

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

BỘ Y TẾ



PHAN THỊ THANH LAN

**NGHIÊN CỨU HIỆU QUẢ HAI PHƯƠNG PHÁP
ĐÔNG PHÔI CHẬM VÀ ĐÔNG PHÔI THỦY TINH HÓA**

Chuyên ngành : Sản phụ khoa

Mã số : 62720131

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2020

**Công trình được hoàn thành tại:
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. Nguyễn Việt Tiến

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường
họp tại Trường Đại học Y Hà Nội

Vào hồigiờ.....ngày.....tháng.....năm 2020.

Có thể tìm hiểu luận án tại các thư viện:

- Thư viện Quốc Gia
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội
- Thư viện Bệnh viện Phụ sản Trung Ương

**CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ
LIÊN QUAN ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN**

1. Phan Thị Thanh Lan (2015), “Đánh giá chất lượng phôi sau rã đông và tỷ lệ có thai sau chuyển phôi ngày 2 - ngày 3 đông lạnh theo phương pháp thủy tinh hóa”, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, Số 95 (3), tr. 15-23.
2. Phan Thị Thanh Lan (2015), “Đánh giá chất lượng phôi sau rã đông và tỷ lệ có thai sau chuyển phôi ngày 2 - ngày 3 đông lạnh theo phương pháp đông lạnh chậm”, *Tạp chí Y học thực hành*, Số 979 (10), tr. 2-6.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trữ lạnh là kỹ thuật không thể thiếu trong hỗ trợ sinh sản. Đã có 2 phương pháp trữ lạnh được áp dụng là: Hạ nhiệt độ chậm và thủy tinh hóa. Sự khác biệt chính của 2 phương pháp này là tốc độ hạ nhiệt và nồng độ chất bảo quản (CPA). Trong một thời gian khá dài, dù có những hạn chế về mặt hiệu quả nhưng hạ nhiệt độ chậm đã được xem là một phương pháp trữ lạnh chuẩn mực trong ngành công nghiệp chăn nuôi cũng như trong IVF trên người. Trái lại, một khoảng thời gian dài sau khi được giới thiệu, thủy tinh hóa vẫn được xem là một kỹ thuật mang tính thử nghiệm vì nhiều lý do. Trong đó, lo ngại về các độc tính có thể có của việc sử dụng chất bảo quản nồng độ cao trên phôi và khó khăn trong việc thiết lập một hệ thống làm lạnh với tốc độ cao là những trở ngại chính. Vì vậy, đánh giá hiệu quả các quy trình trữ lạnh thông qua các tiêu chí: tỷ lệ phôi sống, tỷ lệ có thai, tỉ lệ sinh sống, cũng như các yếu tố liên quan tiên lượng kết quả có thai, theo dõi sự hình thành phát triển chiều cao, cân nặng, thể chất, trí tuệ, tâm vận động, bệnh tật từ khi sinh ra cho đến khi 4 tuổi để đưa ra tiên lượng cho sự phát triển tiếp theo cho những trẻ sinh ra từ 2 phương pháp này là cần thiết.

Do đó chúng tôi thực hiện đề tài: “Nghiên cứu hiệu quả hai phương pháp đông phôi chậm và đông phôi thủy tinh hóa” với 2 mục tiêu:

1. Đánh giá đặc điểm phôi sau rã đông của hai phương pháp đông phôi chậm và đông phôi thủy tinh hóa.

2. Đánh giá một số yếu tố liên quan và tiên lượng của hai 2 phương pháp đông phôi chậm và đông phôi thủy tinh hóa.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- 1- Khẳng định hình thái phôi tốt có tương quan chặt về số lượng sau mỗi bước kỹ thuật và làm tăng khả năng có thai, có ý nghĩa thống kê.
- 2- Tìm ra giá trị cụ thể để tiên lượng kết quả có thai của số lượng và chất lượng phôi trước đông, sau rã, trước chuyên.
- 3- Theo dõi lâu dài sau khi trẻ ra đời cho 2 phương pháp trữ lạnh: đông chậm và thủy tinh hóa.

CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN

Luận án bao gồm 148 trang, 4 chương, 55 bảng, 16 biểu đồ, 13 hình, 145 tài liệu tham khảo với 12 tài liệu tiếng Việt và 133 tài liệu tiếng nước ngoài.

Phần đặt vấn đề: 02 trang; chương 1: tổng quan tài liệu 41 trang; chương 2: đối tượng và phương pháp nghiên cứu 13 trang; chương 3 kết quả nghiên cứu 49 trang; chương 4 bản luận 39 trang; kết luận 3 trang; khuyến nghị 01 trang; những đóng góp mới của luận án; danh mục bài báo liên quan; 6 phụ lục.

Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Những thay đổi bên trong tế bào trong quá trình trữ lạnh.

Từ 15°C đến -5°C: các hạt lipid, các màng giàu lipid và các sợi vi ống bên trong tế bào có thể bị tổn thương. Enzym giảm tốc độ hoạt động. Bot khí trong môi trường nuôi cấy chèn ép làm tổn thương đến cấu trúc trong tế bào. Hình thành tinh thể đá từ các phân tử nước ở môi trường ngoại bào và môi trường nội bào gây tổn thương cơ học lên màng tế bào và các bào quan bên trong. Đây là giai đoạn gây tổn thương lớn nhất và quan trọng nhất. Nhiệt độ càng giảm: số lượng phân tử nước chuyển thành tinh thể đá càng tăng, lượng nước ở thể lỏng giảm dần. Hậu quả: nồng độ chất tan trong môi trường ngoại bào tăng, gây mất cân bằng về áp lực thẩm thấu giữa tế bào với môi trường. Nước từ bên trong tế bào chất bị rút ra ngoài và kích thước tế bào trở nên co nhỏ. Nếu tế bào bị co nhỏ quá mức, sự tổn thương màng lipoprotein của tế bào xảy ra không thể phục hồi. Tăng nhiệt độ tiềm tàng cũng là một hậu quả của sự hình thành các tinh thể đá. Sự thay đổi nhiệt độ đột ngột này có thể làm ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của tế bào sau khi rã đông hay thậm chí làm tế bào chết ngay trong quá trình làm lạnh.

Từ -50°C đến -150°C, màng trong suốt có thể bị đứt gãy.

Ở nhiệt độ lưu trữ mẫu -196°C, tế bào ít bị ảnh hưởng bất lợi nhất trong toàn bộ quy trình trữ lạnh.

1.2. Các biện pháp hạn chế tổn thương tế bào trong trữ lạnh.

1.2.1. Sử dụng chất bảo quản lạnh (CPA).

CPA khử nước bên trong tế bào, giúp hạn chế sự tạo thành tinh thể đá nội bào. CPA hạn chế sự gia tăng nồng độ của các chất hoà tan. CPA gắn lên màng bào tương để bảo vệ tế bào khi các phân tử nước ngoại bào bắt đầu chuyển sang dạng tinh thể. Hai dạng CPA thường được sử

dụng trong đông lạnh là CPA có khả năng thẩm thấu và CPA không có khả năng thẩm thấu qua màng tế bào. Hầu hết các CPA đều có khả năng gây độc tính. Độc tính của CPA tỉ lệ thuận với nồng độ và thời gian tiếp xúc, nhất là khi ở nhiệt độ sinh lý.

1.2.2. Kiểm soát tốc độ làm lạnh và rã đông.

1.2.3. Trang thiết bị và dụng cụ.

1.3. Các phương pháp trữ lạnh.

1.3.1. Hạ nhiệt độ chậm (Slow - freezing)

1.3.1.2. Ưu và nhược điểm của hạ nhiệt độ chậm:

- Ưu điểm: Tính an toàn cao do được thiết lập dựa trên sự cân bằng về tốc độ làm lạnh và nồng độ CPA. Nồng độ CPA được sử dụng thấp (1-1,5mol/l) và chỉ kết hợp một chất có khả năng và một chất không có khả năng thẩm thấu qua màng tế bào nên tính độc đối với tế bào thấp.

- Nhược điểm: Do nồng độ CPA sử dụng không cao, nên tính thể đá nội bào vẫn có thể được tạo ra trong quá trình hạ nhiệt độ. Đây là nguyên nhân chính làm cho tỉ lệ sống của giao tử và phôi sau đông chậm không cao. Chi phí để trang bị hệ thống hạ nhiệt cao. Thời gian thực hiện cho một lần đông lạnh noãn và phôi trên thực tế khá dài (trung bình 1,5 -2 giờ)

1.3.2. Thủy tinh hóa (vitrification)

- Ưu điểm: Không hình thành tinh thể đá nội, ngoại bào. Rút ngắn thời gian cho một chu trình đông lạnh - rã đông. Tiết kiệm chi phí đầu tư ban đầu.

- Nhược điểm: Lo ngại về các độc tính có thể có của việc sử dụng CPA nồng độ cao trên phôi. Khó khăn trong việc thiết lập một hệ thống làm lạnh với tốc độ cao là những trở ngại chính. Việc lấy nhiễm chéo giữa các mẫu trong quá trình lưu trữ cũng đã được ghi nhận.

1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả chuyển phôi trữ lạnh.

1.4.1. Các tác nhân ảnh hưởng đến hiệu quả quy trình trữ lạnh

1.4.2. Tuổi của người vợ.

1.4.3. Nguyên nhân vô sinh

1.4.4. Kỹ thuật hỗ trợ.

1.4.5. Thời gian bảo quản phôi.

1.4.6. Tuổi phôi trước đông.

1.4.7. Số phôi được chuyển vào buồng tử cung.

1.4.8. Chất lượng phôi được chuyển vào buồng tử cung.

1.4.9. Ảnh hưởng của kỹ thuật chuyển phôi.

1.4.10. Ảnh hưởng của nội mạc tử cung (NMTC) tới kết quả chuyển phôi đông lạnh (FET)

1.4.11. Ảnh hưởng của kỹ thuật hỗ trợ phôi thoát màng.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

- Đối tượng 1: bệnh nhân rã đông phôi ngày 2, ngày 3 trữ theo phương pháp đông lạnh chậm.

- Đối tượng 2: bệnh nhân rã đông phôi ngày 2, ngày 3 trữ theo phương pháp thủy tinh hóa.

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn:

Đối tượng 1: BN còn dư phôi đông chậm (không hạn chế tuổi chuyên phôi, không hạn chế số lần IVF, không hạn chế nguyên nhân vô sinh, bao gồm cả xin phôi, xin trứng), được rã đông và chuyên phôi.

- Đối tượng 2: BN trữ phôi thủy tinh hóa (không hạn chế tuổi chuyên phôi, không hạn chế số lần IVF, không hạn chế nguyên nhân vô sinh, bao gồm cả xin phôi, xin trứng), sau đó được rã đông và chuyên phôi.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ: Mẹ mắc bệnh toàn thân.

2.2. Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm Hỗ trợ sinh sản Quốc gia, Bệnh viện Phụ sản Trung ương.

2.3. Thời gian nghiên cứu: từ tháng 1/2013 đến tháng 4/2019.

2.4. Phương pháp nghiên cứu: Mô tả theo dõi dọc.

2.5. Cơ mẫu nghiên cứu: Cơ mẫu được tính theo công thức nghiên cứu mô tả theo dõi dọc [103].

$$n = \frac{[Z_{(1-\alpha/2)}]^2 p \times (1-p)}{(d)^2}$$

n = Cơ mẫu nghiên cứu

$Z_{(1-\alpha/2)}$ = 1.96 với Hệ số tin cậy 95% ($\alpha=0.05$).

d = sai số tuyệt đối, chọn $d = 0.09$

p = Tỷ lệ có thai

Với nhóm đông phôi chậm: tỷ lệ có thai theo nghiên cứu của El- Toukhy – 2004 là 11,3% [79].

Với nhóm thủy tinh hoá: tỷ lệ có thai theo nghiên cứu của Hán Mạnh Cường – 2010 là 30,1% [91].

Commented [M1]: cần tính theo cỡ mẫu khác

Formatted: Font: 11 pt, Font color: Black

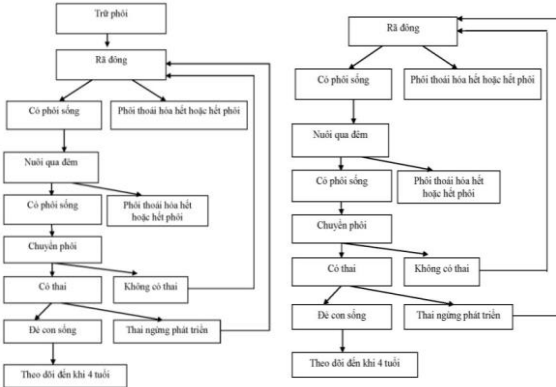
Field Code Changed

Field Code Changed

Thay vào công thức tính được :

Cỡ mẫu tối thiểu là 48 bệnh nhân cho nhóm đông chậm và 99 bệnh nhân cho nhóm thụ tinh hóa. Trên thực tế nghiên cứu này được thực hiện trên 220 bệnh nhân nhóm đông phôi chậm (với 58 bệnh nhân đông phôi ngày 3 và 162 bệnh nhân đông phôi ngày 2) và 324 bệnh nhân ở nhóm thụ tinh hoá (với 162 bệnh nhân đông phôi ngày 3 và 162 bệnh nhân đông phôi ngày 2).

