

ĐẶT VẤN ĐỀ

Thành công của một quy trình thụ tinh trong ống nghiệm được thể hiện qua tỉ lệ mang thai. Hiện nay, xu hướng giảm số lượng phôi chuyển nhưng không làm giảm tỉ lệ mang thai. Việc lựa chọn phôi có chất lượng tốt nhất để chuyển, kết hợp với chương trình trữ lạnh sẽ giúp người bệnh tiết kiệm chi phí đáng kể, đồng thời góp phần cải thiện tỉ lệ thai cộng dồn trên một chu kỳ có kích thích buồng trứng và tăng tính an toàn của kỹ thuật điều trị. Theo thống kê của Van Voorhis (1995), trữ lạnh phôi có khả năng làm tăng tỉ lệ mang thai lên khoảng 6,6%, tính trên mỗi noãn thu được sau chọc hút và chi phí điều trị sẽ giảm 25-45% so với chu kỳ chuyển phôi tươi, bên cạnh đó kết quả sản khoa lại cao hơn hẳn[1],[2],[3],[4].

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.

Hạ nhiệt độ chậm được Whittingham giới thiệu lần đầu tiên vào những năm đầu thập niên 70 trên mô hình phôi chuột. Em bé đầu tiên từ phôi người đông lạnh trên thế giới ra đời bằng phương pháp này được ghi nhận vào năm 1983 [5].

Trong phương pháp hạ nhiệt độ chậm, mẫu tế bào được làm lạnh với tốc độ hạ nhiệt chậm ($1-3^{\circ}\text{C}/1$ phút) từ nhiệt độ sinh lý xuống nhiệt độ rất thấp (khoảng -80°C) trước khi đưa mẫu vào lưu trữ trong ni - tơ lỏng. Ngoài ra, tốc độ rã đông cũng diễn ra chậm, quá trình xâm nhập và loại bỏ các chất bảo vệ đông lạnh (CPA) được diễn ra qua nhiều bước nhỏ. Do nồng độ các CPA sử dụng thấp và trải qua nhiều bước, tế bào tránh được sốc thẩm thấu gây ra bởi nồng độ CPA, đồng thời khả năng gây độc cho tế bào thấp.

Vào năm 1985, Rall và Fahy đã chứng minh được phôi chuột có thể được đông lạnh thành công bằng một phương pháp mới, được gọi là thủy tinh hóa(non - equilibrium cryopreservation method) [6]. Em bé đầu tiên trên thế giới ra đời bằng kỹ thuật này được báo cáo vào năm 2002 (Liebermann và cs.,2002; Shaw và Jones,2003) [7], [8].

Trong kỹ thuật thủy tinh hóa, ba yếu tố quan trọng góp phần vào sự thành công của kỹ thuật là nồng độ của các CPA sử dụng, tốc độ hạ nhiệt/làm ấm và

thể tích mẫu trữ lạnh (Vajta và Nagy, 2006), (Yahin và Arav, 2007) [9],[10]. Để có thể chuyển một lượng môi trường có chứa phôi từ dạng lỏng thành dạng "kính", các CPA cần phải được sử dụng ở nồng độ rất cao.

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, cho đến nay, các nhà khoa học trên thế giới vẫn liên tục thực hiện các nghiên cứu so sánh ưu nhược điểm của 2 phương pháp, cũng như theo dõi sức khỏe, bệnh tật của những trẻ sinh ra từ 2 phương pháp trữ lạnh để đưa ra lựa chọn tối ưu an toàn.

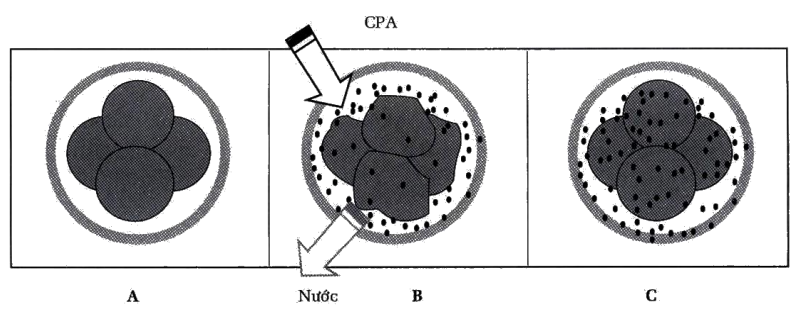
Tại trung tâm hỗ trợ sinh sản Quốc Gia, kỹ thuật đông lạnh chậm được thực hiện thành công năm 2002, thủy tinh hóa bắt đầu triển khai năm 2006, với phôi giai đoạn phân chia (phôi ngày 2 và phôi ngày 3). Tại thời điểm nghiên cứu (2012- 2013), hầu hết các trung tâm hỗ trợ sinh sản ở Việt Nam, đều đã thực hiện thủy tinh hóa phôi mới và tiếp tục rã đông những phôi đã đông lạnh chậm. Tuy nhiên, chưa có một nghiên cứu theo dõi dọc nào tại Việt Nam, 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.

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.**

Chương 1 TỔNG QUAN

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



Hình 1.1. Phản ứng của phôi khi cho vào môi trường có chứa CPA [9]

(CPA: chất bảo vệ lạnh)

A: Phôi 4 phôi bào

B: Các phôi bào bị mất nước làm cho kích thước phôi co nhỏ (khi vừa tiếp xúc môi trường trữ lạnh).

C: Khi CPA đi vào bên trong phôi bào và thay thế lượng nước tế bào đã mất đi, lúc này kích thước của phôi được phục hồi.

Nguyên lý của trữ lạnh là giảm nhiệt độ của môi trường chứa mẫu tế bào hay mẫu mô xuống nhiệt độ rất thấp, thường là 196°C (nhiệt độ sôi của ni-tơ lỏng). Ở nhiệt độ thấp này, hầu hết các hoạt động sinh học bên trong tế bào bao gồm các phản ứng sinh hoá và các hoạt động trao đổi chất bị ngừng lại.

Nhờ đó, tế bào sống ở dạng tiềm sinh (hibernate) và có thể bảo quản trong một thời gian rất dài. Với điều kiện nhiệt độ thấp, các phân tử nước, các chất hoà tan trong môi trường xung quanh cũng như các vật chất bên trong tế bào tồn tại dưới dạng kết hợp (dạng tinh thể và dạng kính), do đó, không có bất kỳ yếu tố nào từ môi trường bên trong cũng như bên ngoài có thể tác động đến tế bào trong giai đoạn này. Tuy nhiên, nhiệt độ cơ thể của đa số các loài được kiểm soát chặt chẽ, nhất là ở các động vật có vú. Do đó, trong quá trình

trữ lạnh, việc hạ nhiệt độ của tế bào về mức dưới 0°C có thể đưa tế bào vào một môi trường không sinh lý. Hậu quả là các tổn thương có thể xảy ra trong tất cả các giai đoạn của quá trình hạ nhiệt độ.

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

Một chu kỳ trữ lạnh thường trải qua ba giai đoạn quan trọng là

- (1) Đông lạnh: Đưa tế bào từ nhiệt độ sinh lý 37°C xuống nhiệt độ rất thấp -196°C .
- (2) Lưu trữ: Mẫu tế bào được bảo quản trong ni-tơ lỏng.
- (3) Rã đông: Đưa tế bào từ nhiệt độ thấp của ni-tơ lỏng về nhiệt độ sinh lý khi cần để tế bào tiếp tục phát triển.

Trong quá trình làm lạnh, tùy theo từng giai đoạn hạ nhiệt mà các tổn thương trên tế bào có thể khác nhau. Trong giai đoạn hạ nhiệt 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 [10]. Đây là những tổn thương không thể phục hồi khi đông lạnh noãn. So với những loài khác, các giọt lipid chứa trong tế bào noãn ở người tương đối thấp hơn. Nhưng điều này cũng không loại trừ khả năng tổn thương ở tế bào noãn người trong quá trình đông lạnh. Mặt khác, khoảng nhiệt độ này có thể gây tổn thương màng và polymer hoá các vi ống, do đó sẽ làm rối loạn khả năng sắp xếp của các nhiễm sắc thể trên mặt phẳng xích đạo khi tế bào phân chia và kết quả là gây hiện tượng lệch bội trong quá trình phân chia của tế bào [12].

