

ẢNH HƯỞNG CỦA NUÔI CẤY ĐƠN VÀ NUÔI CẤY NHÓM TỚI TIỀM NĂNG PHÁT TRIỂN VÀ ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA PHÔI NANG

Nguyễn Thị Liên Hương¹, Hà Mai Linh¹
Phí Thị Tú Anh¹, Lê Hoàng¹

TÓM TẮT:

Mục tiêu: So sánh tỷ lệ tạo phôi nang, tỷ lệ phôi nang tốt và tỷ lệ chuẩn bội của phôi nang nuôi cấy bằng hai phương pháp: nuôi đơn hoặc nuôi cấy nhóm. **Đối tượng và phương pháp:** Thuần tập tiến cứu trên 224 phôi thu được từ 36 cặp vợ chồng làm thụ tinh trong ống nghiệm có thực hiện xét nghiệm di truyền tiền làm tổ bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới tại Trung tâm Hỗ trợ Sinh sản, Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh Hà Nội từ 01/10 đến hết 31/10/2020. **Kết quả:** Tỷ lệ tạo phôi nang, tỷ lệ phôi nang tốt và tỷ lệ phôi chuẩn bội ở nhóm nuôi cấy đơn lần lượt là 53,5%, 76,1% và 43,8%, khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nuôi cấy nhóm (45,7%, 71,3% và 30,8%) ($p > 0,05$). **Kết luận:** Tỷ lệ tạo phôi nang và tỷ lệ phôi nang chuẩn bội ở phương pháp nuôi cấy đơn có xu hướng cao hơn so với nuôi cấy nhóm, tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

* Từ khoá: Tỷ lệ tạo phôi nang; Tỷ lệ phôi nang tốt; Xét nghiệm di truyền tiền làm tổ; Nuôi cấy đơn; Nuôi cấy nhóm.

Effects of Group and Single Cultures on the Developmental Potential and Genetic Characteristics of Blastocysts

Summary

Objectives: Comparison of blastulation rate, good quality blastocysts formation rate, and euploidy rate between two different embryo culture methods: Single culture and group culture. **Subjects and methods:** A prospective cohort study on 224 blastocysts obtained from 36 couples undergoing in vitro fertilization with preimplantation genetic testing by next-generation sequencing at the Assisted Reproductive Technologies, Tam Anh General Hospital, Hanoi, from 01/10 - 31/10/2020. **Results:** The blastocyst formation rate, the percentage of good blastocysts, and the rate of euploid embryos in the single culture group were 53.5%, 76.1%, and 43.8%, respectively, with no statistically significant difference in comparison with group culture (45.7%, 71.3%, and 30.8%) ($p > 0.05$). **Conclusion:** Blastulation and euploidy rate of embryos cultured by a single method tended to be higher than that of group culture, however, the difference was not significant.

* Keywords: Blastulation rate; Good blastocyst rate; Preimplantation genetic testing; Single culture; Group culture.

¹Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh

Người phản hồi: Hà Mai Linh (linhham@tamanhhospital.vn)