2.7. Sơ đồ nghiên cứu.



2.8. Các chỉ tiêu nghiên cứu

2.8.1. Phôi: Số lượng phôi trước đông, sau rã, trước chuyển của 3 loại tốt, trung bình, xấu. Tỷ lệ phôi sống sau rã đông. Tỷ lệ phôi rã đông thoái hoá hoàn toàn. Tỷ lệ phôi sống nguyên vẹn 100%. Tỷ lệ phôi phân chia tiếp.

2.8.2. Một số yếu tố liên quan đến tỷ lệ có thai: Tuổi mẹ, số lượng phôi chuyển, chất lượng phôi, độ dày niêm mạc tử cung, diêm chuyển phôi

2.8.3. Thai: tỷ lệ có thai, tỷ lệ sinh sống, tỷ lệ thai ngừng tiến triển.

2.8.4. Diễn biến thai kỳ.: Có thai sinh hoá, có thai lâm sàng, thai sảy, thai lưu, đẻ non.

2.8.5. Trí tuệ và tâm vận động từ khi sinh đến khi trẻ 4 tuổi

- Cân nặng, chiều cao, phát triển trí tuệ, tâm vận động lúc 3 tháng, 6 tháng, 9 tháng, 12 tháng, 2 tuổi, 3 tuổi, 4 tuổi.

2.9. Xử lý và phân tích số liệu: Thu thập theo phiếu điều tra, xử lý số liệu theo SPSS 17.0. Vẽ biểu đồ bằng phần mềm Excel 2010.

2.10. Khống chế sai số và yếu tố nhiễu

2.11. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

- Đề tài được hội đồng khoa học và hội đồng y đức thông qua.
- Thông tin cá nhân được bảo đảm giữ bí mật.

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm phôi trước và sau rã đông của 2 phương pháp.

3.1.3. Chất lượng phôi trước và sau rã đông.

Bảng 3.14. Chất lượng phôi sau rã và trước chuyển tính theo tỷ lệ.

Tỷ lệ	Đông lạnh chậm			Thủy tinh hóa		
	Nhóm phôi ngày 2 (Ia)	Nhóm phôi ngày 3 (Ib)	P	Nhóm phôi ngày 2 (IIa)	Nhóm phôi ngày 3 (IIb)	P
Tỷ lệ sống sau rã	460/736 62,5 %	143/253 56,5 %	p<0.05	552/700 78,9%	391/556 70,3%	p<0.05
Tỷ lệ sống nguyên vẹn sau rã	289/736 39,3 %	84/253 33,2 %	p<0.05	471/700 67,3%	383/556 68,9%	p<0.05
Tỷ lệ phôi thoái hoá hoàn toàn	263/736 35,7 %	106/253 41,9 %	p<0.05	172/700 25,6%	173/556 31,1%	p<0.05
Tỷ lệ phôi phân chia tiếp	182/460 39,6%	53/143 37,1 %	p<0.05	313/552 56,7%	203/391 51,9%	p<0.05

Formatted: Font: 11 pt, Vietnamese

Formatted: Font: 11 pt, Bold, Vietnamese

Formatted: Font: 11 pt, Vietnamese

Formatted: Font: 11 pt, Vietnamese

Formatted: Font: 11 pt, Not Bold, Vietnamese

Formatted: Font: 11 pt, Not Bold, Vietnamese

3.2. Một số yếu tố liên quan và tiên lượng của 2 phương pháp.

3.2.2. Một số yếu tố liên quan đến kết quả có thai của hai phương pháp.

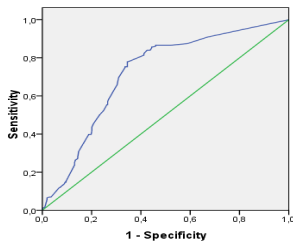
3.2.2.1. Mối liên quan giữa tuổi vợ và kết quả có thai.

Bảng 3.19. Mối liên quan giữa tuổi vợ và kết quả có thai.

Tuổi vợ		Kết quả		Tổng
		Có thai	Không có thai	
Nhóm tuổi	Tuổi ≤ 35	N 69	302	371
		% 18,6%	81,4%	100,0%
	Tuổi > 35	N 36	137	173
		% 20,8%	79,2%	100,0%
Tổng		N 105	439	544
		% 19,3%	80,7%	100,0%

3.2.2.2. Mối liên quan giữa độ dày niêm mạc tử cung và kết quả có thai.

ROC Curve



Diagonal segments are produced by ties.

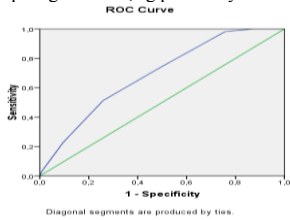
Biểu đồ 3.1. Mối liên quan giữa độ dày niêm mạc tử cung và kết quả có thai.

Nhận xét: Độ dày niêm mạc tử cung có giá trị tiên lượng khá tốt kết quả có thai vì diện tích dưới đường cong: 0,718. - $P < 0.0001$. Điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là 8,05 có độ nhạy là 77,9%, độ đặc hiệu 65,2%. Tại điểm cắt = 14,15mm, độ đặc hiệu là 100%.

Bảng 3.21. Tỷ suất chênh về kết quả có thai giữa các nhóm độ dày niêm mạc tử cung.

Độ dày NMTC	OR	95%CI	P
>8- 14mm	1,161	1,096-1,23	0,023
≤8mm hoặc >14mm	0,363	0,187-0,704	0,002

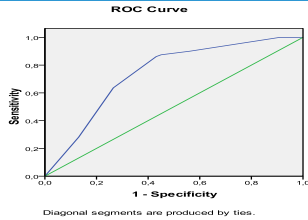
3.2.2.3. Mối liên quan giữa số lượng phôi chuyển và kết quả có thai.



Biểu đồ 3.2. Mối liên quan giữa số lượng phôi chuyển và kết quả có thai.

Nhận xét: Số phôi chuyển có giá trị tiên lượng khá tốt kết quả có thai vì: diện tích dưới đường cong: 0,688. - $P < 0,0001$. Điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là 3 có độ nhạy là 73,3%, độ đặc hiệu 51,3%. Chỉ số J cao nhất = 24,6%.

3.2.4.5. Mối liên quan giữa điểm chuyển phôi và kết quả có thai.



Biểu đồ 3.3. Mối liên quan giữa điểm chuyển phôi và kết quả có thai.

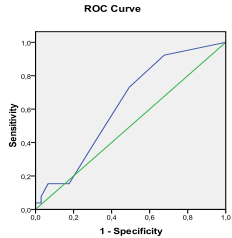
Nhận xét: Điểm chuyển phôi có giá trị tiên lượng khá tốt kết quả có thai vì diện tích dưới đường cong: 0,741. - $P < 0,0001$. Điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là 4 có độ nhạy là 86,1%, độ đặc hiệu 56,9%. Chỉ số J cao nhất = 43%.

3.2.4.6. Giá trị của số lượng phôi tốt ở từng bước kỹ thuật trong tiên lượng kết quả có thai.

3.2.4.6.1. Giá trị của số lượng phôi tốt (độ 3) trước đông trong tiên lượng kết quả có thai.

Formatted: Font: Times New Roman, 11 pt, Not Bold

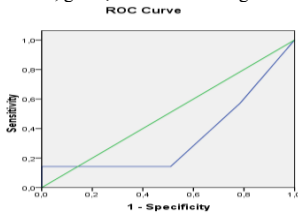
Formatted: 2, Line spacing: single



Diagonal segments are produced by ties.

Biểu đồ 3.4. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 2 trước đông chậm trong tiền lượng kết quả có thai.

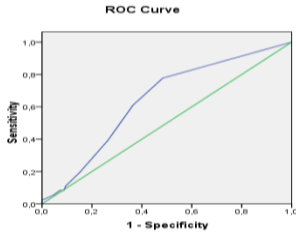
Nhận xét: Số lượng phôi tốt ngày 2 trước đông chậm có giá trị trong tiền lượng kết quả có thai, dù giá trị tiền lượng không cao vì diện tích dưới đường cong: 0,626. - P = 0,043. Điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là 2 có độ nhạy là 73,1%, độ đặc hiệu 50,7%, chỉ số (J) 23,8. Tại điểm cắt = 15, độ đặc hiệu là 100%, giá trị chẩn đoán dương tính là 100%.



Diagonal segments are produced by ties.

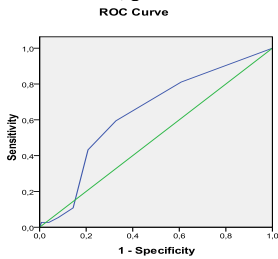
Biểu đồ 3.5. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 3 trước đông chậm trong tiền lượng kết quả có thai.

Nhận xét: Số lượng phôi tốt ngày 3 trước đông chậm không có giá trị trong tiền lượng kết quả có thai vì diện tích dưới đường cong: 0,34. - P = 0,174.



Diagonal segments are produced by ties.

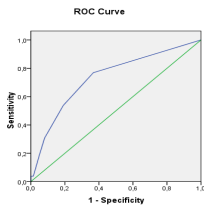
Biểu đồ 3.6. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 2 trước đông thụ tinh hóa trong tiên lượng kết quả có thai.
 Nhận xét: Số lượng phôi tốt ngày 2 trước đông thụ tinh hóa có giá trị trong tiên lượng kết quả có thai, dù giá trị tiên lượng không cao vì diện tích dưới đường cong: 0,639. - P = 0.011. Điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là 1 có độ nhạy là 77,8%, độ đặc hiệu 51,6%, chỉ số (J) 29,4. Tại điểm cắt = 17, độ đặc hiệu là 100%, giá trị chẩn đoán dương 100%.



Diagonal segments are produced by ties.

Biểu đồ 3.7. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 3 trước đông thụ tinh hóa trong tiên lượng kết quả có thai.
 Nhận xét: Số lượng phôi tốt ngày 3 trước đông thụ tinh hóa có giá trị trong tiên lượng kết quả có thai, dù giá trị tiên lượng không cao vì diện tích dưới đường cong: 0,638. - P = 0.011. Điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là 2 có độ nhạy là 59,5%, độ đặc hiệu 67,2%, chỉ số (J) 26,7. Tại điểm cắt = 11, giá trị chẩn đoán dương tính là 100%.

3.2.4.6.2. Giá trị của số lượng phôi tốt (độ 3) sau rã trong tiên lượng kết quả có thai.

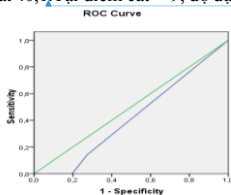


Diagonal segments are produced by ties.

Biểu đồ 3.8. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 2 sau rã đông chậm trong tiên lượng kết quả có thai.

Nhận xét: Số lượng phôi tốt ngày 2 sau rã đông chậm có giá trị tốt trong tiên lượng kết quả có thai vì diện tích dưới đường cong: 0,734. - $P < 0.0001$. Điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là 1 có độ nhạy là 76,9%, độ đặc hiệu 63,2%, chỉ số (J) cao nhất 40,1. Tại điểm cắt = 9, độ đặc hiệu là 100%.

Formatted: Font: 11 pt, Vietnamese



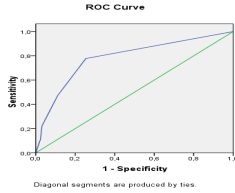
Diagonal segments are produced by ties.

Biểu đồ 3.9. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 3 sau rã đông chậm trong tiên lượng kết quả có thai.

Nhận xét: Số lượng phôi tốt ngày 3 sau rã đông chậm không có giá trị trong tiên lượng kết quả có thai vì diện tích dưới đường cong: 0,42. - $P < 0.492$.

Formatted: List Paragraph, Justified, Indent: First line: 0.5 cm, Line spacing: Multiple 0.97 li, No widow/orphan control

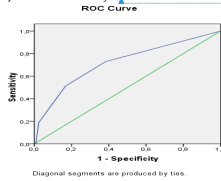
Formatted: Font: 11 pt, Not Italic, Font color: Text 1, Vietnamese, Condensed by 0.4 pt



Biểu đồ 3.10. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 2 sau rã thủy tinh hóa trong tiên lượng kết quả có thai.

Nhận xét: Số lượng phôi tốt ngày 2 sau rã thủy tinh hóa có giá trị tiên lượng khá tốt kết quả có thai vì diện tích dưới đường cong: 0,783. - $P < 0.0001$. Điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là 1 có độ nhạy là 77,8%, độ đặc hiệu 74,6%, chỉ số (J) cao nhất 52,4.