Một số ảnh hưởng khác mà khoảng nhiệt độ này gây ra cho tế bào thường được nhắc đến như việc giảm tốc độ hoạt động của các men (enzyme) sử dụng các quá trình chuyển hoá của tế bào. Nghiên cứu cho thấy khi nhiệt độ giảm từ 37°C xuống 7°C hoạt động của các men giảm 8 lần. Tuy nhiên, ảnh hưởng của việc giảm hoạt động các men lên khả năng phát triển của tế bào sau này vẫn chưa được làm sáng tỏ [13]. Bên cạnh các khí hoà tan, môi trường nuôi cấy tế bào thường dùng khí CO_2 làm hệ đệm để cân bằng pH

trong môi trường. Khi nhiệt độ hạ xuống thấp, các khí này không còn ở dạng hoà tan trong môi trường nữa mà tách ra tạo thành các bọt khí. Số lượng và kích thước của các bọt khí càng lớn thì việc chèn ép làm tổn thương đến cấu trúc trong tế bào càng nghiêm trọng [14].

Khi tế bào được làm lạnh từ -5°C đến -15°C hiện tượng hình thành tinh thể đá từ các phân tử nước tinh khiết trong môi trường sát bên ngoài tế bào (môi trường ngoại bào) và ngay bên trong tế bào (môi trường nội bào) sẽ xuất hiện. Sự hình thành các tinh thể đá có thể 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 mà tế bào phải trải qua trong quá trình làm lạnh và rã đông [11]. Nước là thành phần chiếm thể tích lớn nhất bên trong tế bào cũng như ở môi trường bên ngoài tế bào. Khi 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 là 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. Hậu quả là 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 [15].

Tăng nhiệt độ tiềm tàng cũng là một hậu quả của sự hình thành các tinh thể đá. Các phân tử nước khi chuyển sang thể rắn sẽ giải thoát ra một lượng nhiệt. Nếu cùng một lúc có nhiều phân tử nước chuyển sang thể rắn thì nhiệt lượng thoát ra đủ lớn để làm thay đổi nhiệt độ đang từ vài độ âm lên 0°C . 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. Do đó, trong quá trình hạ nhiệt độ chậm, việc hạn chế các phân tử nước chuyển trạng thái cùng lúc là tối quan trọng.

Từ -50°C đến -150°C , tổn thương trên màng trong suốt nhưng đứt gãy màng trong suốt này không giống như sự đứt gãy màng trong suốt xảy ra do hiện tượng sốc thẩm thấu.

Ở nhiệt độ lưu trữ mẫu (dưới -150°C thường là nhiệt độ của ni-tơ lỏng -196°C), tế bào ít bị ảnh hưởng bất lợi nhất trong toàn bộ quy trình trữ lạnh. Tuy nhiên, những phản ứng tạo thành các gốc tự do và những sản phẩm đứt gãy của các đại phân tử bởi các bức xạ ion hoá hay các sản phẩm không mong muốn này, cũng như sự tác động của bức xạ có khả năng gây đứt gãy hoặc gây ra những tổn thương khác cho ADN. Mặc dù vậy, cho đến nay, vẫn chưa có một bằng chứng nào rõ ràng về ảnh hưởng của bức xạ lên mẫu tế bào lưu trữ trong ni-tơ lỏng.

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

1.2.1. Sử dụng chất bảo quản lạnh (CPA)

Sự hình thành tinh thể đá trong quá trình hạ nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng quan trọng nhất đến khả năng sống của tế bào sau một chu trình làm lạnh - rã đông [14]. Tinh thể đá được hình thành ngẫu nhiên ở bất kỳ vị trí nào bên trong và bên ngoài tế bào. Do đó, việc hạn chế hình thành các tinh thể đá là điều kiện tiên quyết để một chương trình trữ lạnh đạt tỉ lệ thành công cao. Việc phát hiện ra vai trò của glycerol trong trữ lạnh được xem là một phát kiến quan trọng, góp phần thúc đẩy kỹ thuật trữ lạnh phát triển [16]. Nhiều thử nghiệm khác đã được thực hiện với mục đích tìm ra những chất mới với khả năng bảo vệ tế bào sống trong suốt quá trình đông lạnh và rã đông tương tự glycerol. Những chất này được gọi một tên chung là các chất bảo vệ đông lạnh (CPA).

CPA là những chất có khả năng giống nhau là hoà tan được trong nước và gây cản trở sự chuyển trạng thái giữa nước và đá. Chúng tương tác với những phân tử sinh học với vai trò “thay thế nước” trong tế bào, nhờ đó hạn chế được sự hình thành các tinh thể đá nội bào khi nhiệt độ hạ thấp [17]. Một vai trò khác của CPA cũng không kém phần quan trọng là tế bào bảo vệ khi ở nhiệt độ thấp [11]. Do không tạo thành tinh thể, các CPA hạn chế sự gia tăng nồng độ của các chất hoà tan. Nó còn gắn kết lên màng bào tương để bảo vệ tế bào khi các phân tử nước ngoại bào bắt đầu chuyển sang dạng tinh thể. Tuy nhiên, những ghi nhận về hiệu quả của từng loại CPA lên các tế bào khác

nhau chỉ dựa trên quan sát thực tế, chưa được chứng minh về cơ chế [12]. 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. Hai loại CPA này có tính chất và cách thức hoạt động khác nhau, nhưng hỗ trợ cho nhau trong vai trò là tác nhân khử nước bên trong tế bào, giúp hạn chế sự tạo thành tinh thể đá nội bào. Một điểm cần lưu ý là bên cạnh những lợi điểm đã nêu, 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 [11].

CPA có khả năng thẩm thấu là những phức hợp oligohydroxy (như ethanol hoặc các phức hợp của ethanol), hoà tan được trong nước, khả năng gây độc cho tế bào thấp và có thể xâm nhập vào tế bào qua màng bào tương nhờ khối lượng phân tử nhỏ. Với những tính chất này, CPA có thể xâm nhập vào bên trong và thế chỗ các phân tử nước, giúp giảm sự hình thành tinh thể đá nội bào và do đó giảm tổn thương của các tế bào. Ngoài ra, sự hiện diện của các CPA này trong môi trường đông lạnh, làm cho nồng độ chất hoà tan trong môi trường ngoại bào, tăng lên đáng kể so với môi trường trong tế bào. Điều này gây ra sự mất cân bằng về áp suất thẩm thấu giữa bên trong và bên ngoài tế bào. Đồng thời, vai trò thay thế các phân tử nước bên trong tế bào của CPA, giúp cho kích thước của tế bào nhanh chóng hồi phục, sau khi được rút khỏi tế bào, nhờ đó giảm được hiện tượng tổn thương màng nếu tế bào ở trạng thái co bào tương quá lâu.

Các loại CPA có khả năng thẩm thấu thường được sử dụng trong IVF bao gồm 1,2-propanediol (PROH) (hay propylene glycol), dimethylsulfoxide (DMSO), glycerol, hay 1,2-ethanediol (hay ethylene glycol - EG). Các CPA này thường hoạt động ở pha đầu tiên của quá trình khử nước. Ở pha đầu tiên này, khi tế bào tiếp xúc với một dung dịch có chứa CPA có khả năng thẩm thấu, sự hiện diện của những chất này ở môi trường ngoại bào tạo ra một chênh lệch về áp suất thẩm thấu, giúp rút nước ra khỏi tế bào. Đồng thời, các CPA sẽ từ từ đi vào bên trong tế bào, thay thế các phân tử nước. Vì khả năng thẩm thấu của màng bào tương đối với nước lớn hơn đối với các CPA, do đó,

quá trình mất nước trong tế bào diễn ra nhanh hơn so với lượng CPA từ bên ngoài đi vào bên trong tế bào, thay thế các phân tử nước. Hậu quả là thể tích tế bào giảm nhanh trong thời gian đầu tiếp xúc với môi trường trữ lạnh. Sau đó, khi CPA đã thay thế hoàn toàn lượng nước mất, tế bào sẽ khôi phục hình dạng về thể tích ban đầu.