Ngày nhận bài: 24/6/2021

Ngày bài báo được đăng: 1/7/2021

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nuôi cấy phôi là một trong những giai đoạn quan trọng trong một chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm (in vitro fertilization - IVF). Một hệ thống nuôi cấy phôi tốt sẽ tạo điều kiện cho phôi phát huy tối đa tiềm năng phát triển của mình. Hệ thống nuôi cấy phôi bao gồm nhiều thành tố, trong đó, phương pháp nuôi cấy phôi được cho là một trong những yếu tố có thể tác động tới khả năng phát triển của phôi. Hiện nay, 2 phương pháp nuôi cấy phôi đang được sử dụng rộng rãi tại các phòng thí nghiệm hỗ trợ sinh sản là nuôi cấy đơn và nuôi cấy nhóm. Trong đó, nuôi cấy đơn là phương pháp nuôi cấy độc lập mỗi phôi trong một giọt môi trường nuôi cấy có phủ dầu. Ở phương pháp nuôi cấy nhóm, nhiều phôi sử dụng chung một nguồn môi trường nuôi cấy và các phôi này có thể tiếp xúc hoặc không tiếp xúc cơ học với nhau. Nếu như nuôi cấy nhóm dường như có lợi hơn cho sự phát triển của phôi nhờ các yếu tố tự tiết và cận tiết [3] thì nuôi cấy đơn lại là phương pháp nuôi cấy bắt buộc để áp dụng các phương pháp xét nghiệm di truyền tiền làm tổ không xâm lấn. Ở phương pháp này, dịch môi trường nuôi cấy sẽ được sử dụng làm nguồn nguyên liệu cho phân tích đặc điểm di truyền của phôi. Báo cáo của Makieva năm 2020 cho thấy phôi nang nuôi cấy đơn có tỷ lệ chuẩn bội nhiễm sắc thể (NST) thấp hơn rõ rệt so với phôi nuôi cấy nhóm. Trong khi đó, nghiên cứu Saborido (2019) lại

không thấy có sự khác biệt về tỷ lệ phôi chuẩn bội, tỷ lệ làm tổ, tỷ lệ thai lâm sàng cũng như tỷ lệ sinh sống giữa hai phương pháp nuôi cấy [4]. Theo tìm hiểu của chúng tôi, cho tới nay mới chỉ có hai nghiên cứu này báo cáo về ảnh hưởng của phương pháp nuôi cấy phôi tới tỷ lệ lệch bội ở phôi nang và cả hai công bố đều là các nghiên cứu hồi cứu với những yếu tố nhiễu khó kiểm soát. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tiền cứu này với mục tiêu: *So sánh tỷ lệ tạo phôi nang, tỷ lệ phôi nang tốt và tỷ lệ chuẩn bội ở phôi nang nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy đơn với phôi nuôi cấy nhóm.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

224 phôi thu được từ 36 cặp vợ chồng làm thụ tinh trong ống nghiệm có thực hiện xét nghiệm di truyền tiền làm tổ bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới tại Trung tâm Hỗ trợ Sinh sản, Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh Hà Nội từ 01/10 đến hết 31/10/2020.

* *Tiêu chuẩn lựa chọn:* Người vợ có tuổi trên 35 hoặc có tiền sử sảy thai/ thai lưu ≥ 2 lần hoặc làm IVF thất bại ≥ 2 lần và có ít nhất 2 phôi tốt ngày 2.

* *Tiêu chuẩn loại trừ:* Bệnh nhân (BN) có chỉ định làm PGT- A kết hợp PGT- M hoặc PGT- SR, bệnh nhân có tiền sử bất thường về di truyền hoặc sinh con mang bất thường về di truyền và những BN có noãn hoặc tinh trùng bất thường nặng.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Thiết kế nghiên cứu:* Thuận tập tiến cứu.

* *Quy trình nghiên cứu:*

- Bệnh nhân đủ tiêu chuẩn nghiên cứu được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm dựa trên phương pháp nuôi cấy phôi đơn hay nhóm.

- Noãn sau khi tiêm tinh trùng vào bào tương (intracytoplasmic sperm injection - ICSI) được đưa vào các đĩa cấy có chứa các giọt môi trường nuôi cấy liên tục (Irvine, Hoa Kỳ) có phủ dầu và đã cân bằng trong tủ cấy CO₂ qua đêm, 2 - 5 noãn/ 1 giọt môi trường. Nuôi cấy noãn và phôi trong tủ cấy CO₂, kiểm tra chất lượng thụ tinh 17 giờ sau ICSI, kiểm tra chất lượng phôi ngày hai 44 giờ sau ICSI dưới kính hiển vi soi nổi.

- Vào chiều ngày thứ ba sau ICSI, phôi được hỗ trợ thoát màng bằng tia laser rồi chuyển đĩa cấy. Nếu BN thuộc nhóm nuôi cấy đơn, phôi sẽ được nuôi cấy riêng rẽ mỗi phôi trong một giọt môi trường nuôi cấy liên tục có phủ dầu. Trong khi đó, nếu BN thuộc nhóm nuôi cấy nhóm, 2 - 5 phôi được nuôi cấy trong một giọt môi trường cùng loại.