Formatted: Font: 11 pt, Font color: Text 1, Vietnamese



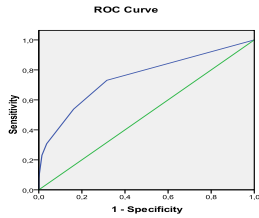
Biểu đồ 3.11. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 3 sau rã thủy tinh hóa trong tiên lượng kết quả có thai.

Nhận xét: Số lượng phôi tốt sau rã có giá trị tiên lượng khá tốt kết quả có thai vì diện tích dưới đường cong: 0,719. - $P < 0.0001$. Điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là 2 có độ nhạy là 51,4%, độ đặc hiệu 83,2%, chỉ số (J) 34,6.

Formatted: Centered, Space After: 0 pt, Line spacing: Multiple 0.97 li, No bullets or numbering, No widow/orphan control, Tab stops: Not at 2.25 cm + 7.62 cm

3.2.4.6.3. Giá trị của số lượng phôi tốt (độ 3) trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai.

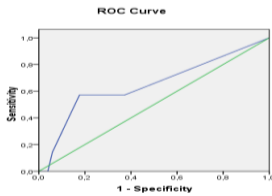
Formatted: Font: 11 pt, Font color: Text 1, Vietnamese, Condensed by 0.2 pt



Diagonal segments are produced by ties.

Biểu đồ 3.12. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 2- đông chậm trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai.

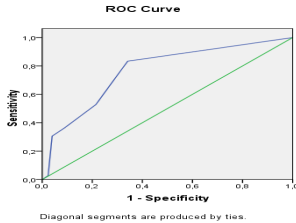
Nhận xét: Số lượng phôi tốt ngày 2- đông chậm trước chuyển có giá trị tốt trong tiên lượng kết quả có thai vì diện tích dưới đường cong: 0,751. - $P < 0,0001$. Điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là 1 có độ nhạy là 73,1%, độ đặc hiệu 68,4%, chỉ số (J) cao nhất 41,5. Tại điểm cắt 5, độ đặc hiệu = 100%, giá trị tiên đoán dương tính = 100%



Diagonal segments are produced by ties.

Biểu đồ 3.13. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 3- đông chậm trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai.

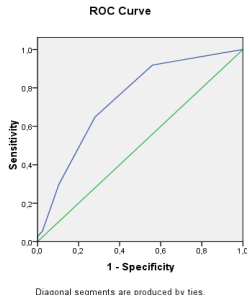
Nhận xét: Số lượng phôi tốt trước chuyển ít có giá trị tiên lượng kết quả có thai và không có ý nghĩa thống kê vì diện tích dưới đường cong: 0,648. - $P = 0,206$.



Biểu đồ 3.14. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 2- thụ tinh hóa trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai.

Nhận xét: Số lượng phôi tốt ngày 2- thụ tinh hóa trước chuyển có giá trị tiên lượng khá tốt kết quả có thai vì diện tích dưới đường cong: 0,766. - $P < 0.0001$. Điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là 1 có độ nhạy là 83,3%, độ đặc hiệu 65,9%, chỉ số (J) cao nhất 49,2.

Formatted: Justified, Space After: 0 pt, Line spacing: Multiple 1.1 li



Biểu đồ 3.15. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 3- thụ tinh hóa trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai.

Nhận xét: Số lượng phôi tốt ngày 3- thụ tinh hóa trước chuyển có giá trị tiên lượng khá tốt kết quả có thai vì diện tích dưới đường cong: 0,74. - $P < 0.0001$. Điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là 2 có độ nhạy là

64,9%, độ đặc hiệu 72%, chỉ số (J) cao nhất 36,9. Tại điểm cắt = 5, độ đặc hiệu là 100%, giá trị chẩn đoán dương tính là 100%

3.2.3. Kết quả và tiên lượng của 2 phương pháp.

3.2.3.1. Tỷ lệ có thai và diễn tiến thai kỳ của 2 phương pháp.

Bảng 3.42. Kết quả có thai và diễn biến thai kỳ sau chuyển phôi đông chậm.

Kết quả	Nhóm bệnh nhân chuyển phôi Nhóm phôi ngày 2		Nhóm bệnh nhân chuyển phôi Nhóm phôi ngày 3		P
	N	%	N	%	
Có thai	25	15,4	7	12,1	p>0,05
Thai sinh hoá	2	1,2	2	3,4	
Thai lâm sàng	23	14,2	5	8,6	p>0,05
Sảy thai	2	1,2	1	1,7	
Thai lưu	0	0	0	0	
Đẻ con sống	21	13	4	7	p>0,05
Không có thai	137	84,6	51	87,9	
Tổng	162	100	58	100	

Bảng 3.43. Kết quả có thai và diễn biến thai kỳ sau chuyển phôi thủy tinh hóa

Kết quả	Nhóm bệnh nhân chuyển phôi ngày 2		Nhóm bệnh nhân chuyển phôi ngày 3		P
	N	%	N	%	
Có thai	36	22,2	37	22,8	p>0,05
Thai sinh hoá	0	0	2	1,2	
Thai lâm sàng	36	22,2	35	21,6	p>0,05
Sảy thai	8	4,9	8	4,9	
Thai lưu	0	0	6	3,7	
Đẻ con sống	28	17,3	21	13	p>0,05
Không có thai	126	77,8	125	77,2	
Tổng	162	100	162	100	

Bảng 3.44. Tỷ lệ có thai và diễn tiến thai kỳ của 2 phương pháp.

Kết quả	Đông chậm	Thủy tinh hóa

	n	%	n	%
Có thai	32	32/220=14,5	73	73/324=22,5
Thai ngừng tiến triển	7	7/220=3,2	24	24/324=17,4
Đẻ con sống	25	25/220=11,4	49	49/324=15,1
<u>Đẻ non</u>	<u>2</u>	<u>2/220=0,91</u>	<u>7</u>	<u>7/324=2,2</u>
<u>Đa thai</u>	<u>3</u>	<u>3/220= 1,4</u>	<u>6</u>	<u>6/324= 1,9</u>
Cân nặng trung bình khi sinh	2936 ± 603,4		2900 ± 417,3	
Tuổi thai trung bình khi sinh	38,7 ± 1		38 ± 1,8	

Formatted: Font: 11 pt, Vietnamese

Formatted: Font: 11 pt, Vietnamese

Formatted: Font: 11 pt, Vietnamese

Formatted: Font: 11 pt, Vietnamese

3.2.3.2. Kết quả theo dõi trẻ sau sinh đến khi 4 tuổi của 2 phương pháp.

Bảng 3.45. Cân nặng trung bình thô của trẻ sơ sinh trai, gái tương ứng với tuổi thai 28-42 tuần.

Tuổi thai (tuần)	Đông chậm (Cân nặng trung bình - gram)		Thủy tinh hóa (Cân nặng trung bình - gram)		Trẻ sinh tự nhiên (Cân nặng trung bình - gram)*		P
	Trai (Ia) n= 15	Gái (Ib) n= 13	Trai (IIa) n=29	Gái (IIb) n= 26	Trai (IIIa)	Gái (IIIb)	
32			2200		1717	1699	$P_{Ia-IIIa}>0,05$ $P_{IIa-IIIa}>0,05$ $P_{Ib-IIIb}>0,05$ $P_{IIb-IIIb}>0,05$
33		1700	2100	1900	1907	1893	
35			2450		2255	2201	
36	2700	2000	2523	2400	2456	2428	
37	3054	2791	2952	2865	2841	2726	
38	3189	3054	3215	3012	3084	3023	
39	3268	3200	3489	3109	3284	3119	
40	3353	3276	3134	3011	3342	3199	

3.2.3.2. Kết quả theo dõi trẻ sau sinh đến khi 4 tuổi của 2 phương pháp.

Bảng 3.46. Cân nặng, chiều cao trung bình thô của trẻ sơ trai, gái tương ứng từ 3 tháng đến 4 tuổi.

Tuổi	Đông chậm (Cân nặng - chiều)	Thủy tinh hóa (Cân nặng - chiều)	Trẻ sinh tự nhiên (Cân nặng - chiều)	P
------	------------------------------	----------------------------------	--------------------------------------	---

	cao trung bình)		cao trung bình)		cao trung bình)*		p _{Ia-IIIa} >0,05 p _{IIa-IIIa} >0,05 p _{IIIa-IIIb} >0,05 p _{IIIb-IIIc} >0,05
	Trai (Ia) n=14	Gái (Ib) n=12	Trai (IIa) n=27	Gái (IIb) n=24	Trai (IIIa)	Gái (IIIb)	
3 tháng	6,6kg- 62,3cm	6,0kg- 60,8cm	6,5kg- 60,8cm	6,1kg- 60,2cm	6,4kg- 61,4cm	5,8kg- 59,8cm	
6 tháng	7,9kg- 68,3cm	7,2kg- 65,1cm	7,8kg- 68,1cm	7,4kg- 66,1cm	7,9kg- 67,6cm	7,3kg- 65,7cm	
9 tháng	8,8kg- 71,5cm	8,3kg- 71,3cm	8,7kg- 71,1cm	8,0kg- 69,6cm	8,9kg- 72,0cm	8,2kg- 70,1cm	
12 tháng	9,5kg- 74,5cm	9,1kg- 75,2cm	9,7kg- 76cm	9,0kg- 74,8cm	9,6kg- 75,7cm	8,9kg- 74,0cm	
2 tuổi	12,1kg- 86,3cm	11,7kg- 87,3cm	12,0kg- 86,9cm	11,7kg- 86,9cm	12,2kg- 87,8cm	11,5kg- 86,4cm	
3 tuổi	14,3kg- 95,7cm	13,8kg- 94,8cm	14,5kg- 95,9cm	14,1kg- 96,3cm	14,3kg- 96,1cm	13,9kg- 95,1cm	
4 tuổi	15,9kg- 100,2cm	15,4kg- 99,7cm	16,0kg- 101,1cm	15,6kg- 101,8cm	16,3kg- 103,3cm	16,1kg- 102,7cm	

3.2.3.2.3. Phát triển trí tuệ, tâm vận động, bệnh lý ở trẻ sinh ra sau chuyển phôi trữ lạnh (Phụ lục 6).

Bảng 3.47. Phát triển trí tuệ, tâm vận động, bệnh lý ở trẻ sinh ra sau chuyển phôi trữ lạnh.

Số trẻ	Đông chậm (n=28)		Thủy tinh hóa (n=55)	
	N	Tỷ lệ	N	Tỷ lệ
Mất đầu	2	2/28(7,1%)	3	3/55(5,5%)
Bình thường	26	26/26(100%)	49	49/52(94,2%)
Bệnh lý di truyền, di tật bẩm sinh	0	0/26 (0%)	3	3/52 (5,8%)

Chương 4: BÀN LUẬN

4.2. Bàn luận về đặc điểm phôi trước và sau rã đông của 2 phương pháp.

4.2.3.Đánh giá chất lượng phôi sau rã và trước chuyển của 2 phương pháp trữ lạnh.

4.2.3.2. Đánh giá chất lượng phôi sau rã và trước chuyển tính theo tỷ lệ sống.

* So sánh giữa 2 nhóm phôi ngày 2 và nhóm phôi ngày 3:

- Tỷ lệ sống, tỷ lệ sống nguyên vẹn, tỷ lệ phôi phân chia tiếp của nhóm phôi ngày 2 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm phôi ngày 3. Đồng thời, tỷ lệ phôi thoái hoá hoàn toàn của nhóm phôi ngày 3 cao hơn hẳn nhóm phôi ngày 2 với $p < 0.05$ (Bảng 3.14). Kết quả của chúng tôi phù hợp với nhiều nghiên cứu tại Việt Nam và trên thế giới. Các nghiên cứu này đều cho rằng số lượng phôi bào càng tăng thì sự hủy hoại tế bào càng nhiều hơn do tăng diện tích tiếp xúc bề mặt, dù áp dụng phương pháp trữ đông nào. Chất lượng phôi sau rã đông được đánh giá sau rã đông 1 giờ, phản ánh ảnh hưởng của quá trình trữ lạnh – rã đông lên phôi. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã ghi nhận quá trình trữ lạnh – rã đông đã làm thay đổi cấu trúc, hình thái và cả số lượng của các phôi so với trước trữ lạnh.

* Đánh giá so sánh giữa 2 phương pháp trữ lạnh.

- Tỷ lệ sống, tỷ lệ sống nguyên vẹn, tỷ lệ phôi phân chia tiếp của phương pháp thủy tinh hóa có xu hướng cao hơn phương pháp đông chậm. Tỷ lệ phôi thoái hóa hoàn toàn của phương pháp thủy tinh hóa có xu hướng thấp hơn phương pháp đông chậm. Kết quả nghiên cứu này trùng hợp với kết quả nghiên cứu của tác giả Debrock S- 2015, Zhu HY-2015.