Như đã trình bày, có bốn loại CPA thường được sử dụng là glycerol, DMSO, EG và PROH. Các loại CPA trên có thể được sử dụng đơn lẻ hay phối hợp. Nhìn chung việc lựa chọn loại CPA nào sẽ phụ thuộc vào tính thấm thấu của màng tế bào và khả năng gây độc của loại CPA đó. Glycerol hay còn gọi là glycerine, là một hợp chất đường của rượu. Glycerol có mặt nhiều trong tế bào gan của những loài động vật có khả năng sống trong điều kiện nhiệt độ rất thấp (ở các vùng cực) giúp cho máu của những động vật này không bị đông, do đó nó tương thích với những vật chất sinh hoá trong tế bào sống. Chính vì thế, khả năng gây độc của glycerol đối với tế bào được xếp vào loại thấp nhất và được sử dụng nhiều trong việc bảo vệ tế bào bằng cách làm giảm tổn thương gây ra do sự hình thành tinh thể đá. Tuy nhiên, nhược điểm của glycerol lại nằm ở khả năng thẩm qua màng tế bào chậm.

Dimethyl sulfoxide (DMSO) có khả năng hoà tan nhiều loại chất hữu cơ khác nhau như carbohydrate, polymer và peptit, cũng như các muối vô cơ và khí. Trong trữ lạnh, DMSO được sử dụng khá rộng rãi để bảo vệ các bào quan, mô và tế bào. Khả năng thẩm nhanh qua màng tế bào của DMSO đã khắc phục được nhược điểm của glycerol, do đó có thể rút ngắn được thời gian tiếp xúc của tế bào với môi trường CPA nhằm hạn chế những tác động bất lợi không mong muốn của CPA lên tế bào. Tuy nhiên, một nhược điểm của DMSO là khả năng gây độc cho tế bào cao, đặc biệt khi tiếp xúc với tế bào ở nhiệt độ cao hay thời gian tiếp xúc dài. Số liệu cho thấy noãn khi tiếp xúc với dung dịch chứa DMSO trong thời gian dài sẽ không bị ảnh hưởng đến khả năng thụ tinh và phát triển thành phôi, nhưng tỉ lệ lệch bội ở các noãn này lại tăng lên đáng kể so với noãn không tiếp xúc với DMSO [18]. Do đó, khi sử dụng DMSO trong trữ lạnh, người ta thường để tế bào tiếp xúc môi trường

có chứa DMSO ở nhiệt độ thấp (0-4°C) nhằm làm giảm độc tính của DMSO đối với tế bào.

Ethylene Glycol (EG) được biết đến trong trữ lạnh thường ở dạng monoethylene glycol hay 1,2-ethanediol. EG thường được sử dụng rộng rãi trong trữ lạnh với vai trò là chất bảo vệ cho các bào quan của tế bào nhờ tính thấm qua màng nhanh do trọng lượng phân tử thấp. Khả năng gây độc của EG lên tế bào, phụ thuộc vào nồng độ, nhiệt độ và thời gian tiếp xúc.

DMSO có tính thấm nhanh nhất, PROH có tính thấm qua màng nhanh hơn glycerol. Thành phần này cũng được xem là có khả năng gây độc thấp đối với tế bào và được sử dụng nhiều để làm dung dịch hoà tan trong dược phẩm. Tuy nhiên, một số nghiên cứu chứng minh rằng PROH có khả năng làm tăng tỉ lệ tự phân chia (pathenogenetic activation) của noãn chuột sau trữ lạnh và đã từng khi sử dụng ở nồng độ cao (1,5 mol/l) [18].

Việc sử dụng kết hợp 2 hay nhiều CPA trong một dung dịch đông lạnh, nhằm làm tăng khả năng khử nước tế bào và làm giảm độc tính của từng thành phần riêng lẻ lên tế bào, là mô hình thường gặp các chương trình trữ lạnh hiện nay trong lĩnh vực IVF [19].

Khi sử dụng các loại CPA có khả năng thấm qua màng tế bào, trong quá trình làm lạnh, do đặc tính phân tử lượng lớn, nên nước sẽ bị kéo ra ngoài nhanh hơn so với lượng CPA xâm nhập vào bên trong tế bào. Ngược lại, khi đã đông, nước từ môi trường bên ngoài có khuynh hướng đi vào trong tế bào với tốc độ nhanh hơn. Tình trạng này làm cho tế bào bị thay đổi hình dạng, co nhỏ trong quá trình mất nước hay phình to khi nước đi vào trở lại tế bào trong quá trình rã đông. Người ta thấy nếu sự thay đổi về thể tích vượt quá 40% so với ban đầu thì có thể ảnh hưởng đến cấu trúc bên trong của tế bào [20]. Để hạn chế sự thay đổi thể tích quá mức của tế bào, trong các môi trường trữ lạnh, rã đông, các CPA không có tính thấm qua màng tế bào thường được bổ sung. Đây là những chất có khối lượng phân tử lớn nên không có khả năng xâm nhập vào tế bào qua màng bào tương.

Các CPA ngoại bào được sử dụng thường là sucrose hay các oligosaccharide khác. Chúng ở bên ngoài tế bào, hỗ trợ các CPA có khả năng thẩm thấu duy trì sự chênh lệch thẩm thấu trong pha khử nước tế bào. Các CPA không có khả năng thẩm thấu, thường hoạt động ở pha thứ hai của quá trình khử nước. Ở pha này, tế bào trong trạng thái tiếp xúc với một dung dịch chứa hỗn hợp gồm CPA nội bào (phần CPA được sử dụng ở bước đầu tiên đã thẩm vào bên trong tế bào, thay thế nước) và CPA ngoại bào. Điều này giúp tái lập sự mất cân bằng và tạo ra pha khử nước tiếp theo, giúp cho sự khử nước của tế bào xảy ra triệt để.

1.2.2. Kiểm soát tốc độ làm lạnh và rã đông

1.2.2.1. Tốc độ làm lạnh (cooling rate)

Khi nhiệt độ hạ xuống thấp, chỉ có các phân tử nước tinh khiết chuyển sang dạng tinh thể đá. Nhiệt độ càng giảm thấp, số lượng phân tử nước tinh khiết tạo thành đá càng nhiều. Hỗn hợp các muối và những chất hoà tan khác có trong môi trường đông lạnh vẫn giữ nguyên trạng thái và tạo thành phần không đông (unfrozen fraction). Độ thẩm thấu của phần không đông này tăng dần khi số lượng tinh thể đá càng tăng. Ở trạng thái này, độ thẩm thấu của môi trường ngoại bào gia tăng do sự mất nước, đòi hỏi tế bào phải có những phản ứng cân bằng thẩm thấu với nồng độ môi trường ngoại bào. Kết quả là tế bào bị khử nước. Và quá trình khử nước này chỉ dừng lại khi toàn bộ vật chất bên trong và bên ngoài tế bào chuyển sang dạng tinh thể. Do đó, tốc độ làm lạnh sẽ ảnh hưởng rất lớn đến khả năng khử nước và đặc biệt là khả năng sống của tế bào sau rã đông. Thật vậy, nếu tốc độ làm lạnh quá nhanh, các phân tử nước nhanh chóng chuyển sang dạng tinh thể đá, tế bào không có đủ thời gian để quá trình khử các phân tử nội bào diễn ra triệt để, nước vẫn còn lại nhiều bên trong tế bào và chuyển sang dạng tinh thể đá nội bào khi nhiệt độ hạ xuống hấp, kết quả là tế bào bị tổn thương. Tốc độ làm lạnh nhanh, cũng có thể tạo ra một chênh lệch về áp suất thẩm thấu lớn giữa hai bên màng bào tương, làm tổn thương độ đàn hồi của màng. Nếu tốc độ làm

lạnh quá chậm, tế bào có nhiều thời gian để khử nước, tuy nhiên, tế bào sẽ bị mất quá nhiều nước, có thể dẫn đến tổn thương màng. Bên cạnh đó, tế bào không những tiếp xúc với áp suất thẩm thấu cao của môi trường ngoại bào, trong thời gian dài, mà còn phải tiếp xúc quá lâu với các muối, các chất hoà tan khác và chất CPA trong môi trường ngoại bào. Điều này có thể gây độc cho tế bào. Ngoài ra, tính đàn hồi của màng tế bào cũng bị ảnh hưởng vì tế bào ở trạng thái co nguyên sinh quá lâu, do sự phân ứng cân bằng với môi trường ngoại bào có áp suất thẩm thấu cao.

