sự toàn vẹn và khả năng sống của phôi sau khi rã đông.

Tương tự như những tế bào khác, phôi cũng bị ảnh hưởng bởi 3 dạng tổn thương chính xảy ra ở những khoảng nhiệt độ khác nhau trong suốt quá trình làm lạnh và rã đông. Trong khoảng nhiệt độ từ 15°C đến -5 °C, nhiệt độ lạnh là yếu tố chính gây tổn thương tế bào do làm phá hủy những giọt lipid trong bào tương và các cấu trúc vi ống. Từ -5 °C đến -80 °C, sự hình thành tinh thể đá nội bào và ngoại bào là nguyên nhân chính gây tổn thương tế bào, tổn thương này được xem là nguy hiểm nhất đối với các tế bào được trữ lạnh nói chung và đối với phôi nói riêng. Ở nhiệt độ từ -50 °C đến -150 °C có thể gây ra hiện tượng đứt gãy màng trong suốt hoặc màng bào tương. Trong quá trình rã đông, những dạng tổn thương đối với tế bào cũng xảy ra như trong quá trình đông lạnh nhưng theo trình tự ngược lại. Trong đó quan trọng nhất là khả năng tái kết tinh, hậu quả là sự xuất hiện lại các tinh thể đá nội bào khi nhiệt độ tăng trên -120 °C. Do đó, trong quá trình rã đông đa số các tác giả đều cho rằng cần phải vượt qua giai đoạn này một cách nhanh chóng để hạn chế việc gây thêm tổn thương cho tế bào [8], [57].

#### *1.3.2.1. Những thay đổi bên trong tế bào khi làm lạnh*

Để đạt được nhiệt độ trữ, tế bào phải được làm lạnh từ nhiệt độ sống xuống đến -196°C. Quá trình hạ nhiệt độ này sẽ gây ra những thay đổi trong môi trường và cả trong tế bào, có khả năng ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của tế bào được lưu trữ:

- Giảm hoạt động của các enzym: nghiên cứu cho thấy khi nhiệt độ giảm từ 37°C xuống còn -7°C, hoạt động của enzym giảm 8 lần. Tuy nhiên, ảnh hưởng của giảm hoạt động enzym lên tế bào vẫn chưa được sáng tỏ

- Giảm độ hòa tan của các khí trong môi trường: bên cạnh các khí hòa tan theo nồng độ, môi trường nuôi cấy tế bào thường dùng CO<sub>2</sub> làm hệ đệm để cân bằng độ pH trong môi trường. Khi làm lạnh, các khí này không còn ở dạng hòa tan nữa mà tách ra thành những bọt khí có khả năng làm tổn hại đến tế bào [97].

- Hình thành tinh thể nước đá: nước trong môi trường nuôi cấy khi để lạnh dưới 0°C (khoảng -5°C đến -15°C) sẽ dần kết tinh thành những tinh thể nước đá. Hiện tượng này xảy ra do môi trường có pha chất hòa tan cũng như chất bảo quản lạnh có nhiệt độ đông đá thấp hơn bình thường. Những tinh thể nước đá hình thành bên trong cũng như sát bên ngoài tế bào có khả năng gây tổn thương cơ học lên màng tế bào và các bào quan [97].

- Tăng nồng độ chất hòa tan trong môi trường: đây là hậu quả của sự hình thành tinh thể nước đá. Khi nước chuyển sang dạng tinh thể tinh khiết, lượng nước ở thể lỏng sẽ giảm đi. Do đó, nồng độ các chất hòa tan tăng lên gây mất cân bằng về áp lực thẩm thấu, kéo nước từ bên trong tế bào ra ngoài và làm tổn thương màng lipoprotein của tế bào [16], [106].

- Tăng nhiệt độ tiềm ẩn: đây cũng là một hậu quả của sự hình thành tinh thể nước đá. Phân tử nước khi chuyển từ thể lỏng sang thể rắn sẽ làm thoát ra một lượng nhiệt. Nếu nhiều phân tử nước cùng chuyển sang thể rắn thì lượng nhiệt thoát ra đủ lớn để làm thay đổi nhiệt độ của môi trường đang từ vài độ âm lên lại 0°C. Thay đổi này ảnh hưởng đến chức năng của tế bào sau khi rã đông [106].

#### *1.3.2.2. Các biện pháp hạn chế tổn thương tế bào khi làm lạnh*

\* *Sử dụng chất bảo quản lạnh:* Các môi trường dùng để đông lạnh hiện nay luôn sử dụng một hay nhiều hợp chất có tác dụng bảo vệ khỏi hậu quả bất lợi của quá trình đông lạnh. Các hợp chất này được gọi là chất bảo quản lạnh hay chất bảo vệ đông lạnh cryoprotectants (CPAs): dimethylsulfoxide (DMSO), propylene glycol (PG), ethylene glycol (EG). Các chất bảo vệ đông lạnh nhìn