4.3.Bàn luận về một số yếu tố liên quan và tiên lượng của 2 phương pháp trữ lạnh.

4.3.1. Đặc điểm bệnh nhân và mối liên quan đến kết quả có thai.

4.3.1.1. Tuổi.

Tuổi trung bình của BN chuyển phôi đông lạnh từ 33.1 đến 33.9. (Bảng 3.18). Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi cho thấy phần lớn các cặp vợ chồng đều mong muốn tìm kiếm cơ hội có con trong độ tuổi sinh đẻ từ 18 đến 35. Quyết định nhận vào nghiên cứu các trường hợp bệnh nhân lớn tuổi chuyển phôi đông lạnh, có xin trứng, đưa tới kết quả không thấy có sự khác biệt về tỷ lệ có thai giữa 2 nhóm tuổi trên 35 và dưới 35 ($p=0.068$) [Bảng 3.19]. Kết quả này ủng hộ lập luận

rằng tỷ lệ thành công giảm ở phụ nữ trên 35 tuổi chủ yếu do giảm chất lượng và số lượng trứng có được khi kích thích buồng trứng. Ở phụ nữ lớn tuổi, sự phát triển của NMTC thích hợp cho sự làm tổ và phát triển của phôi hoàn toàn có thể điều khiển bằng các nội tiết tố ngoại sinh. Ở cả 2 đối tượng chuyển phôi đông chậm và thủy tinh hóa, không có sự khác biệt khi so sánh độ tuổi trung bình giữa 2 nhóm BN chuyển phôi ngày 2 và ngày 3.

4.3.1.2. Độ dày NMTC.

Trong nghiên cứu này, để xác định điểm cắt giá trị độ dày NMTC trong chu kỳ chuyển phôi đông lạnh thành công là bao nhiêu, toàn bộ BN được chuẩn bị NMTC bằng nội tiết ngoại sinh đều được chuyển phôi. Theo kết quả nghiên cứu, độ dày NMTC có giá trị tiên lượng khá tốt kết quả có thai vì diện tích dưới đường cong ROC: 0,718. $-p < 0,0001$. Điểm cắt độ dày NMTC có giá trị trong chẩn đoán là 8.05mm, có độ nhạy là 77.9%, độ đặc hiệu 65,2% [Biểu đồ 3.1]. Tại điểm cắt = 14.15mm, độ đặc hiệu là 100%. Nghĩa là không có ai có thai mà độ dày NMTC > 14mm [Bảng 3.21]. Kết quả tương tự Junwei Yang (2018), Zhang T (2018), Bu-Z (2016) thấy tỷ lệ có thai giảm khi NMTC <8mm hoặc > 14mm.

Khi đánh giá tỷ suất chênh về kết quả có thai giữa các nhóm độ dày NMTC nhận thấy: Nếu NMTC ở khoảng >8- 14mm, sẽ làm tăng khả năng có thai lên 1,161 lần và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Nếu NMTC ≤ 8 mm hoặc >14mm, sẽ làm giảm khả năng có thai xuống còn 36,3% và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). [Bảng 3.21].

4.3.2. *Bàn luận về một số yếu tố liên quan đến kết quả có thai của 2 phương pháp trữ lạnh.*

4.3.2.1. *Mối liên quan giữa số lượng phôi chuyển và kết quả có thai.*

Trong hỗ trợ sinh sản, câu hỏi luôn được đặt ra là: với các phôi sống, thì 1 lần chuyển bao nhiêu phôi sẽ cho kết quả có thai, mà lại giảm tối đa nguy cơ đa thai và tiết kiệm phôi? Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy số phôi chuyển có giá trị tiên lượng khá tốt kết quả có thai, ($p < 0,0001$. diện tích dưới đường cong ROC= 0,688). Điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là 3 có độ nhạy là 73,3%, độ đặc hiệu 51,3%, giá trị chẩn đoán dương tính 26,6%. Như vậy, chưa xét đến chất lượng, số lượng phôi khuyến cáo nên chọn để chuyển là 3, bởi điểm cắt 3 có giá trị nhất

trong tiên lượng kết quả có thai. Hơn nữa, khả năng da thai cao nhất có thể gặp khi chuyển 3 phôi là tam thai vẫn chấp nhận được.

4.3.2.3. Mối liên quan giữa điểm chuyển phôi và kết quả có thai.

Theo kết quả của biểu đồ 3.3: điểm chuyển phôi có giá trị tiên lượng tốt kết quả có thai (diện tích dưới đường cong 0,741. $P < 0,0001$). Điểm chuyển phôi càng cao thì giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng cao (bảng 3.32).

Điểm cắt 4 có giá trị trong chẩn đoán (độ nhạy 86,1%, độ đặc hiệu 56,9%). Nếu lấy điểm chuyển phôi bằng 4 để phân tích thì theo kết quả nghiên cứu trên, để có thai cần ít nhất 1 phôi tốt (độ 3) = 1 điểm cho chất lượng phôi, đồng thời niêm mạc tử cung $> 8\text{mm}$ = 2 điểm cho niêm mạc. Vậy kỹ thuật chuyển phôi cần ít nhất 1 điểm, tức là để có thai Catheter sau chuyển phôi không được có máu, không được sót phôi và không ngưng cổ tử cung khi chuyển phôi. Kết quả của chúng tôi đồng thuận với tác giả Nguyễn Xuân Huy, Hán Mạnh Cường (2010), Candido Tomas (2002), Hassan N Sallam (2004), *Wenhao Shi (2013*.

4.3.2.4. Bàn về giá trị của số lượng phôi tốt (độ 3) ở từng giai đoạn kỹ thuật trong tiên lượng kết quả có thai.

4.3.2.4.1. Bàn về giá trị của số lượng phôi tốt (độ 3) trước đông trong tiên lượng kết quả có thai.

* Cùng phương pháp thủy tinh hóa, so sánh nhóm phôi ngày 2 và ngày 3 nhận thấy: Đề tiên lượng có thai: số lượng phôi tốt trước đông của nhóm phôi ngày 3 cần (≥ 2 phôi), nhiều hơn nhóm phôi ngày 2 cần (≥ 1 phôi). Đề tiên đoán khả năng có thai cộng dồn 100%: số lượng phôi tốt trước đông của nhóm phôi ngày 3 cần (≥ 11 phôi), ít hơn nhóm phôi ngày 2 cần (≥ 17 phôi).

* Kết luận chung về giá trị của số lượng phôi tốt trước đông trong tiên lượng kết quả có thai ở cả 2 phương pháp là: Số lượng phôi tốt trước đông càng nhiều thì khả năng có thai càng cao. Đề tiên lượng có thai: số lượng phôi tốt ngày 2 trước đông của phương pháp đông chậm cần (≥ 2 phôi), nhiều hơn phương pháp thủy tinh hóa cần (≥ 1 phôi). Đề tiên đoán khả năng có thai cộng dồn 100%: số lượng phôi tốt trước đông của phương pháp đông chậm cần (≥ 15 phôi), ít hơn phương pháp thủy tinh hóa cần (≥ 17 phôi).

4.3.2.4.2. Bàn về giá trị của số lượng phôi tốt (độ 3) sau rã trong tiên lượng kết quả có thai.

* Cùng phương pháp thủy tinh hóa, sau rã, so sánh nhóm phôi ngày 2 và ngày 3 nhận thấy: Đề tiên lượng có thai: nhóm phôi ngày 3 cần (≥ 2 phôi), nhiều hơn nhóm phôi ngày 2 cần (≥ 1 phôi). Nếu sau rã cùng có 3 phôi tốt, thì giá trị chẩn đoán dương tính của phôi ngày 3 (70%) cao hơn phôi ngày 2 (66,7%).

* Kết luận chung về giá trị số lượng phôi tốt sau rã trong tiên lượng kết quả có thai của 2 phương pháp: Số lượng phôi tốt sau rã càng nhiều thì khả năng có thai càng cao. Đề tiên lượng có thai: số lượng phôi tốt sau rã của 2 phương pháp là như nhau, đều cần 1 phôi tốt.

4.3.2.4.3. Bàn về giá trị của số lượng phôi tốt (độ 3) trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai.

* Như vậy, cùng phương pháp thủy tinh hóa, trước chuyển, so sánh nhóm phôi ngày 2 và ngày 3 nhận thấy: Đề tiên lượng có thai: nhóm phôi ngày 3 cần ≥ 2 phôi tốt, nhiều hơn nhóm phôi ngày 2 cần ≥ 1 phôi tốt).

* Kết luận chung về giá trị của số lượng phôi tốt trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai của 2 phương pháp: Số lượng phôi tốt trước chuyển càng nhiều thì khả năng có thai càng cao. Đề tiên lượng có thai, số lượng phôi tốt trước chuyển của 2 phương pháp là như nhau, đều cần ≥ 1 phôi tốt.

4.3.3. Bàn luận về kết quả và tiên lượng của 2 phương pháp trữ lạnh.

4.3.3.1. Kết quả có thai và diễn tiến thai kỳ sau chuyển phôi.

- So sánh giữa 2 nhóm phôi ngày 2 và ngày 3, ở cả hai phương pháp đông, thấy tỷ lệ có thai và tỷ lệ đẻ con sống, không có sự khác biệt (bảng 3.43, bảng 3.44), khi trung bình số phôi tốt (độ 3) trước đông/ chu kỳ FET của hai nhóm là như nhau (bảng 3.8).

- Đánh giá tỷ lệ có thai, tỷ lệ đẻ non và tỷ lệ thai ngừng tiến triển thấy phương pháp thủy tinh hóa có xu hướng cao hơn phương pháp đông chậm. Tuy nhiên, chung cuộc tỷ lệ đẻ con sống của phương pháp thủy tinh hóa vẫn có xu hướng cao hơn phương pháp đông chậm. Nhiều tác giả khác cũng đưa ra kết quả tương tự: như Debrock S – 2015, Rienzi L- 2017, khác với nghiên cứu hồi cứu của Zhu HY – 2015

4.3.3.2. Phát triển thể chất và tâm vận động ở trẻ sinh ra từ 2 phương pháp trữ lạnh.

Trong nghiên cứu này, theo dõi sự phát triển thể chất và tâm vận động

của trẻ chuyển phôi trữ lạnh từ sau khi sinh đến khi 4 tuổi, thông qua các dữ liệu về tăng trưởng, cân nặng, chiều cao, thời điểm phát triển tâm vận động và so sánh với biểu đồ của tổ chức y tế thế giới thấy không có sự khác biệt giữa 2 phương pháp trữ lạnh và không có sự khác biệt với trẻ sinh ra từ thụ thai tự nhiên (bảng 3.45, bảng 3.46). Theo dõi từ lúc trẻ sinh ra đến lúc 4 tuổi: Ở nhóm đông chậm không ghi nhận trường hợp dị tật bẩm sinh nào. Ở nhóm thụ tinh hóa, ghi nhận 3 trẻ có dị tật bẩm sinh, 1 trường hợp tử vong, chiếm tỷ lệ 3/52 (5,8%). Trường hợp tử chứng Fallot, có phôi được xin từ một phụ nữ 36 tuổi, do đó khó có thể xác định bất thường này tạo ra từ trứng bất thường ở phụ nữ lớn tuổi hay đột biến xuất hiện trong quá trình tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI), hay quá trình đông phôi. Trường hợp trẻ suy giảm thị lực bẩm sinh có bố cũng mắc tật khúc xạ mắt. Do vậy, tìm hiểu cơ chế bệnh sinh chính xác của 3 trường hợp dị tật bẩm sinh này cần rất thận trọng và nghiên cứu trên số lượng mẫu lớn. Hơn nữa, nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu mô tả theo dõi dọc, với đặc trưng chỉ có thể hình thành giả thuyết thông qua các kết quả quan sát, hoàn toàn không thể kiểm định giả thuyết. Do đó, để kết luận các dị tật này có liên quan tới phương pháp đông hay không cần đánh giá sâu hơn ở một nghiên cứu khác với cỡ mẫu đủ lớn. Ngoài ra, 3 trường hợp này, chất lượng phôi trước chuyển đều có từ 2 đến 4 phôi tốt. Do vậy, nghiên cứu chỉ đánh giá chất lượng phôi trước chuyển thông qua hình thái, mà chưa có sinh thiết phôi để đánh giá di truyền về gen, nhiễm sắc thể, nên có thể đã không loại trừ được hết nguy cơ có thể có dị tật, bệnh lý bẩm sinh liên quan.

Kết quả nghiên cứu này, cùng với nhiều kết quả nghiên cứu khác cho thấy ưu việt của phương pháp trữ lạnh thụ tinh hóa so với phương pháp đông chậm ở tỷ lệ phôi sống, tỷ lệ có thai và tỷ lệ đẻ con sống là rất rõ ràng. Tuy nhiên, cần phải nghiên cứu sâu hơn về tính an toàn cho những trẻ sinh ra từ thụ tinh hóa, cũng như tìm kiếm thêm những phương pháp trữ lạnh hiệu quả hơn nữa.