Tuỳ theo thể tích và diện tích màng bào tương của từng loại tế bào, tốc độ làm lạnh phải được điều chỉnh phù hợp. Tốc độ làm lạnh của từng loại tế bào được tính toán dựa trên bốn yếu tố sau: (1) thành phần cấu tạo và thẩm của màng tế bào, (2) tỉ lệ giữa diện tích bề mặt và thể tích của tế bào (S/V), (3) nhiệt độ, (4) khả năng thẩm của màng tế bào (L_p). Tốc độ làm lạnh ảnh hưởng trực tiếp đến tốc độ mất nước của tế bào trong quá trình khử nước. Với tế bào noãn và phôi người tốc độ làm lạnh tối ưu theo nghiên cứu là $0,3^{\circ}\text{C}/\text{phút}$. Tốc độ này cho phép sự trao đổi nước qua màng tế bào có thể diễn ra tương đối triệt để trước khi toàn bộ vật chất bên trong và bên ngoài màng tế bào hoàn toàn chuyển sang thể rắn [10].

1.2.2.2. Tốc độ rã đông

Quy trình rã đông có liên hệ chặt chẽ với quy trình làm lạnh, hay cụ thể hơn là phụ thuộc vào lượng tinh thể đá còn lại bên trong tế bào. Hiện tượng tái kết tinh xảy ra, trên những phân tử nước còn lại bên trong tế bào này, khi nhiệt độ rã đông còn dưới 0°C , có khả năng làm tổn thương tế bào. Đây là yếu tố gây tổn thương tế bào quan trọng nhất ở giai đoạn rã đông. Do vậy, tốc độ rã đông phải đủ nhanh để vượt qua giai đoạn này để hạn chế sự tổn thương tế bào do hiện tượng tái kết tinh gây ra. Tuy nhiên, nếu tốc độ rã nhanh, nước có thể không đủ thời gian để trở lại bên trong tế bào, và kết quả là màng tế bào bị co mà không thể phục hồi. Nhưng nếu tốc độ rã đông quá chậm, tế bào có thời gian bù nước nhưng thời gian tiếp xúc với môi trường ngoại bào có tính ưu

trương quá lâu, vì lúc này các tinh thể đã tan chậm, làm cho khả năng hoà tan các muối và chất hoà tan khác xảy ra chậm. Kết quả là tế bào có thể bị độc và giảm khả năng phát triển tiếp tục sau rã đông [21].

1.2.3. Trang thiết bị và dụng cụ

Quá trình trữ lạnh cần được hỗ trợ của ni-tơ lỏng. Ngoài ra, ni-tơ lỏng còn cần thiết cho quá trình lưu trữ mẫu, đảm bảo mẫu được bảo quản ở nhiệt độ âm sâu từ -150°C đến -196°C . Trong điều kiện lý tưởng, nên sử dụng ni-tơ lỏng đã qua xử lý để sử dụng trong y tế. Trong quá trình thao tác trữ và rã, cần có dụng cụ chứa ni-tơ lỏng để chứa mẫu tạm thời. Các dụng cụ chứa này nên có miệng rộng để dễ thao tác và có thể bằng xốp hay các loại thùng polystyrene có thành dày. Ngoài ra, thùng lưu trữ nên lựa chọn loại có miệng rộng để dễ dàng cất và lấy mẫu. Tuy nhiên, tốc độ bay hơi của ni-tơ lỏng cũng sẽ nhanh hơn, do đó, cần có kế hoạch thêm ni-tơ lỏng định kỳ để đảm bảo tốt điều kiện lưu mẫu.



Hình 1.2. Bình chứa ni-tơ lỏng trữ phôi

Tùy theo phương pháp trữ lạnh sử dụng, hơi ni-tơ lỏng hay dung dịch ni-tơ trực tiếp mà có thể phải trang bị thêm máy hạ nhiệt độ. Đây là loại máy dùng để bơm hơi ni-tơ lỏng vào buồng trữ đông nhằm hạ nhiệt độ của mẫu trữ theo chương trình được cài đặt sẵn. Hai loại máy thường được sử dụng nhất trong IVF trên người là Cryologic và Planner.



Hình 1.3. Máy Cryologic



Hình 1.4. Máy Planner

Dụng cụ để chứa mẫu vật trong quá trình trữ lạnh sẽ phụ thuộc vào phương pháp trữ lạnh sử dụng và loại tế bào được trữ, có thể là các ống nhựa bằng plastic (straw) hay có thể tích 0,25-0,5 μl , cryotube hay các dụng cụ đặc chế để có được tốc độ làm lạnh cao như cryotop, cryoleaf, cryopette... Ngoài ra, cần trang bị thêm các tube nhựa (cryovial), thanh nhôm (aluminium cane) hay các cassette để đặt các dụng cụ chứa mẫu trữ vào thùng lưu trữ.

Môi trường trữ lạnh và rã đông là một phần quan trọng, góp phần không nhỏ vào thành công của chương trình. Ngoài thành phần cơ bản, các môi trường này thường chứa nhiều loại CPA với nồng độ khác nhau tùy theo phương pháp trữ lạnh. Một số trung tâm tự pha môi trường để sử dụng nhưng đa số hiện nay đều sử dụng các loại môi trường sẵn có trên thị trường do quy trình kiểm soát chất lượng được thực hiện nghiêm ngặt hơn.

1.3. Các phương pháp trữ lạnh.

Một chu trình trữ lạnh rã đông thường bao gồm các giai đoạn như:

(1) Tiếp xúc với chất bảo quản (CPA) và khử nước, (2) Hạ nhiệt độ, (3) Lưu trữ mẫu, (4) Rã đông, (5) Loại bỏ CPA ra khỏi tế bào và (6) đưa tế bào về hoạt động sinh lý ban đầu.

Hiện nay có 2 phương pháp trữ lạnh đang được áp dụng là: Hạ nhiệt độ chậm và thủy tinh hóa. Sự khác biệt chính của 2 phương pháp này nằm ở tốc độ hạ nhiệt có hay không sự hình thành tinh thể đá nội bào cũng như ngoại bào.

1.3.1. Hạ nhiệt độ chậm (Slow - freezing)

Hạ nhiệt độ chậm còn được gọi là phương pháp trữ lạnh có kiểm soát tốc độ làm lạnh (Controlled - rate freezing) phương pháp này được Whittingham giới thiệu lần đầu tiên vào những năm đầu thập niên 70 trên mô hình phôi chuột. Em bé đầu tiên từ phôi người đông lạnh trên thế giới ra đời bằng phương pháp này được ghi nhận vào năm 1983 [5].

Trong phương pháp hạ nhiệt độ chậm, mẫu tế bào được làm lạnh với tốc độ hạ nhiệt chậm ($1-3^{\circ}\text{C}/1$ phút) từ nhiệt độ sinh lý xuống nhiệt độ rất thấp (khoảng -80°C) trước khi đưa mẫu vào lưu trữ trong ni-tơ lỏng. Ngoài ra, tốc độ rã đông cũng diễn ra chậm, quá trình xâm nhập và loại bỏ các chất bảo vệ lạnh được diễn ra qua nhiều bước nhỏ. CPA thấm qua màng tế bào thường được sử dụng là 1,2 - propanediol (PROH) hoặc dimethylsulfoxide (DMSO) hoặc glycerol (tùy thuộc vào đối tượng tế bào và giai đoạn phát triển của tế bào). Trước khi hạ nhiệt độ, tế bào được cho tiếp xúc với các loại môi trường có CPA với nồng độ tăng dần (từ 0,5 - 1,5mol/l). Do nồng độ các CPA sử dụng thấp và trải qua nhiều bước, tế bào tránh được sốc thẩm thấu gây ra bởi nồng độ CPA, đồng thời khả năng gây độc cho tế bào thấp. Tuy nhiên, thời gian để tế bào tiếp xúc với môi trường có CPA dài, để quá trình khử nước tế bào xảy ra hoàn toàn trước khi hạ nhiệt độ. Sucrose là thành phần thường được thêm vào môi trường đông lạnh, rã đông để làm tăng khả năng khử nước tế bào và giảm sốc thẩm thấu. Nồng độ sucrose sử dụng thường khoảng 1 - 1,5mol/l (Fabbri và cs., 2001) [6].