- Vào chiều ngày 5, ngày 6 hoặc ngày 7, phôi được đưa ra khỏi tủ cấy và đánh giá chất lượng. Khi đạt độ nở từ BL1 trở lên theo phân loại của Gardner, phôi sẽ được tiến hành sinh thiết dưới kính hiển vi đảo ngược có gắn hệ thống vi thao tác và laser. Từ 3 đến dưới 10 phôi bào được cắt khỏi lớp tế bào lá nuôi.

- Phôi sau sinh thiết được trữ đông lại bằng phương pháp thủy tinh hóa (sử dụng hệ môi trường Cryotech, Nhật Bản). Các mẫu phôi bào sau sinh thiết được phân tích di truyền bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới (tách chiết ADN tế bào phôi và khuếch đại ADN bằng bộ kit Veriseq PGS, giải trình tự ADN bằng máy giải trình tự Miseq - Illumina và phân tích kết quả giải trình tự bằng phần mềm BlueFuse).

- Đánh giá chất lượng phôi nang dựa trên hệ thống phân loại của Gardner có hiệu chỉnh theo tiêu chuẩn của phòng thí nghiệm thụ tinh trong ống nghiệm Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh.

- Phôi được đánh giá là chuẩn bội khi có đầy đủ 24 nhiễm sắc thể theo kết quả phân tích di truyền bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới.

* *Chỉ tiêu nghiên cứu:*

- Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu (tuổi, nguyên nhân vô sinh, loại vô sinh, nồng độ AMH, AFC, số noãn chọc hút được, số noãn ICSI, số phôi ngày 2).

- So sánh tỷ lệ tạo phôi nang/số phôi ngày 2, tỷ lệ phôi nang tốt/tổng số phôi nang giữa hai phương pháp nuôi đơn và nuôi nhóm.

- So sánh tỷ lệ chuẩn bội của phôi nang nuôi cấy bằng hai phương pháp nuôi đơn và nuôi nhóm.

* *Xử lý số liệu:* Sử dụng phần mềm SPSS 22.0.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm chung của BN trong nghiên cứu

Đặc điểm BN	Nuôi cấy đơn n = 10; n (%)	Nuôi cấy nhóm n = 26; n (%)	p
Tuổi	38 (4,3)	37 (5,0)	0,62
Nguyên nhân vô sinh			
Do vợ	6 (60,0)	17 (65,4)	0,42
Do chồng	1 (10,0)	2 (7,7)	
Cả hai	1 (10,0)	0	
Không rõ nguyên nhân	2 (20,0)	7 (26,9)	
Loại vô sinh			
Nguyên phát	1 (10,0)	1 (3,8)	0,47
Thứ phát	9 (90,0)	25 (96,2)	
Nồng độ AMH	3,2 (3,9)	1,4 (2,2)	0,39
AFC	14 (20,0)	9 (7,0)	0,09
Số noãn chọc hút	8,5 (15,8)	7 (6,3)	0,25
Số noãn ICSI	6,5 (8,8)	5 (5,0)	0,31
Số phôi ngày 2	6 (7,0)	4,5 (2,0)	0,16

Các biến định lượng được mô tả dưới dạng trung vị (IQR), các biến định tính được mô tả theo tỷ lệ phần trăm.

Không có sự khác biệt đáng kể về đặc điểm BN trong hai nhóm nghiên cứu. Phần lớn các cặp vợ chồng trong nghiên cứu điều trị hiếm muộn do nguyên nhân từ vợ và đa số là vô sinh thứ phát.