KẾT LUẬN

1. Đặc điểm phôi sau rã đông của 2 phương pháp đông chậm và thụ tinh hóa.

*** Với phương pháp đông chậm.**

- Tỷ lệ phôi sống, tỷ lệ phôi sống nguyên vẹn sau rã và tỷ lệ phôi phân chia tiếp ở nhóm ngày 2 lần lượt là: (62,5%, 39,3% và 39,6%) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm ngày 3 (56,5%, 33,2% và 37,1%).

- Tỷ lệ phôi thoái hoá hoàn toàn ở nhóm ngày 2 (35,7%) thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm ngày 3 (41,9%) và số chu kỳ không có phôi chuyển do toàn bộ số phôi trữ bị thoái hoá là: 13,2% .

*** Với phương pháp thủy tinh hóa.**

- Tỷ lệ phôi sống, tỷ lệ phôi sống nguyên vẹn sau rã và tỷ lệ phôi phân chia tiếp sau thủy tinh hoá nhóm ngày 2 lần lượt là: (78,9%, 67,3% và 56,7%) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm ngày 3 (70,3%, 68,9% và 51,9%).

- Tỷ lệ phôi thoái hoá hoàn toàn ở nhóm ngày 2 là 25,6% thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm ngày 3(31,1%) và số chu kỳ không có phôi chuyển do toàn bộ số phôi trữ bị thoái hoá là: 8,3% .

* Tỷ lệ phôi sống của phương pháp thủy tinh hóa có xu hướng cao hơn phương pháp đông chậm có ý nghĩa thống kê.

* Hình thái phôi tốt có khả năng sống, phân chia tiếp tốt nhất và có tương quan về số lượng qua các giai đoạn nuôi cấy. Phôi trung bình và phôi xấu không có tương quan sau mỗi bước kỹ thuật.

2. Một số yếu tố liên quan và tiên lượng của 2 phương pháp đông chậm và phôi thủy tinh hóa.

2.1. Một số yếu tố liên quan đến kết quả có thai và giá trị tiên lượng sau chuyển phôi đông chậm và phôi thủy tinh hóa.

*Hình thái phôi tốt được quan sát ở bất kỳ giai đoạn nuôi cấy nào đều làm tăng khả năng có thai, có ý nghĩa thống kê. Trừ nhóm phôi ngày 3, ở phương pháp đông chậm, tăng không có ý nghĩa thống kê. Phôi trung bình và phôi xấu không làm tăng khả năng có thai.

* Tỷ lệ có thai tương quan chặt với số phôi chuyển, độ dày niêm mạc tử cung và điểm chuyển phôi.

- Giá trị tiên lượng có thai của:

+ Số phôi chuyển trong 1 chu kỳ là ≥ 3 phôi

+ Độ dày niêm mạc tử cung là $>8,05\text{mm}$ và $<14,15\text{mm}$.

+ Điểm chuyển phôi là ≥ 4 điểm.

+ Phôi tốt ngày 2, đông chậm: trước đông là ≥ 2 phôi, sau rã là ≥ 1 phôi, trước chuyển là ≥ 1 phôi.

+ Phôi tốt ngày 2, thủy tinh hóa: trước đông là ≥ 1 phôi, sau rã là ≥ 1 phôi, trước chuyển là ≥ 1 phôi.

+ Phôi tốt ngày 3, thủy tinh hóa: trước đông là ≥ 2 phôi, sau rã là ≥ 2 phôi, trước chuyển là ≥ 2 phôi.

- Giá trị tiền lượng có thai cộng dồn 100% của:

+ Phôi tốt ngày 2, đông chậm: trước đông là ≥ 15 phôi, sau rã là ≥ 9 phôi, trước chuyển là ≥ 5 phôi.

+ Phôi tốt ngày 2, thủy tinh hóa: trước đông là ≥ 17 phôi.

+ Phôi tốt ngày 3, thủy tinh hóa: trước đông là ≥ 11 phôi, trước chuyển là ≥ 5 phôi.

2.2. Kết quả thai nghén và tiền lượng về sức khỏe của trẻ sinh ra từ 2 phương pháp đông chậm và thủy tinh hóa.

- Tỷ lệ có thai, tỷ lệ đẻ con sống sau chuyển phôi ngày 2 đông lạnh chậm lần lượt là: (15,4% và 13%) không khác biệt so với nhóm ngày 3: (12,1% và 7%).

- Tỷ lệ có thai, tỷ lệ đẻ con sống sau chuyển phôi ngày 2 thủy tinh hoá lần lượt là: (22,2% và 17,3%) không khác biệt so với nhóm ngày 3: (22,8% và 13%).

- Diễn tiến thai kỳ: tỷ lệ có thai, tỷ lệ thai ngừng tiến triển, tỷ lệ đẻ con sống của nhóm thủy tinh hóa lần lượt là: (22,5%; 17,4% và 15,1%) có xu hướng cao hơn so với nhóm đông chậm: (14,5%; 3,2% và 11,4%).

- Cân nặng, chiều cao của trẻ sinh ra sau chuyển phôi trữ lạnh có xu hướng không khác biệt giữa 2 phương pháp đông lạnh chậm và thủy tinh hóa, không có sự khác biệt với trẻ sinh ra từ thụ thai tự nhiên.

- Đến 4 tuổi, tỷ lệ trẻ không có bệnh lý di truyền, dị tật bẩm sinh ở nhóm đông chậm là 100%, ở nhóm thủy tinh hóa là 94,2%. 5,8% trẻ ở nhóm thủy tinh hóa có bệnh lý di truyền, dị tật bẩm sinh. Cần phải

nghiên cứu sâu hơn với cỡ mẫu lớn để có thể kết luận chính xác liệu có sự liên quan của phương pháp trữ lạnh với hiện tượng dị tật ở trẻ hay không? cũng như tiên lượng lâu dài sự phát triển thể chất, tâm vận động và bệnh tật của trẻ sinh ra sau chuyển phôi đông chậm và thủy tinh hóa.

KHUYẾN NGHỊ

- Khuyến nghị chỉ nên trữ phôi chất lượng tốt, sẽ tiết kiệm chi phí, thời gian và tăng khả năng có thai, có ý nghĩa thống kê.
- Khuyến nghị nên rã phôi cho tới khi có ít nhất 1 phôi tốt.
- Số phôi khuyến nghị nên chuyển là 3 phôi.
- Với phôi ngày 2, nếu chỉ còn dư 1 phôi tốt, thì nên chọn trữ theo phương pháp thủy tinh hóa sẽ tăng khả năng bảo toàn phôi và tăng khả năng có thai.
- Với phôi ngày 3, chỉ nên trữ theo phương pháp thủy tinh hóa.
- Khuyến nghị nghiên cứu sâu hơn, với cỡ mẫu lớn và theo dõi lâu dài sự phát triển thể chất và tâm vận động của trẻ sinh ra sau chuyển phôi đông lạnh chậm và thủy tinh hóa.

**CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ LIÊN
QUAN ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN**

3. Phan Thị Thanh Lan (2015), “Đánh giá chất lượng phôi sau rã đông và tỷ lệ có thai sau chuyển phôi ngày 2 - ngày 3 đông lạnh theo phương pháp thụ tinh hóa”, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, Số 95 (3), tr. 15-23.
4. Phan Thị Thanh Lan (2015), “Đánh giá chất lượng phôi sau rã đông và tỷ lệ có thai sau chuyển phôi ngày 2 - ngày 3 đông lạnh theo phương pháp đông lạnh chậm”, *Tạp chí Y học thực hành*, Số 979 (10), tr. 2-6.

**MINISTRY OF EDUCATION – MINISTRY OF HEALTH
HA NOI MEDICAL UNIVERSITY**



PHAN THI THANH LAN

**EFFECTIVELY STUDY TWO METHODS
OF SLOW EMBRYO FROZEN AND
VITRIFICATION**

MEDICAL DOCTOR THESIS

HA NOI - 2020

**This research is effectuated in
HA NOI MEDICAL UNIVERSITY**

Supervisors: Professor Doctorate Nguyen Viet Tien

Reviewer 1:

Reviewer 2:

Reviewer 3:

The thesis will be defended from the university level council marking
doctoral thesis at Hanoi Medical University

At (h) / /

Research can be approached in:

- The national library
- The library of Ha noi medical university
- The library of national hospital of gynecology and obstetrics.

BACKGROUND

Cold storage is an indispensable technique in assisted reproduction. There have been 2 cold storage methods applied: slow frozen and vitrification. The main difference of these two methods is the cooling rate and cryoprotective agents (CPA). For quite a long time, despite effective limitations, slow frozen has been considered a standard method of refrigeration in the livestock industry as well as in IVF on humans. Long time after being introduced, vitrification is still considered an experimental technique for many reasons. In particular, concerns about possible toxicity of using high concentration preservatives on the workpiece and the difficulty of establishing a high-speed cooling system are the main obstacles. Therefore, evaluate the effectiveness of cold storage processes through the following criteria: rate of live embryos, pregnancy rate, rate of live birth, as well as related factors, prognosis of pregnancy results, follow-up the development of height, weight, physical, intellectual, mental movement, illness from birth until 4 years of age to give a prognosis for the next development for babies born from 2 this method is necessary. Therefore, we carried out the thesis: "**Effectively studying two methods of slow embryo frozen and vitrification**" with 2 objectives:

- 1. Evaluation of post-defrosting embryo characteristics of two methods of slow embryo frozen and vitrification.**
- 2. Evaluation of a number of related factors and prognosis of two methods of slow embryo frozen and vitrification.**

NEW CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

- 1 - Affirm good morphological morphology is closely correlated in quantity after each technical step and increases the probability of pregnancy, statistically significant.
- 2- Find out the specific value to predict the pregnancy results of the quantity and quality of embryos before freezing, after thawing, before transfer.
- 3- Long-term monitoring after the child is born for 2 methods of cold storage: slow freezing and vitrification.

THESIS OUTLINE

Thesis consists of 148 pages, 4 chapters, 55 tables, 16 charts, 13 forms, 145 references (12 in Vietnamese and 133 in foreign language).

Situation : 02 pages; chapter 1- Introduction: 41 pages; chapter 2- Design of study: 13 pages; chapter 3- Results: 49 pages; chapter 4-

Discussion: 39 pages. Conclusion: 3 page; Proposal 01 page; List of relevant publics; List of references; Appendix.

CHAPTER I: ACKNOWLEDGEMENT

1.1. Changes inside cells during cold storage.

From 15°C to -5°C: lipid particles, lipid-rich membranes and microtubules within the cell may be damaged. Enzymes reduce the speed of operation. Air bubbles in the culture medium are forced to damage the structure in the cell. The formation of rock crystals from water molecules in the extracellular environment and the intracellular environment causes mechanical damage to the cell membrane and the inside organelles. This is the biggest and most important stage of damage. The lower the temperature: the more water molecules turn into stone crystals, the more liquid the water decreases. Consequences: The concentration of solute in the extracellular environment increases, causing an imbalance in the osmotic pressure between the cells and the environment. Water from the inside of the cytoplasm is withdrawn and the cell size becomes smaller. . If the cell is too small, the cell membrane's lipoprotein damage occurs irreversibly. Increasing latent temperature is also a consequence of the formation of stone crystals. This sudden temperature change can affect the structure and function of the cell after thawing or even death of the cell during the cooling process.

From -50°C to -150°C, the transparent membrane may break.

At sample storage temperature -196°C, cells are least affected in the whole cold storage process.

1.2. Measures to limit cell damage in cold storage.

1.2.1. Use of cryoprotective agents (CPA).

CPA dehydrates inside cells, helping to limit the formation of intracellular stone crystals. CPA limits the concentration of soluble substances. CPA attaches to the cytoplasm to protect cells when extracellular water molecules begin to migrate to crystal form. Two types of CPAs commonly used in cryogenic are CPA permeability and CPA that are unable to penetrate cell membranes. Most CPAs are capable of causing toxicity. The toxicity of CPA is directly proportional to the concentration and duration of exposure, especially at physiological temperatures.

1.2.2. Control cooling and defrosting speeds.

1.2.3. Equipment and tools

1.3. Cold storage methods.

1.3.1. Slow -freezing

- Advantages: High safety is established based on the balance of cooling rate and CPA concentration. The CPA concentration is used low (1-1.5mol / l) and only combines a substance that is capable and a substance that is not permeable to the cell membrane, so the toxicity to the cell is low.

- Disadvantages: Since the concentration of CPA used is not high, intracellular stone crystals can still be created during the temperature reduction process. This is the main reason for the low survival rate of gametes and embryos. Costs to equip a high-temperature cooling system. Implementation time for an ovule and embryo freeze is actually quite long. (average 1.5 -2 hours)

1.3.2. Vitrification

- Advantages: Not forming internal and extracellular stone crystals. Shorten the time for a frozen - defrost cycle. Save the initial investment cost.