1.3.1.1. Quy trình đông lạnh và rã đông trong hạ nhiệt độ chậm.

Đối với phương pháp hạ nhiệt độ chậm, tế bào được tiếp xúc với môi trường làm lạnh có chứa CPA với nồng độ tăng dần. Trong khoảng thời gian từ 15-30 phút. Trong quá trình này, một lượng lớn nước trong tế bào sẽ bị mất ra ngoài. Sau đó, tế bào trữ được cho vào dụng cụ trữ phôi, thông thường là ống nhựa bằng plastic (straw). Các straw này sẽ được đặt vào buồng hạ nhiệt độ của máy hạ nhiệt để bước vào giai đoạn làm lạnh.

Quá trình khử nước của tế bào tiếp tục xảy ra ở giai đoạn đầu của pha làm lạnh. Khi các phần tử nước tinh khiết chuyển thành đá, nồng độ chất hòa

tan tăng sẽ tạo sự chênh lệch áp suất thẩm thấu, giúp nước được rút ra khỏi tế bào. Tuy nhiên, sự hiện diện của các chất bảo vệ đông lạnh trong môi trường đông lạnh đã làm cho điểm đông lạnh của dung dịch thấp hơn so với bình thường. Do đó, dung dịch vẫn có thể ở trạng thái chưa đông và tinh thể đá ngoại bào vẫn chưa hình thành ở -10°C đến -15°C . Hiện tượng này gọi là sự chậm đông. Để tránh sự chậm đông, khi nhiệt độ đạt -5°C đến -7°C (chưa đến điểm đông của hỗn hợp môi trường), nhân đá được tạo ra một cách nhân tạo gọi là sự tạo mầm tinh thể đá (seeding). Mục đích của công việc này là tạo những tinh thể đá đầu tiên ở vị trí cách xa vị trí của tế bào một cách cố ý để không làm tổn thương tế bào và khởi động quá trình tạo thành tinh thể đá, giúp việc khử nước của tế bào tiếp tục xảy ra. Ngay sau khi tạo mầm tinh thể đá, nước ở ngoại bào dần dần chuyển trạng thái từ thể lỏng sang thể rắn và mẫu tế bào được làm lạnh tiếp tục với nhiệt độ làm lạnh rất chậm ($-3^{\circ}\text{C}/\text{phút}$). Khi nhiệt độ mẫu đạt -30°C đến -40°C , phần lớn nước ngoại bào chuyển thành dạng tinh thể đá. Dưới điều kiện này, nhiệt độ của mẫu tế bào có thể giảm một cách nhanh chóng để đạt đến nhiệt độ của ni-tơ lỏng [6].

Khi có nhu cầu sử dụng, tế bào có thể được lấy ra khỏi thùng lưu trữ mẫu để rã đông. Quá trình rã đông được thực hiện phụ thuộc vào điều kiện làm lạnh. Nếu mẫu tế bào được làm lạnh xuống -20°C đến -30°C trước khi nhúng vào ni-tơ lỏng, thì nhân đá nội bào có thể hình thành do sự khử nước không hoàn toàn. Với điều kiện này, quá trình rã đông nên được thực hiện nhanh để tránh sự phát triển của các tinh thể đá nội bào đến mức có thể gây hại cho các bào quan và các tổ chức bên trong tế bào. Ngược lại, nếu mẫu tế bào được cho vào ni-tơ lỏng từ giai đoạn hạ nhiệt độ thấp hơn (dưới -80°C) thì quá trình rã đông sẽ được thực hiện với tốc độ rã đông chậm, do tế bào có thời gian dài hơn cho pha khử nước trong quá trình đông lạnh.

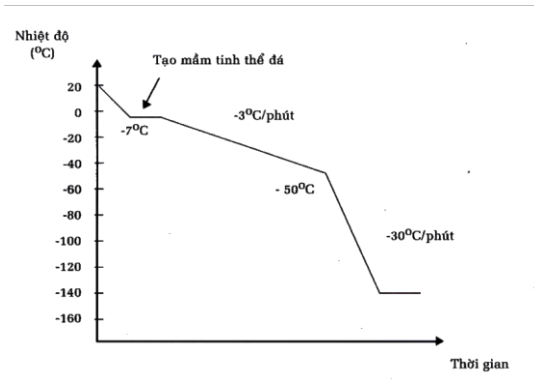
Thông thường, quá trình rã đông có thể được bắt đầu bằng cách nhúng trực tiếp straw chứa tế bào trữ vào bể nước ấm 37°C trong thời gian khoảng 30 giây để đưa nhiệt độ mẫu trữ nhanh chóng về nhiệt độ phòng thí nghiệm. Sau đó, tế bào trữ được lấy ra khỏi straw và cho tiếp xúc trực tiếp với môi

trường rã đông. Các môi trường rã đông sẽ có nồng độ CPA giảm dần, giúp quá trình bù nước (rehydration) được thực hiện nhằm loại bỏ các CPA bên trong tế bào và cung cấp nước lại cho tế bào. Toàn bộ quá trình rã đông diễn ra trong thời gian khoảng 30 phút. Kết thúc quá trình này, tế bào được đặt vào điều kiện nuôi cấy chuẩn để tiếp tục phát triển (Borini và cs.,2009) [22].

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

Ưu điểm của phương pháp hạ nhiệt độ chậm là tính an toàn cao do được thiết lập dựa trên sự cân bằng về tốc độ làm lạnh và nồng độ CPA. Trong hạ nhiệt độ chậm, 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 qua màng tế bào nên tính độc đối với tế bào thấp. Ngoài ra phương pháp đông chậm còn có ưu điểm là khi đông nhiều mẫu sẽ tiết kiệm thời gian và thao tác dễ hơn. Với ưu điểm này, trong thời gian qua nhiều trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm đã áp dụng phương pháp này rộng rãi trong trữ lạnh giao tử và phôi.

Tuy nhiên, ưu điểm của phương pháp này cũng chính là nhược điểm của nó. Do nồng độ CPA sử dụng không cao, nên dung dịch đông lạnh không có khả năng tạo chênh lệch áp suất thẩm thấu đủ lớn để khử nước bên trong tế bào một cách triệt để. Tinh 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 rã đông bằng phương pháp này không cao. Ngoài ra, để thực hiện được phương pháp đông lạnh chậm, một trung tâm IVF cần phải trang bị hệ thống máy hạ nhiệt độ theo chương trình, được điều khiển một cách chính xác tốc độ làm lạnh. Chi phí để trang bị một hệ thống này khá cao và cần phải có chi phí cho việc bảo trì hàng năm. Thời gian thực hiện cho một lần đông lạnh noãn và phôi trên thực tế khá dài (trung bình 1,5 -2 giờ) cũng là nhược điểm không nhỏ với phương pháp này.



Hình 1.5. Sơ đồ hạ nhiệt độ trong hạ nhiệt độ chậm

1.3.2. Thủy tinh hóa (vitrification)

Vào năm 1985, Rall và Fahy đã chứng minh được phôi chuột có thể được đông lạnh thành công bằng một phương pháp mới, được gọi là thủy tinh hóa [6]. Thủy tinh hóa là một phương pháp trữ lạnh không cân bằng (non - equilibrium cryopreservation method) được thiết lập dựa trên nguyên lý cơ bản là không có sự hình thành của tinh thể đá bên trong lẫn bên ngoài tế bào. Điều này có thể đạt được bằng cách tăng tốc độ làm lạnh hay tăng nồng độ CPA (chất bảo vệ đông lạnh) và trong một số trường hợp, phối hợp cả hai yếu tố trên. Trong phương pháp thủy tinh hóa, mẫu tế bào được nhúng trực tiếp vào ni-tơ lỏng ngay sau khi được cho trao đổi với CPA mà không qua giai đoạn hạ nhiệt độ từ từ. Toàn bộ vật chất (bao gồm cả các phân tử nước) bên trong tế bào và môi trường bên ngoài tế bào sẽ chuyển thành thể rắn dạng "kính" (glass-like solidification) và hoàn thành không có sự hình thành tinh thể đá. Do đó, phương pháp thủy tinh hóa còn được gọi với một tên khác là phương pháp trữ lạnh không tạo đá (ice crystal - free cryopreservation method). Em bé đầu tiên trên thế giới ra đời bằng kỹ thuật này được báo cáo vào năm 2002 (Liebermann và cs., 2002; Shaw và Jones, 2003) [8], [9].