2. So sánh tỷ lệ tạo phôi nang của hai phương pháp nuôi đơn và nuôi nhóm

	Tạo phôi nang	Không tạo phôi nang	Tổng số phôi	p	OR (95%CI)
Nuôi đơn	46 (53,5)	40 (46,5)	86 (100,0)	0,25	1,15 (0,80 - 2,35)
Nuôi nhóm	63 (45,7)	75 (54,3)	138 (100,0)		

Tỷ lệ tạo phôi nang có xu hướng cao hơn ở nhóm phôi nuôi cấy đơn, tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

	Ngày 5	Ngày 6	Ngày 7	Tổng	p
Nuôi đơn n (%)	31 (67,4%)	12 (26,1%)	3 (6,5%)	46 (100,0%)	0,49
Nuôi nhóm n (%)	39 (61,9%)	22 (34,9%)	2 (3,2%)	63 (100,0%)	

Tỷ lệ phôi tạo nang ngày 5, ngày 6 và ngày 7 không có sự khác biệt giữa 2 nhóm nghiên cứu.

3. So sánh tỷ lệ phôi nang tốt của hai phương pháp nuôi đơn và nuôi nhóm

	Phôi nang tốt	Phôi nang trung bình - xấu	Tổng số phôi	p	OR (95%CI)
Nuôi đơn n (%)	35 (76,1%)	11 (23,9%)	46 (100,0%)	0,58	1,27 (0,53 - 3,04)
Nuôi nhóm n (%)	45 (71,3%)	18 (28,7 %)	63 (100,0%)		

Không có sự khác biệt về tỷ lệ phôi nang tốt giữa hai nhóm.

4. So sánh đặc điểm di truyền của phôi nang nuôi cấy đơn và nuôi cấy nhóm

Phương pháp nuôi cấy	Tuổi phôi sinh thiết				
	Ngày 5	Ngày 6	Ngày 7	Tổng	p
Nuôi đơn n (%)	21 (65,6%)	8 (25,0%)	3 (9,4%)	32 (100,0%)	0,58
Nuôi nhóm n (%)	37 (71,2%)	13 (25,0%)	2 (3,8%)	52 (100,0%)	

Không có sự khác biệt về tỷ lệ phôi sinh thiết ngày 5, ngày 6 và ngày 7 giữa 2 nhóm nghiên cứu.

	Chuẩn bội	Lệch bội	Khảm	Không có kết quả	Tổng số phôi	p
Nuôi đơn n (%)	14 (43,8)	14 (43,8)	3 (9,4)	1 (3,1)	32 (100,0)	0,62
Nuôi nhóm n (%)	16 (30,8)	30 (57,7)	5 (9,6)	1 (1,9)	52 (100,0)	

Tỷ lệ phôi chuẩn bội có xu hướng cao hơn ở nhóm nuôi cấy đơn, tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

BÀN LUẬN

1. Tỷ lệ tạo phôi nang và chất lượng phôi nang nuôi cấy bằng hai phương pháp

Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, phôi nuôi cấy đơn có xu hướng phát triển được tới giai đoạn phôi nang nhiều hơn so với nuôi cấy nhóm (53,5% so với 45,7%) tuy nhiên, khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ phôi nang tốt ở 2 nhóm nghiên cứu không có sự khác biệt rõ ràng. Nghiên cứu của Lazaro (2010) cũng cho thấy ở nhóm BN > 35 tuổi, khác biệt về tỷ lệ phôi nang hữu dụng giữa những phôi nuôi cấy đơn và phôi nuôi cấy nhóm là không đáng kể [4]. Mặt khác, báo

cáo của Ebner cũng trong năm 2010 lại nhận thấy phôi nuôi cấy nhóm có tỷ lệ tạo phôi nang và tỷ lệ phôi nang tốt cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nuôi cấy đơn [2]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của tác giả Ebner không giới hạn tuổi của BN (tuổi trung bình là 31,6 - tương đối thấp so với nghiên cứu của chúng tôi), tác giả cũng sử dụng cả 2 phương pháp thụ tinh noãn (bao gồm ICSI và IVF cổ điển) trong khi 100% noãn trong nghiên cứu này được thực hiện phương pháp ICSI.