- Disadvantages: Concerns about possible toxicity of using high concentration CPA on embryos. The difficulty in establishing a high-speed cooling system is the main obstacle. Cross-contamination between samples during storage has also been documented.

1.4. Factors affecting cold storage transfer results.

1.4.1. *The factors affecting the efficiency of cold storage process*

1.4.2 *The wife's age.*

1.4.3. *Causes of infertility*

1.4.4. *Technical support.*

1.4.5. *Time to preserve the workpiece.*

1.4.6. *Old embryonic age.*

1.4.7. *The number of embryos is transferred into the uterus.*

1.4.8. *The quality of the embryo is transferred to the uterus.*

1.4.9. *Effect of embryo transfer technique.*

1.4.10. *Effect of endometrium on frozen embryo transfer results*

1.4.11. *Influence of assistance hatching technique.*

CHAPTER 2: MATERIALS AND METHODS

2.1. Subjects:

- Object 1: patients thawed embryos on day 2, day 3 stored by slow freezing method

- Object 2: patients thawed embryos on day 2, day 3 stored by vitrification method

2.1.1. Selection criteria:

- Object 1: Patients still have embryo surplus in slow freezing method (including asking for embryos, eggs), thawed and transferred embryos.

- Object 2: Patients store embryos by vitrification method (including embryos, eggs), then thawed and transferred embryos.

2.1.2. Exclusion criteria: Mother has a whole body disease.

2.2. Place of study: National Center for Reproductive Assistance, Central Obstetrics Hospital

2.3. Research period: from January 2013 to April 2019.

2.4. Method: descriptive study, follow up,

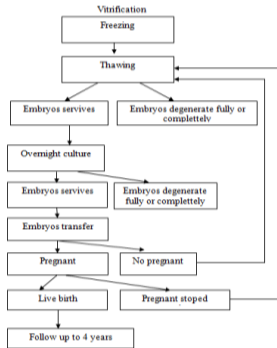
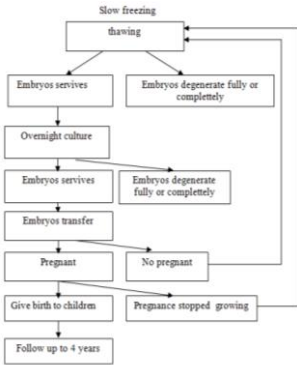
2.5. Sample size:

$$n = \frac{[Z_{(1-\alpha/2)}]^2 p \times (1-p)}{(d)^2}$$

Field Code Changed

According to: El-Toukhy's study (2004), the clinical pregnancy rate in the slow embryo frozen was 11,3%; Han Manh Cuong's study (2010), the clinical pregnancy rate in vitrification was 30,1%; We calculated the sample size was 48 for slow freezing, 99 for vitrification. In fact, the study included: 220 cases slow freezing (58 cases have 2nd frozen embryos, 162 cases have 3rd frozen embryos); 344 cases vitrification (162 cases have 2nd frozen embryos, 162 cases have 3rd frozen embryos).

2.4.3. Study diagram



2.8. Main variables

2.8.1. Embryos: The number of embryos before freezing, after thawing, before transfer of 3 types of good, medium, and bad. The rate of embryo live after thawing. The rate of fully degenerated embryos. The

rate of embryos survived 100% intact. Proportion of further divided embryos.

2.8.2. Several factors related to pregnancy rates: Maternal age, number of embryos transfer, embryo quality, uterine mucosal thickness, embryo transfer point

2.8.3. Pregnancy: pregnancy rate, survival rate, pregnancy rate stop progressing.

2.8.4. Evolution of pregnancy: Biochemical pregnancy, clinical pregnancy, fetal loss, stillbirth, premature birth.

2.8.5. Wisdom and mind move from birth to 4 years old

- Weight, height, intellectual development, mental movement at 3 months, 6 months, 9 months, 12 months, 2 years, 3 years, 4 years.

2.9. data analysis: statistical analyses were performed by SPSS software version 17.0. charts were created by Excel version 2010.

2.10. Errors and noise factors control

2.11. Ethics of research

- The study outline has been adopted and approved by the scientific council
- The patient information is kept confidential

Chapter 3: RESULTS

3.1. Pre-and post-thawing characteristics of the two methods.

3.1.3. Quality of embryos before and after thawing.

Table 3.14. The quality of embryo after thawing and before transfer is prorated.

Ratio	Slow freezing			Vitrification		
	2 days (Ia)	3 days (Ib)	p	2 days (IIa)	3 days (IIb)	p
Survival rate after thawing	460/736 62,5 %	143/253 56,5 %	p<0.05	552/700 78,9%	391/556 70,3%	p<0.05
Intact survival rate after thawing	289/736 39,3 %	84/253 33,2 %	p<0.05	471/700 67,3%	383/556 68,9%	p<0.05
The rate of embryo completely degenerated	263/736 35,7 %	106/253 41,9 %	p<0.05	172/700 25,6%	173/556 31,1%	p<0.05

Proportion of split embryo	182/460 39,6%	53/143 37,1 %	p<0.05	313/552 56,7%	203/391 51,9%	p<0.05
----------------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------

3.2 Some related factors and prognosis of 2 methods.

3.2.2. Several factors related to the pregnancy outcome of the two methods.

3.2.2.1. Relationship between wife age and pregnancy outcome.

Table 3.19. Relationship between wife age and pregnancy outcome.

Wife age		Result		Sum
		pregnant	No pregnant	
Age group	≤ 35	N 69	302	371
		% 18,6%	81,4%	100,0%
	> 35	N 36	137	173
		% 20,8%	79,2%	100,0%
Sum		N 105	439	544
		% 19,3%	80,7%	100,0%

3.2.2.2. Relationship between uterine lining thickness and pregnancy outcome.

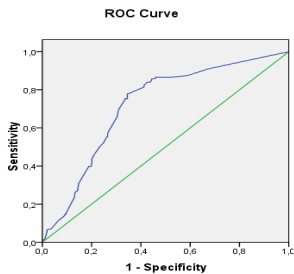


Figure 3.1. Relationship between uterine lining thickness and outcome pregnant.

Comments: The thickness of the uterine mucosa has a good prognosis value because of pregnancy because the area under the curve: 0.718. - P <0.0001. The cut-off value for diagnosis is 8.05 with sensitivity of

77.9%, specificity of 65.2%. At the cutting point = 14.15mm, the specificity is 100%.

Table 3.21. The odds of pregnancy outcome among groups of uterine mucosal thickness.

Uterine mucosal thickness	OR	95%CI	P
>8- 14mm	1,161	1,096-1.23	0,023
≤8mm hoặc >14mm	0,363	0,187-0,704	0,002

3.2.2.3. *Relationship between number of transferred embryos and pregnancy outcome.*

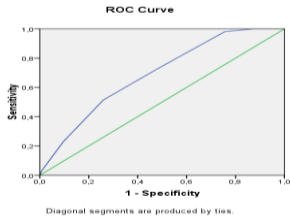


Figure 3.2. Relationship between number of transferred embryos and pregnancy outcome.

Comments: Number of transferred embryos with good prognosis results in pregnancy because: area under the curve: 0.688. - $P < 0.0001$. The cutoff point for diagnosis is 3 with sensitivity of 73.3%, specificity 51.3%. Highest J-index = 24.6%

3.2.4.5. *Relationship between embryo transfer point and pregnancy outcome.*

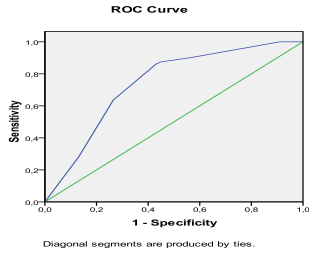


Figure 3.3. Relationship between embryo transfer point and pregnancy outcome.

Comments: The point of transfer of the embryo has a good prognosis value because of pregnancy because the area under the curve: 0.741. - $P < 0.0001$. The cut-off point for diagnostic value is 4 with 86.1% sensitivity and 56.9% specificity. Highest J index = 43%.

3.2.4.6. Value of good number of embryos at each technical step in prognosis of pregnancy outcome.

3.2.4.6.1. Value of good number of embryos (grade 3) before freezing in prognosis of pregnancy outcome.

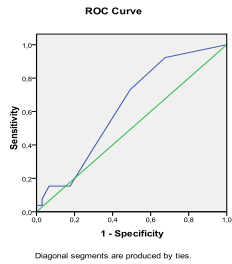


Figure 3.4. The line shows the sensitivity, specificity (ROC) of the number of good embryos 2 days before freezing slowly in prognosis of pregnancy outcome.

Formatted: Font: Times New Roman, 11 pt, Bold, Font color: Black

Comments: The number of good embryos on day 2 before freezing was valuable in the prognosis of pregnancy outcome, although the prognosis value is not high because the area under the curve: 0.626. - $P = 0.043$. The cutoff point for diagnosis is 2 with sensitivity of 73.1%, specificity of 50.7%, index (J) 23.8. At the cut-off point = 15, the specificity is 100%, the positive diagnostic value is 100%.

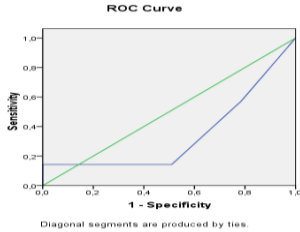


Figure 3.5. The line shows the sensitivity, specificity (ROC) of the number of good embryos 3 days before freezing slowly in prognosis of pregnancy outcome.

Comments: The number of good embryos on day 3 before slow freezing is not valuable in the prognosis of pregnancy results because the area under the curve: 0.34. - $P = 0.174$.

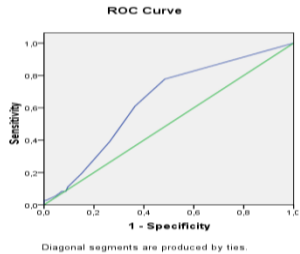


Figure 3.6. The line showing the sensitivity, specificity (ROC) of the number of good embryos 2 days before vitrification in prognosis of pregnancy outcome.

Comments: The number of good embryos on day 2 before vitrification is valuable in the prognosis of pregnancy results, although the prognosis value is not high because the area under the curve: 0.639. - $P = 0.011$. The cutoff point for diagnosis is 1 with sensitivity of 77.8%, specificity 51.6%, index (J) 29.4. At the cut-off point = 17, the specificity is 100%, the diagnostic value is 100% positive.

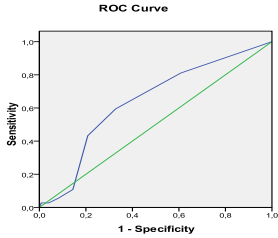


Figure 3.7. The line showing the sensitivity, specificity (ROC) of the number of good embryos 3 days before vitrification in prognosis of pregnancy outcome.

Comments: The number of good embryos on day 3 before vitrification is valuable in the prognosis of pregnancy outcome, although the prognosis value is not high because the area under the curve: 0.638. - $P = 0.011$. The cutoff point for diagnosis is 2 with sensitivity of 59.5%, specificity 67.2%, index (J) 26.7. At the cutoff point = 11, the positive diagnostic value is 100%.

3.2.4.6.2 Value of good number of embryos (grade 3) after thawing in prognosis of pregnancy outcome.

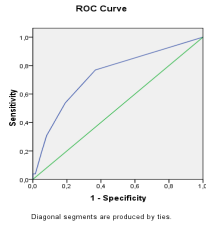


Figure 3.8. The line shows the sensitivity, specificity (ROC) of the number of good embryos day 2 after slow defrosting in prognosis of pregnancy outcome.

Comments: The number of good embryos on day 2 after slow defrosting has good value in prognosis of pregnancy results because the area under the curve: 0.734. - $P < 0.0001$. The cut-off value for diagnosis is 1 with sensitivity of 76.9%, specificity 63.2%, highest index (J) 40.1. At the cut-point = 9, specificity is 100%.

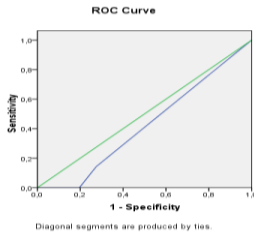


Figure 3.9. The line shows the sensitivity, specificity (ROC) of the number of good embryos 3 days after slow thawing in prognosis of pregnancy outcome.

Comments: The number of good embryos on day 3 after slow thawing is not valuable in the prognosis of pregnancy results because the area under the curve: 0.42. - $P < 0.492$.

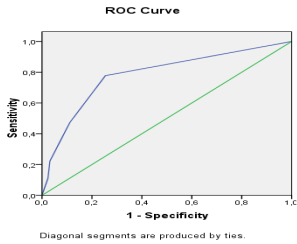


Figure 3.10. The line showing the sensitivity, specificity (ROC) of the number of good embryos day 2 after vitrification in prognosis of pregnancy outcome.