Trong kỹ thuật thủy tinh hóa, ba yếu tố quan trọng góp phần vào sự thành công của kỹ thuật là nồng độ của các CPA sử dụng, tốc độ hạ nhiệt/làm ấm và thể tích mẫu trữ lạnh (Vajta và Nagy, 2006), (Yahin và Arav, 2007)

[10],[11]. Để có thể chuyển một lượng môi trường có chứa noãn/ phôi từ dạng lỏng thành dạng "kính", các CPA cần phải được sử dụng ở nồng độ rất cao. Trong 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 CPA 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.

1.3.2.2. Các loại CPA (chất bảo vệ lạnh) sử dụng trong trữ lạnh thủy tinh hóa.

Tương tự hạ nhiệt độ chậm, CPA là chất không thể thiếu trong thành phần các môi trường trữ lạnh/ rã đông với thủy tinh hóa. Người ta cũng sử dụng kết hợp các CPA có tính thẩm và không có tính thẩm qua màng tế bào. Tuy nhiên, như đã trình bày, để hạn chế sự hình thành tinh thể đá nội bào trong thủy tinh hóa, nồng độ các chất CPA sử dụng phải rất cao, gấp 4-5 lần so với hạ nhiệt độ chậm. Trong khi đó, độc tính của CPA trên tế bào lại tỉ lệ thuận với nồng độ và thời gian tiếp xúc. Do đó, để khắc phục tình trạng này, người ta thường phối hợp sử dụng nhiều CPA khác nhau trong thủy tinh hóa, trong đó, thường có hai loại CPA có khả năng thẩm thấu qua màng tế bào. Các nghiên cứu cho thấy khi kết hợp hai loại CPA khác nhau, khả năng thẩm vào màng tế bào sẽ cao hơn và khả năng gây độc sẽ giảm so với khi sử dụng từng loại CPA riêng lẻ (Vajta và Nagy, 2006) [10].

Hiện nay, hai CPA có khả năng thẩm thấu thường được sử dụng nhiều nhất trong môi trường thủy tinh hóa là ethylene glycol (EG) và dimethylsulfoxide (DMSO). Bên cạnh đó, sucrose và trehalose là một lựa chọn ưu tiên trong các loại CPA không có khả năng thẩm qua màng tế bào.

CPA nội bào, hay còn gọi là CPA thẩm thấu

Ethylene glycol (EG) thường được sử dụng trong môi trường đông lạnh do có độc tính thấp, độ thẩm thấu cao. Tuy nhiên, để hạn chế tối đa độc tính thường sử dụng kết hợp EG và dimethyl sulfoxide (DMSO) hoặc propanediol (PrOH). Hỗn hợp EG và DMSO được sử dụng thường xuyên hơn do tính thẩm của hỗn hợp này cao hơn so với các CPA khác. Một số CPA nội bào thường được sử dụng như:

- BG: butylene glycol.
- PrOH: propanediol.
- PG: propylene glycol.
- DMSO: dimethyl sulfoxide.
- Gly: Glycerol.
- EG: ethylene glycol.
- Met: methanol.

CPA ngoại bào (CPA không xuyên màng)

Chất bảo quản ngoại bào có hiệu quả trong việc bảo tồn chức năng của màng, hạn chế sự khử nước quá nhanh làm chết tế bào. Một số CPA ngoại bào như:

- Sucrose.
- Trehalose
- PVP: polyvilylpyrrolidone.
- Fic: Ficoll.
- Dex: dextran.
- PEG: polyethylene glycol.

Vai trò chính của một số chất bảo quản lạnh tiêu biểu trong môi trường trữ-rã phi.

Trehalose và ficoll

Trehalose có những đặc tính vượt trội hơn so với sucrose và ficoll. Ficoll có thể gia tăng độ tính cho môi trường đông lạnh khi sử dụng kết hợp với EG, để giảm độ tính cần sử dụng kết hợp với sucrose (Kasai M và cs., 1990) [26]. Khi so sánh độ tính của các chất bảo quản lạnh khi trữ lạnh trứng trưởng thành bằng việc đánh giá khả năng thụ tinh của chúng sau khi rã đông, Cean A và cộng sự (2013) [24] kết luận:

- Ficoll có độ tính cao nhất cho trứng tiếp xúc trong 10 phút, sự thụ tinh của trứng không xảy ra.
- Đối với sucrose, khi cho trứng tiếp xúc trong 10 phút thì tỉ lệ thụ tinh là 24% (sucrose 10%) và 22,67% (sucrose 20%).

- Trehalose có độc tính thấp nhất, ở nồng độ 10% và 15%, tỉ lệ thụ tinh của trứng không giảm và không phụ thuộc vào thời gian tiếp xúc.

Ficoll có áp suất thẩm thấu thấp, do đó, khả năng tạo cân bằng giữa lượng nước di chuyển ra ngoài tế bào và CPA vào trong tế bào bị hạn chế hơn so với trehalose. Trehalose là chất khử nước mạnh nhất, nó làm giảm sự di chuyển của các phân tử nước bằng cách liên kết hydro-trehalose còn gắn với màng tế bào bằng các liên kết hydro nhằm giữ sự ổn định của màng cho các CPA nội bào hoạt động. Khả năng khử nước của trahalose gấp 2,5 lần các loại đường khác (SolaPenna và cs., 1998) [25].

Độ nhớt của trehalose cao hơn của sucrose (hình 1) và ficoll (Yavin và cs., 2007) [10]. Độ nhớt cao giúp tách các phân tử nước xa nhau, mạng lưới nước không hình thành được, do đó làm giảm sự hình thành tinh thể đá trong môi trường và kích thước của tinh thể đá nhỏ (Tsutomu Uchida và cs., 2012) [26].

Sucrose

Là một disaccharide tạo thành từ glucose và fructose, trong khi đó trahalose được cấu tạo từ 2 phân tử đường glucose. Vai trò của sucrose trong môi trường trữ lạnh là bảo tồn chức năng của màng tế bào trong điều kiện ít nước.

HPC (hydroxypropyl cellulose)

HPC được sử dụng nhằm thay thế cho huyết thanh tổng hợp nhằm giảm nguy cơ nhiễm khuẩn và virus (Goral và cs., 2015) [27]. HPC được bổ sung vào môi trường thủy tinh hóa Kitazato có bổ sung 20% SSS (serum substitute supplement – huyết thanh tổng hợp), trong quá trình rã đông trứng/ phôi khó rời ra khỏi cryotop, do đó cần phải sử dụng pipette để tách ra, việc này làm tăng nguy cơ tổn thương cho trứng/ phôi. Khi bổ sung 5% HPC vào môi trường trữ lạnh, thời gian bám dính chỉ còn khoảng 11 giây, trong khi bổ sung 5% hoặc 20% SSS thời gian bám dính lên đến 60 giây.

EG

Là CPA hiệu quả nhất trong nhóm chất có nguồn gốc từ Gly, ít độc tính hơn hẳn Gly và PrOH. Tuy nhiên ở nhiệt độ cao (37°C), EG bị chuyển hoá

thành oxalic gây độc cho tế bào, chính vì vậy, không nên tiến hành trữ lạnh phôi khi bề nóng.