2. Tỷ lệ chuẩn bội của phôi nang nuôi cấy bằng hai phương pháp

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ chuẩn bội của phôi nang nuôi cấy đơn có

xu hướng cao hơn so với phôi nuôi cấy nhóm, tuy khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tương tự như vậy, nghiên cứu của Saborido (2019) nhận thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ phôi chuẩn bội, tỷ lệ làm tổ, tỷ lệ thai lâm sàng cũng như tỷ lệ sinh sống giữa hai phương pháp nuôi cấy [4]. Mặt khác, báo cáo của Makieva (2020) lại cho thấy phôi nuôi cấy đơn có tỷ lệ chuẩn bội thấp hơn 7,1% so với nuôi cấy nhóm [5]. Nguyên nhân của sự khác biệt này có thể do nhóm tác giả đưa cả những phôi nuôi cấy riêng lẻ do có một phôi dư vào nhóm nuôi cấy nhóm và bản chất hồi cứu của nghiên cứu cũng có thể tiềm ẩn một số yếu tố gây nhiễu khó kiểm soát.

Thực tế trong tự nhiên, mỗi chu kỳ buồng trứng của người phụ nữ chỉ tạo được một noãn trưởng thành, sẵn sàng thụ tinh với tinh trùng. Đường sinh dục nữ theo sinh lý cũng chỉ nuôi dưỡng một phôi duy nhất trong một thời kỳ thai sản. Vì vậy, phôi trong tự nhiên không chịu ảnh hưởng của các phôi khác như nuôi cấy nhóm. Bên cạnh đó, ngoài những tác động tích cực từ các yếu tố cận tiết và ngoại tiết, những ảnh hưởng tiêu cực từ các phôi chất lượng kém hơn cũng chưa được nghiên cứu rõ ràng. Ở nghiên cứu này, chúng tôi chưa tìm thấy sự khác biệt về hiệu quả của hai phương pháp nuôi cấy tới chất lượng phôi cả về khả năng phát triển, hình thái lẫn đặc điểm di truyền, có lẽ do cỡ mẫu nghiên cứu còn khá nhỏ. Để khẳng định được những kết luận này, cần nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu trên 224 phôi thu được từ 36 BN làm thụ tinh trong ống nghiệm và xét nghiệm di truyền tiền làm tổ tại Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh tháng 10/2020 nhận thấy:

- Tỷ lệ tạo phôi nang của phương pháp nuôi cấy đơn là 53,5% cao hơn không đáng kể so với nuôi cấy nhóm (45,7%) ($p > 0,05$).

- Tỷ lệ phôi nang tốt của hai phương pháp nuôi cấy là tương đương nhau, 76,1% ở nhóm nuôi cấy đơn và 71,3% với phương pháp nuôi cấy nhóm.

- Tỷ lệ phôi nang chuẩn bội ở hai phương pháp là 43,8% đối với nuôi cấy đơn và 30,8% đối với nuôi cấy nhóm, khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Carmona Saborido L., Guillén González V., Santana Martín A., et al. Effect on group culture vs individual culture on viability and embryo ploidy in pgt-a treatments. *Reproductive BioMedicine Online* 2019; 39:e42.
2. Ebner T., Shebl O., Moser M., et al. Group culture of human zygotes is superior to individual culture in terms of blastulation, implantation and life birth. *Reprod Biomed Online* 2010; 21(6):762-768.
3. Huang L., Bogale B., Tang Y., et al. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophoctoderm biopsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019; 116(28):14105-14112.
4. Rebollar-Lazaro I., Matson P. The culture of human cleavage stage embryos alone or in groups: Effect upon blastocyst utilization rates and implantation. *Reprod Biol* 2010; 10(3):227-234.
5. Srl N. Comparison of ploidy outcomes between grouped and single embryo culture in preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) cycles. <<https://www.laboratoriogenoma.eu/notizie/comparison-of-ploidy-outcomes-between-grouped-and-single-embryo-culture-in-preimplantation-genetic-testing-for-aneuploidy-pgt-a-cycles.aspx>>, accessed: 14/11/2020.