Comments: The number of good embryos on day 2 after vitrification has a good prognosis value because of pregnancy because the area under the curve: 0.783. - $P < 0.0001$. The cutoff point for diagnosis is 1 with sensitivity of 77.8%, specificity of 74.6%, highest index (J) of 52.4.

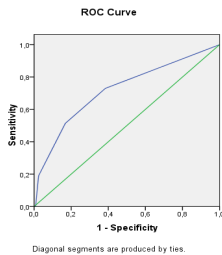


Chart 3.11. The line showing the sensitivity, specificity (ROC) of the number of good embryos on day 3 after vitrification in prognosis of pregnancy outcome.

Comments: The number of good embryos after disintegration has a pretty good prognosis outcome because of pregnancy under the curve: 0.719. - $P < 0.0001$. The cutoff point for diagnosis is 2 with sensitivity of 51.4%, specificity of 83.2%, index (J) 34.6.

3.2.4.6.3. Value of good embryo number (grade 3) prior to transfer in prognosis of pregnancy outcome.

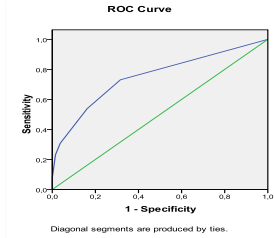


Figure 3.12. The line showing the sensitivity, specificity (ROC) of the number of good embryos on day 2 - freezing slowly before transferring in prognosis of pregnancy outcome.

Comments: The number of good embryos on day 2 - late freezing before transfer has a good value in the prognosis of pregnancy results because the area under the curve: 0.775. - $P < 0.0001$. The cut-off value for diagnosis is 1 with sensitivity of 73.1%, specificity of 68.4%, highest index (J) of 41.5. At cutpoint 5, specificity = 100%, positive predictive value = 100%

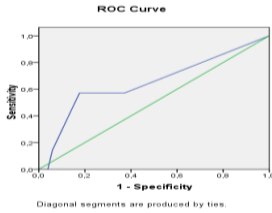


Figure 3.13. The line shows the sensitivity, specificity (ROC) of the number of good embryos 3-day, slow freezing, before transfer in prognosis of pregnancy outcome.

Comments: The number of good embryos before transfer has little prognostic value of pregnancy outcome and is not statistically significant because the area under the curve: 0.648. - $P = 0.206$.

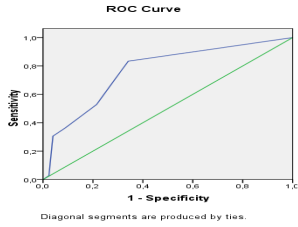


Figure 3.14. The line shows the sensitivity, specificity (ROC) of the number of good embryos on 2-day, vitrification, before transfer in prognosis of pregnancy outcome.

Remarks: The number of good embryos on 2-day, vitrification, before transfer has a good prognosis value because of pregnancy due to the area under the curve: 0.766. - $P < 0.0001$. The cut-off value for diagnosis is 1 with sensitivity of 83.3%, specificity of 65.9%, highest index (J) of 49.2.

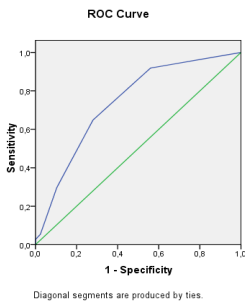


Figure 3.15. The line shows the sensitivity, specificity (ROC) of the number of good embryos on 3-day, vitrification, before transfer in prognosis of pregnancy outcome.

Remarks: The number of good embryos on 3-day, before transfer has a good prognosis value because of pregnancy because the area under the curve: 0.74. - $P < 0.0001$. The cutoff point for diagnosis is 2 with

sensitivity of 64.9%, specificity of 72%, highest index (J) of 36.9. At the cut-off point = 5, the specificity is 100%, the positive diagnostic value is 100%

3.2.3. Results and prognosis of 2 methods.

3.2.3.1. Pregnancy rate and pregnancy progression of the two methods.

Table 3.42. Pregnancy results and pregnancy course after transfer embryo slowly freezing.

Result	2 days		3 days		p
	N	%	N	%	
Pregnant	25	15,4	7	12,1	p>0,05
Biochemical pregnancy	2	1,2	2	3,4	
Clinical pregnancy	23	14,2	5	8,6	p>0,05
Miscarriage	2	1,2	1	1,7	
stillbirth	0	0	0	0	
Live birth	21	13	4	7	p>0,05
No pregnant	137	84,6	51	87,9	
Sum	162	100	58	100	

Table 3.43. Pregnancy outcome and pregnancy happenings after embryo transfer vitrification

Result	2 days		3 days		p
	N	%	N	%	
Pregnant	36	22,2	37	22,8	p>0,05
Biochemical pregnancy	0	0	2	1,2	
Clinical pregnancy	36	22,2	35	21,6	p>0,05
Miscarriage	8	4,9	8	4,9	
stillbirth	0	0	6	3,7	
Live birth	28	17,3	21	13	p>0,05
No pregnant	126	77,8	125	77,2	
Sum	162	100	162	100	

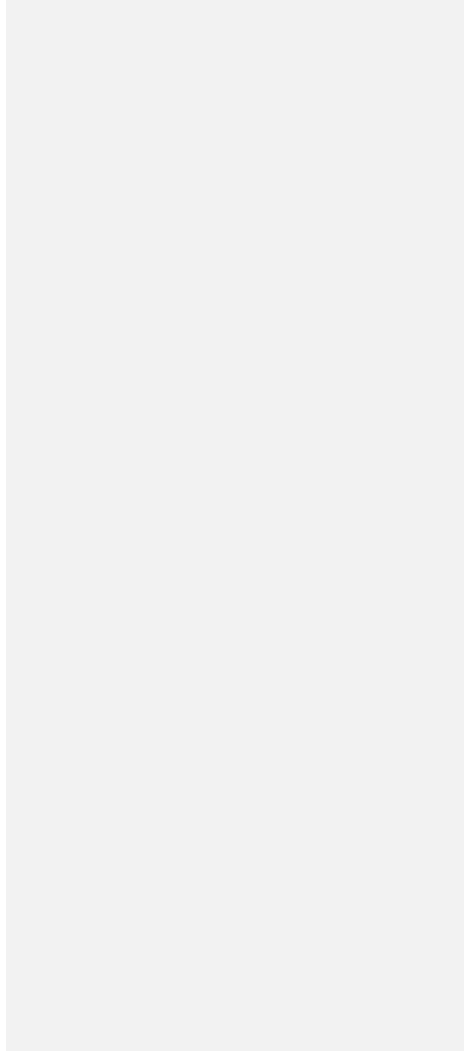


Table 3.44. Pregnancy rate and pregnancy progression of the two methods.

Result	Slow freezing		Vitrification	
	N	%	N	%
Pregnant	32	32/220=14,5	73	73/324=22,5
The pregnancy stopped progressing	7	7/220=3,2	24	24/324=17,4
Live birth	25	25/220=11,4	49	49/324=15,1
Premature birth	2	2/220=0,91	7	7/324=2,2
Multiple pregnancy	3	3/220= 1,4	6	6/324= 1,9
Average weight at birth	2936 ± 603,4		2900 ± 417,3	
Average gestational age at birth	38,7 ± 1		38 ± 1,8	

3.2.3.2. The results of monitoring the child after birth to 4 years of age by 2 methods.

Table 3.45. The average rough weight of newborns for boys and girls corresponds to the gestational age of 28-42 weeks.

Gestational age (week)	Slow freezing (Average weight - grams)		vitrification (Average weight - grams)		Babies born naturally (Average weight - grams)*		p
	Boy (Ia) n=15	Girl (Ib) n=13	Boy (IIa) n=29	Girl (IIb) n=26	Boy (IIIa)	Girl (IIIb)	
32			2200	1717	1699		P _{Ia-IIIa} >0,05 P _{IIa-IIIa} >0,05 P _{Ib-IIIb} >0,05 P _{IIb-IIIb} >0,05
33		1700	2100	1900	1907	1893	
35			2450		2255	2201	
36	2700	2000	2523	2400	2456	2428	
37	3054	2791	2952	2865	2841	2726	
38	3189	3054	3215	3012	3084	3023	
39	3268	3200	3489	3109	3284	3119	
40	3353	3276	3134	3011	3342	3199	

3.2.3.2. The results of monitoring the child after birth to 4 years of age by 2 methods.

Table 3.46. The average weight and average height of boys and girls is between 3 months and 4 years old, respectively.

Age	Slow freezing (Weight - average height)		Vitrification (Weight - average height)		Babies born naturally (Weight - average height)*		P $p_{Ia-IIa}>0,05$ $p_{IIa-IIIa}>0,05$ $p_{Ib-IIIb}>0,05$ $p_{IIb-IIIb}>0,05$
	Son (Ia) n=14	Girl (Ib) n=12	Son (IIa) n=27	Girl (IIb) n=24	Son (IIIa)	Girl (IIIb)	
3 months	6,6kg-62,3cm	6,0kg-60,8cm	6,5kg-60,8cm	6,1kg-60,2cm	6,4kg-61,4cm	5,8kg-59,8cm	
6 months	7,9kg-68,3cm	7,2kg-65,1cm	7,8kg-68,1cm	7,4kg-66,1cm	7,9kg-67,6cm	7,3kg-65,7cm	
9 months	8,8kg-71,5cm	8,3kg-71,3cm	8,7kg-71,1cm	8,0kg-69,6cm	8,9kg-72,0cm	8,2kg-70,1cm	
12 months	9,5kg-74,5cm	9,1kg-75,2cm	9,7kg-76cm	9,0kg-74,8cm	9,6kg-75,7cm	8,9kg-74,0cm	
2 years	12,1kg-86,3cm	11,7kg-87,3cm	12,0kg-86,9cm	11,7kg-86,9cm	12,2kg-87,8cm	11,5kg-86,4cm	
3 years	14,3kg-95,7cm	13,8kg-94,8cm	14,5kg-95,9cm	14,1kg-96,3cm	14,3kg-96,1cm	13,9kg-95,1cm	
4 years	15,9kg-100,2cm	15,4kg-99,7cm	16,0kg-101,1cm	15,6kg-101,8cm	16,3kg-103,3cm	16,1kg-102,7cm	

3.2.3.2.3. Brain development, psychomotor development, and pathology in babies born after cryopreserved embryo transfer (Appendix 6).

Table 3.47. Develop intelligence, mental movement, pathology in babies born after cold embryo transfer.

Amount	Slow freezing (n=28)		Vitrification (n=55)	
	N	Tỷ lệ	N	Tỷ lệ
Lost trace	2	2/28(7,1%)	3	3/55(5,5%)
Normal	26	26/26(100%)	49	49/52(94,2%)
Genetic pathology, birth defects	0	0/26 (0%)	3	3/52 (5,8%)

Chapter 4: DISCUSSION

4.2. Discuss the characteristics of pre and defrost embryos of 2 methods.

4.2.3 Evaluation of embryo quality after decomposition and before transfer of the two cryopreservation methods.

4.2.3.2. *Assessing the quality of embryos after decay and before conversion according to survival rate.*

* Comparison between 2 groups of embryos on day 2 and groups of embryos on day 3:

- Survival rate, intact survival rate, rate of further dividing embryos of day 2 embryos were significantly higher than those of day 3 embryos. At the same time, the rate of fully degenerated embryos of day embryos group 3 was significantly higher than that of Day 2 embryos with $p < 0.05$ (Table 3.14). Our results are consistent with many studies in Vietnam and around the world. These studies have all suggested that the higher the number of embryos, the greater the destruction of cells due to the increase in surface contact area, regardless of the freezing method. The quality of embryos after defrosting was assessed after 1 hour thawing, reflecting the effect of cryopreservation - defrost on embryos. In this study, we have noted that the process of freezing - thawing has changed the structure, morphology and the number of embryos compared to before freezing.

* Comparative evaluation between the two cold storage methods.

- Survival rate, intact survival rate, rate of continuous dividing embryos of vitrification method tends to be higher than slow freezing method. slow. The results of this study coincide with the research results of the author Debrock S- 2015, Zhu HY-2015.

4.3 Discuss some of the factors involved and the prognosis of the two cold storage methods.

4.3.1. Patient characteristics and association with pregnancy outcome

4.3.1.1. *Year old.*

The median age of patients transferred frozen embryos was from 33.1 to 33.9. (Table 3.18). Our results show that most couples are looking for opportunities to have children between the ages of 18 and 35 years of

age. frozen, with egg, results showed no difference in the pregnancy rate between the age groups above 35 and under 35 ($p = 0.068$) [Table 3.19]. This finding supports the argument that the reduction in the success rate in women over 35 is mainly due to a decrease in the quality and number of eggs acquired when stimulating the ovaries. In older women, the development of IUDs suitable for embryogenesis and development can be completely controlled by exogenous hormones. In both slow and vitrified embryo transfer subjects, there was no difference when comparing the average age between 2 groups of embryos transferred on day 2 and day 3.