Khi xét về độ nhớt của các CPA: Glycerol có độ nhớt cao nhất và cấp độ giảm dần từ PG> EG> DMSO. Theo nghiên cứu của J Ali (1993) thì độc chất của EG là thấp nhất so với Met < DMSO< Gly < PG < BG [28]. Như vậy, mỗi chất đều có những ưu điểm khuyết điểm riêng, và thường sẽ gây độc ở một nồng độ nào đó. Môi trường trữ lạnh thường có 2 chất bảo quản lạnh, mục đích của việc này là giảm nồng độ mol tổng của môi trường thủy tinh hoá, nhằm giảm độc tính và ổn định màng tế bào.

Chính vì vậy, mục tiêu của nhà sản xuất môi trường vitrification là tạo ra được dòng môi trường trữ lạnh có khả năng thủy tinh hoá cao nhất, ít độc tố nhất nhằm thuận tiện hơn trong thao tác. Để đạt được điều này cần hoà trộn các thành phần trên theo một tỉ lệ nhất định.

1.3.2.3. Tốc độ hạ nhiệt.

Người ta nhận thấy với tốc độ làm lạnh 107⁰C/giây, nước trong trạng thái tinh khiết có thể chuyển thành dạng "kính", tuy nhiên, đối với các loại môi trường chứa hỗn hợp nhiều chất thì tốc độ làm lạnh phải cao hơn nhiều lần (Rall,1987) [7]. Tốc độ làm lạnh và rã đông của phương pháp trữ lạnh thủy tinh hóa rất cao, khoảng 20.000 - 100.000⁰C/phút, trong khi đối với phương pháp trữ lạnh chậm cần 3-4 phút để hạ 1⁰C (ở một số giai đoạn cụ thể của quy trình).

Trong giai đoạn đầu phát triển, các dụng cụ chứa phôi/noãn được sử dụng là các straw hay các tube trữ lạnh (cryovial) thường được dùng trong hạ nhiệt độ chậm. Các loại dụng cụ này có thành dày và chứa một lượng thể tích môi trường khá lớn. Do đó, với các loại dụng cụ này, tốc độ hạ nhiệt thường rất giới hạn, khoảng 4.460⁰C/phút đối với straw (Kuwayama và cs., 2005a) [29]. Trong thời gian qua, hai hướng tiếp cận được xem là có hiệu quả nhất là giảm lượng thể tích môi trường xung quanh noãn/phôi và thiết lập một hệ thống trong đó, mẫu trữ có thể tiếp xúc trực tiếp với ni-tơ lỏng. Rất nhiều

nghiên cứu đã được thực hiện theo hướng này, nhưng chỉ đến năm 2005, phương pháp cryotop ra đời đã nhanh chóng góp phần đưa kỹ thuật thủy tinh hóa trở nên phổ biến như hiện nay. Với cryotop, tốc độ làm lạnh và rã đông có thể đạt với 22.800°C/phút và 42.100°C/phút (Kuwayama và cs., 2005a) [29].

1.3.2.4. Các dụng cụ sử dụng cho thủy tinh hóa.

Cho đến nay, nhiều dụng cụ được phát triển nhằm tối ưu hoá hiệu quả trữ lạnh. Có hai hệ thống trữ lạnh gồm: hệ thống hở và hệ thống kín. Các mẫu trữ lạnh được tiếp xúc trực tiếp hoặc gián tiếp với ni-tơ lỏng, tuy nhiên, phải đảm bảo tốc độ đông lạnh và rã đông nhằm hạn chế những tổn thương lạnh cho tế bào.

Bảng 1.1: Một số dụng cụ được sử dụng phổ biến tại các trung tâm TTON trên thế giới

LOẠI DỤNG CỤ	DUNG TÍCH	TỐC ĐỘ HẠ NHIỆT
CRYOLOOP	>1 µl	20.000°C/min
HEMI-SATRAW	>1 µl	>20.000°C/min
CRYOLEAF	>1 µl	23.000°C/min
VITRI-INGA	1 µl	20.000°C/min
CVM-RING	>1 µl	10.000°C/min
VITRISAFE	>1 µl	1.300°C/min
HSS	0,5µl	2.000°C/min
0,25 ML STRAW	25µl	2.500°C/min
OPS	1 µl	16.700°C/min
CRYOTOP	0,1 µl	23.000°C/min
CRYOTIP	1 µl	12.000°C/min
RAPID-I	0,5 µl	1.200°C/min
CRYOPETTE	1,2 µl	23.700°C/min
ULTRAVIT	0,2 µl	250.000°C/min

Hệ thống mở

1. Cọng rạ hở (open pulled straw)

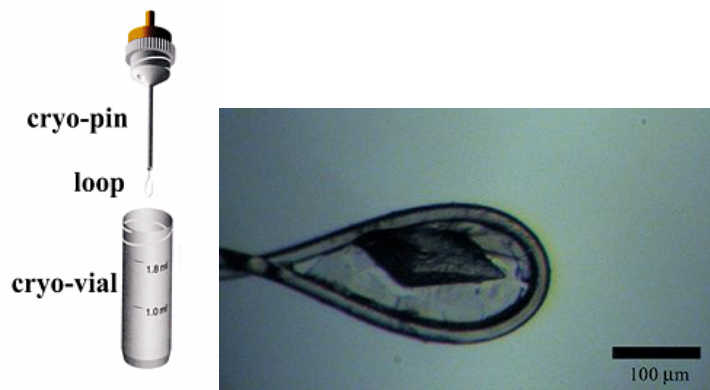
Cọng rạ hở được thiết kế bởi G Vajta (1998) [30]. Cọng rạ chuẩn 0,25mL được làm nóng và kéo dài để giảm độ dày và đường kính khoảng $\frac{1}{2}$ so với ban đầu và được cắt tại điểm hẹp nhất hoặc được sử dụng cọng rạ với kích thước nhỏ sẵn có. Tiệt trùng có thể thực hiện bằng khí hoặc chiếu xạ. Sau khi cân bằng với môi trường trữ lạnh, mẫu trữ lạnh được đặt vào một giọt môi trường nhỏ (khoảng 1 μ L). Người thực hiện chạm đầu nhỏ của cọng rạ vào nitơ lỏng để đông lạnh. Khi rã đông, cọng rạ được nhúng trực tiếp vào môi trường 37°C. Do không khí bên trong giãn nở, mẫu trữ lạnh được đẩy xuống môi trường.

Cọng rạ hở đảm bảo quá trình đông lạnh diễn ra cực nhanh, không làm hình thành tinh thể đá. Thể tích môi trường thủy tinh hoá giảm đáng kể so với việc sử dụng cọng rạ tiêu chuẩn. Tốc độ làm lạnh và rã đông rất nhanh, đạt đến 20.000°C/phút. Thời gian tiếp xúc với chất bảo vệ lạnh của tế bào rất ngắn (ngắn hơn 30 giây). Sử dụng cọng rạ hở làm giảm khả năng tổn thương lạnh do độc tính của CPA và sự thay đổi của áp suất thẩm thấu. Cọng rạ hở có thể tích 0,25 μ L với một đầu được kéo lỏng bằng nhiệt. Thiết kế làm tăng tỉ lệ S/V (diện tích bề mặt/ thể tích), đẩy nhanh tốc độ làm lạnh của giọt môi trường chứa phôi.

Cryoloop

Dụng cụ cryoloop gồm một vòng nylon nhỏ (đường kính 0,5-0,7mm) gắn một que thép cố định với nắp của một cryovial. Khi mẫu trữ lạnh được cân bằng với môi trường, các cryoloop được nhúng vào môi trường thủy tinh hoá, một màng mỏng môi trường được tạo thành trên vòng nylon. Mẫu được đặt lên màng mỏng sau đó được nhúng vào nitơ lỏng. Vì thể tích môi trường còn lại xung quanh trứng/phôi rất ít và nó được tiếp xúc trực tiếp với nitơ lỏng nên tốc độ làm lạnh có thể đạt đến 700.000°C. Khi rã đông, cryoloop được

nhúng trực tiếp vào môi trường rã đông. Trứng/phôi dễ dàng rơi ngay vào trong môi trường.