4.3.1.2. Thickness of the uterine lining (IUDs).

In this study, to determine the cutoff point of thickness value of the IUD during the successful transfer of frozen embryo transfer cycle, all patients who were prepared with IUD by exogenous endocrine were transferred. According to the research results, the thickness of IUD has good prognosis results because of pregnancy because the area under the ROC curve: 0.718. - $p < 0.0001$. The cut-off point for NMTC thickness is 8.05mm, the sensitivity is 77.9%, the specificity is 65.2% [Figure 3.1]. At the cutting point = 14.15mm, the specificity is 100%. This means that no one is pregnant whose thickness is > 14 mm [Table 3.21]. Similar results of Junwei Yang (2018), Zhang T (2018), Bu-Z (2016) showed that the pregnancy rate decreased when IUD was < 8 mm or > 14 mm.

When assessing the difference in pregnancy outcome among groups of thickness of IUD found: If IUD is in the range of $> 8-14$ mm, it will increase the probability of getting pregnant by 1,161 times and statistically significant ($p < 0, 05$). If IUD ≤ 8 mm or > 14 mm, the probability of pregnancy is reduced to 36.3% and statistically significant ($p < 0.05$). [Table 3.21].

4.3.2 Discuss several factors related to the pregnancy outcome of the two cryopreservation methods.

4.3.2.1. Relationship between number of transferred embryos and pregnancy outcome.

In reproductive assistance, the question that always arises is: for live embryos, how many embryos per transfer will result in pregnancy,

while minimizing the risk of multiple pregnancies and saving embryos? Our research results show that the number of transferred embryos has a relatively good prognosis results in pregnancy, ($p < 0.0001$). Area under the ROC curve = 0.688). The cut-off point for diagnosis is 3 with sensitivity of 73.3%, specificity of 51.3%, positive diagnostic value of 26.6%. Thus, not to mention quality, quantity of embryos It is recommended to choose to switch to 3, as the cutoff 3 is most valuable in predicting pregnancy outcome. Moreover, the highest possibility of multiple pregnancies encountered when transferring 3 embryos is still acceptable.

4.3.2.3. Relationship between embryo transfer point and pregnancy outcome.

According to the results of Figure 3.3: the embryo transfer point has a good prognosis for pregnancy outcome (area under curve 0.741.P < 0.0001). The higher the transfer point, the higher the positive predictive value and the more specificity (Table 3.32).

Cutpoint 4 is valid for diagnosis (86.1% sensitivity, 56.9% specificity). If the embryo transfer score is equal to 4 for analysis, according to the above research result, at least 1 good embryo (grade 3) = 1 point for embryo quality, and uterine lining $> 8\text{mm} = 2$ points for pregnancy for mucosa. So the embryo transfer technique requires at least 1 point, that is, to get pregnant the catheter after the transfer of the embryo must not have blood, no embryos can be missed and no cervical dilatation will be performed. Our results agree with authors Nguyen Xuan Huy, Han Manh Cuong (2010), Candido Tomas (2002), Hassan N Sallam (2004), Wenhao Shi (2013).

4.3.2.4. Discuss the value of the number of good embryos (grade 3) at each technical stage in prognosis of pregnancy outcome.

4.3.2.4.1 Table of values for good embryo number (grade 3) before freezing in prognosis of pregnancy outcome.

* By the method of vitrification, comparing groups of embryos on day 2 and day 3 found: For prognosis of pregnancy: the number of good embryos before freezing of day 3 embryos needed (≥ 2 embryos), more than day 2 embryos need (≥ 1 embryo). To predict the 100% cumulative pregnancy rate: the number of good pre-freezing embryos in the 3-day

embryo group needs (≥ 11 embryos), less than the 2-day embryo group needs (≥ 17 embryos).

* The general conclusion about the value of the number of good embryos before freezing in the prognosis of pregnancy results in both methods is: The greater the number of good embryos before freezing, the higher the probability of getting pregnant. good number of embryos on day 2 before freezing of the slow freezing method needed (≥ 2 embryos), more than the required vitrification method (≥ 1 embryo). To predict the 100% cumulative pregnancy rate: the number of good pre-frozen embryos required by the slow freezing method (≥ 15 embryos), less than the required vitrification method (≥ 17 embryos).

4.3.2.4.2. Discuss the value of the number of good embryos (grade 3) after disintegration in the prognosis of pregnancy outcome.

* By the method of vitrification, after disintegration, comparing groups of embryos on day 2 and day 3 found: To predict pregnancy: day 3 embryos need (≥ 2 embryos), more than day 2 embryos need (≥ 1 embryos). If, after all, there were 3 good embryos, then the positive diagnostic value of day 3 embryos (70%) was higher than that of day 2 embryos (66.7%).

* General conclusion about the value of the good number of embryos after disintegration in the prognosis of pregnancy results of 2 methods: The more the number of good embryos after disintegration, the higher the probability of getting pregnant. For prognosis of pregnancy: the number of good embryos after disintegration of the two methods is the same, all need a good embryo.

4.3.2.4.3. Discuss the value of the number of good embryos (grade 3) before transfer in prognosis of pregnancy outcome.

* Thus, the same method of vitrification, before transfer, comparing the embryos on day 2 and day 3 found: To predict pregnancy: day 3 embryos need ≥ 2 good embryos, more than day 2 embryos need ≥ 1 good embryos).

* General conclusions about the value of the number of good embryos before transfer in the prognosis of pregnancy results of two methods: The higher the number of good embryos before transfer, the higher the chance of getting pregnant. To predict pregnancy, the number of good

embryos before the transfer of the two methods are the same, all need ≥ 1 good embryo.

4.3.3. Discuss the results and prognosis of the two cold storage methods.

4.3.3.1. Pregnancy outcome and pregnancy progression after embryo transfer.

- Comparison between 2 groups of embryos on day 2 and day 3, in both freezing methods, the pregnancy rate and birth rate did not differ (Table 3.43, Table 3.44), when the average number of embryos good (grade 3) before freezing / FET cycle of the two groups are the same (Table 3.8).

- Evaluation of pregnancy rate, premature birth rate and rate of discontinued pregnancy showed that the vitrification method tends to be higher than the slow freezing method. However, the final birth rate of vitrification method tends to be higher than the slow freezing method (Table 3.45). Many other authors have provided similar results: Debrock S - 2015, Rienzi L- 2017, different from Zhu HY retrospective research – 2015.

4.3.3.2. Physical development and psychomotor development in babies born from 2 methods of cold storage.

In this study, to monitor the physical and psychomotor development of infants who transfer cryopreserved embryos from birth to age 4, through data on growth, weight, and time of developing psychomotor and compared with the chart of the World Health Organization, there is no difference between the two methods of cold storage and there is no difference with the babies born from natural conception (table 3.45, table 3.46). Monitoring from birth to age 4: In the slow group, no birth defects were recorded. In the vitrification group, 3 children with birth defects were recorded, 1 case died, accounting for the rate of 3/52 (5.8%). In the case of the Fallot quadrilateral, an embryo was donated from a 36-year-old woman, so it is difficult to identify whether this abnormality is caused by an abnormal egg in older women or if a mutation occurred during a sperm injection. oocyte (ICSI), or embryo freezing. Children with congenital visual impairment whose father also has refractive errors. Therefore, understanding the exact pathogenesis of

these three birth defects needs to be very careful and studied on a large number of samples. Moreover, our study is a longitudinal descriptive study, with the feature that can only form hypotheses through observation results, it is completely impossible to test the hypothesis. Therefore, to conclude whether these defects are related to the freezing method or not need to be further evaluated in another study with a sufficiently large sample size. In addition, in these 3 cases, the quality of pre-transferred embryos is from 2 to 4 good embryos. Therefore, the study only assesses the quality of embryos before transfer through morphology, without embryos biopsy to assess genetics and chromosomes, so it may not have completely eliminated the possible risk. malformations, related congenital pathologies.

The results of this study, along with many other research results, showed that the advantages of vitrified cryopreservation compared to slow freezing method in embryo survival rate, pregnancy rate and live birth rate are very high. clearly. However, more research is needed on the safety of babies born from vitrification, as well as finding more effective methods of cold storage.

CONCLUSION

1. Characteristics of embryos after defrosting of 2 methods of slow freezing and vitrification.

* With slow freezing method.

- The percentage of live embryos, the ratio of intact cheese after disintegration and the proportion of embryos dividing in the second day group were: (62.5%, 39.3% and 39.6%), respectively, were significantly higher than with day 3 group (56.5%, 33.2% and 37.1%).

- The percentage of fully degraded embryos in day 2 group (35.7%) was significantly lower than that of day 3 group (41.9%) and the number of cycles without embryo transfer was due to total storage of embryos. Degenerated is: 13.2%.

* With vitrification method.

- The percentage of live embryos, the percentage of intact embryos after disintegration and the proportion of embryos split after vitrification in 2 days were: (78.9%, 67.3% and 56.7%), respectively. statistically significant compared to day 3 group (70.3%, 68.9% and 51.9%).

- The percentage of fully degenerated embryos in day 2 group was 25.6% which was statistically lower than that of day 3 group (31.1%) and number of cycles without embryos transferred due to total storage of embryos. Degeneration is: 8.3%.

* The embryo survival rate of vitrification method tends to be higher than the slow freezing method.

* Good embryo morphology has the best ability to live, divide through the culture stages. Average embryos and bad embryos were not correlated after each technical step.

2. Some related factors and prognosis of two slow freezing methods and vitrification embryos.

2.1. Factors related to pregnancy outcome and prognosis value after slow embryo transfer and vitrified embryo.

* Good embryo morphology observed at any culture stage increases the probability of pregnancy, with statistical significance. Except for the 3-day embryo group, in the slow-freezing method, the increase was not statistically significant. The mean and bad embryos did not increase the likelihood of pregnancy.

* Pregnancy rate is strongly correlated with number of transferred embryos, uterine lining thickness and embryo transfer point.

Pregnancy prognostic value of:

+ Number of embryos transferred in 1 cycle is ≥ 3 embryos

+ The lining of the uterus is ≥ 8.05 mm and <14.15 mm.

+ The embryo transfer point is ≥ 4 points.

+ Embryos are good on day 2, slow freezed: before freezing is ≥ 2 embryos, after thawing is ≥ 1 embryos, before transfer is ≥ 1 embryos.

+ Good embryo day 2, vitrification: before freezing is ≥ 1 embryos, after thawing is ≥ 1 embryos, before transfer is ≥ 1 embryos.

+ Embryos good on day 3, vitrification: before freezing is ≥ 2 embryos, after thawing is ≥ 2 embryos, before transfer is ≥ 2 embryos.

The prognostic value of pregnancy accumulates 100% of:

+ Embryos are good on day 2, slow freezed: before freezing is ≥ 15 embryos, after thawing is ≥ 9 embryos, before transfer is ≥ 5 embryos.

+ Good embryo day 2, vitrification: before freezing is ≥ 17 embryos.

+ Good embryo day 3, vitrification: before freezing is ≥ 11 embryos, before transfer is ≥ 5 embryos.

- Progression of pregnancy: clinical pregnancy rate, pregnancy rate stop progressing, live birth rate of vitrification group tends to be higher than that of slow-freezing.

- The weight, height of children born after cold embryo transfer tends to have no difference between slow and vitrification methods, there is no difference with babies born from natural conception.

- Up to 4 years old, The rate of children without genetic diseases, congenital malformations in the east group was 100%, in the vitrification group was 94.2%. 5.8% of children in vitreous group have genetic diseases, birth defects. Further research is required with a large sample size so that it can be concluded whether there is a link to the cold storage method with child malformations. as well as the long-term prognosis of physical development, movement mind and disease of children born after slow-frozen embryos and vitrification.

RECOMMENDATIONS

- Recommendation should only store good quality embryos, which will save costs, time and increase the probability of pregnancy, statistically significant.
- It is recommended to disintegrate the embryo until at least 1 good embryo.

- The number of recommended embryos to transfer is 3 embryos.
- With day 2 embryos, if there is only one good embryo left, then it should be selected by the method of vitrification will increase the ability to preserve embryos and increase the chances of pregnancy.
- For embryos on the 3rd, should only be stored by the method of vitrification.
- Further research is recommended, with large sample sizes and long-term monitoring of the physical and motor development of babies born after slow vitrified embryos transfer and vitrification.

PUBLICATIONS WHICH DERIVED FROM OUR THESIS

1. Phan Thi Thanh Lan (2015), "Evaluation of embryo quality after defrosting and pregnancy rate after embryo transfer on day 2 - 3 frozen by vitrification method", Journal of Medical Research, No. 95 (3), p. 15-23.
2. Phan Thi Thanh Lan (2015), "Evaluation of embryo quality after defrosting and pregnancy rate after embryo transfer on day 2 to 3 frozen by slow freezing method", Journal of Practical Medicine, Issue 979 (10), p. 2-6.