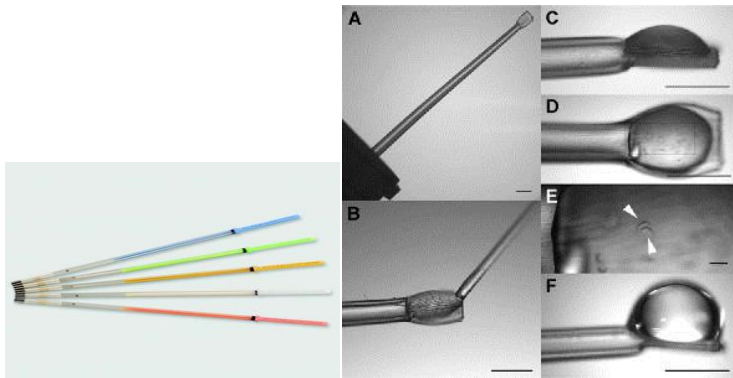


Hình 1.6. Cryoloop

Cryotop

Cryotop được sáng chế năm 1999 (Kitazato Supply Co, Fujinomiya, Nhật Bản), bởi Massashigue Kuwayama [31]. Là một hệ thống mở, trứng/phôi được đặt trong một thể tích rất nhỏ với môi trường ($<0,1 \mu\text{L}$) và được đặt lên đỉnh của một dải polypropylene ($0,4 \times 20 \times 0,1\text{mm}$) gắn liền với một tay cầm nhựa. Trứng /phôi được nhúng trực tiếp vào ni-tơ lỏng ngay sau khi được đặt lên cryotop. Tốc độ làm lạnh đạt đến $23.000^\circ\text{C}/\text{phút}$. Cryotop được đóng bằng một nắp nhựa dài 3cm để bảo vệ trong quá trình trữ lạnh. Khi rã đông, cryotop tháo nắp trong ni-tơ lỏng, nhúng trực tiếp cryotop vào môi trường rã. Tốc độ đông có thể đạt đến $42.100^\circ\text{C}/\text{phút}$. Phương pháp này cho thấy tỉ lệ sống trên 88% sau khi rã đông.

Phương pháp cryotop đã được chứng minh là hiệu quả cao khi trữ lạnh trứng so với cọng rạ hờ OPS, tỉ lệ thụ tinh và phát triển thành phôi nang được cải thiện hơn hẳn (Morato và cs., 2008) [32].



Hình 1.7. Cryotop

Cryotec

Cryotec là phương pháp thuỷ tinh hoá mới, được Dr. Masashige Kuwayama giới thiệu năm 2012 [33]. Với nhiều cải tiến trong qui trình, thành phần môi trường, dụng cụ trữ lạnh, cho hiệu quả trữ lạnh cao đối với trứng và phôi ở bất kì giai đoạn phát triển nào. Dụng cụ được sử dụng được sử dụng là cryotec, tương tự như cryotop, cryotec là một dải nhựa mỏng được gắn trực tiếp với một tay cầm, có nắp bảo vệ trong quá trình trữ lạnh để đảm bảo an toàn. Đĩa trữ lạnh cũng được sử dụng riêng, không có điễm mù trong các giếng, hạn chế nguy cơ mất mẫu trong khi trữ lạnh. Tốc độ làm lạnh của cryotec đạt đến 23.000°C/phút; để đảm bảo tốc độ này, cryotec được nhúng vào ni-tơ lỏng và di chuyển liên tục theo chiều thẳng đứng. Đóng nắp bảo vệ trong ni-tơ lỏng. Khi rã đông, nắp bảo vệ được gỡ bỏ và nhúng đầu cryotec vào môi trường 37°C. Tốc độ rã đông đạt đến đến 42.000°C/phút.



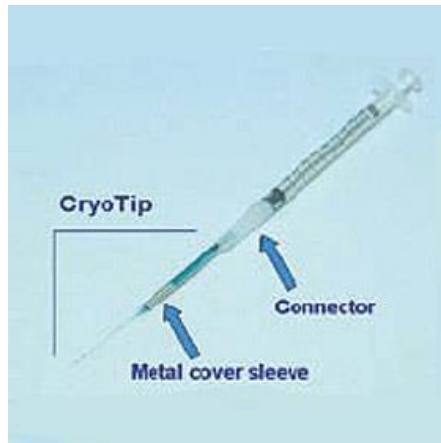
Hình 1.8. Cryotec

Dựa trên phương trình của Yavin và Arav, thể tích môi trường thủy tinh hoá đóng một vai trò quan trọng trong tỉ lệ thành công của thủy tinh hoá. Nếu thể tích đủ nhỏ, ảnh hưởng chính, trực tiếp lên kết quả thủy tinh hoá là tốc độ đông lạnh và rã đông, các yếu tố khác là như nhau. Các dụng cụ trong hệ thống hở đều tiếp xúc trực tiếp với ni-tơ lỏng nên sự đông lạnh không bị cản trở bởi lớp bảo vệ. Tốc độ rã đông không ảnh hưởng bởi dụng cụ trữ lạnh vì mẫu trữ luôn tiếp xúc trực tiếp với môi trường rã đông 37°C. Khi so sánh hiệu quả trữ lạnh trứng bằng cryotop và cryotip, Kuwayama kết luận tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi và tỉ lệ thai không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 hệ thống kín và hở [33]. Tùy vào điều kiện phòng thí nghiệm và tay nghề của người thực hiện, mỗi trung tâm sẽ chọn dụng cụ trữ thích hợp với điều kiện hiện có.

2. Hệ thống kín

Cryotip

Cryotip là dụng cụ trữ lạnh thuộc hệ thống kín, gồm một cọng rạ nhỏ (đường kính trong 250µm, thành dày 20 µm, dài 3cm), nối liền với một phần dày hơn (đường kính trong 200 µm, thành dày 150 µm, dài 4,5cm). Trứng/phôi được đặt vào đầu nhỏ của cryotip cùng với môi trường không quá 1 µL. Sau đó được hàn kín và nhúng vào ni-tơ lỏng. Tốc độ đông lạnh: 12.000°C/phút, tốc độ rã đông: 24.000°C/phút [33].



Hình 1.9. Cryotip

HSV straw

Phôi sẽ được đặt vào đoạn cuối mặt cắt của ống microcapillary, với thể tích môi trường chứa phôi ít ($<0,5 \mu\text{L}$); sau đó, ống microcapillary được cho vào straw và được hàn ở một đầu. Straw sau đó sẽ được nhúng vào nitơ lỏng.



Hình 1.10. HSV straw

Rapid-i

Rapid-I được thiết kế một lỗ hở trên bề mặt, phôi sẽ được load vào lỗ hở đó với lượng môi trường tối thiểu. Sau khi phôi được load, nhanh chóng cho rapid-I vào straw đã được làm lạnh trước đó và hàn straw ở một đầu. Tốc độ làm lạnh khi sử dụng rapid-I là 1,220°C/phút và tốc độ rã đông đạt 7,700°C/phút.



Hình 1.11. Rapid-I

Hiệu quả sử dụng hệ thống trữ lạnh kín hoặc hở

Vào những năm 1990, những lo ngại về việc lây truyền bệnh khi sử dụng kỹ thuật trữ lạnh bằng phương pháp thủy tinh hoá bắt đầu nổi ra, các nhà sản xuất bắt đầu đưa hệ thống trữ lạnh kín và hở lên bàn cân, tuy nhiên cho đến nay, số lượng nghiên cứu RCT về vấn đề này vẫn rất hiếm hoi và hiện tại, chưa có một nghiên cứu đa trung tâm nào thực hiện.

Vào năm 2013, xuất hiện 2 bài báo của cùng một nhóm tác giả đã xuất bản khi tiến hành nghiên cứu RCT về hiệu quả trữ lạnh phôi blastocyst và noãn khi sử dụng hệ thống trữ lạnh kín và hở [34]. Nghiên cứu này cho thấy không có sự khác biệt giữa 2 hệ thống này về tất cả các thông số ghi nhận, kể cả tỉ lệ trẻ sinh ra. Riêng đối với trữ noãn, tỉ lệ sống của noãn thấp hơn có ý nghĩa thống kê khi sử dụng hệ thống kín so với hệ thống hở.

Theo như nhận định của một nhóm tác giả, hầu hết các trung tâm hỗ trợ sinh sản thường sử dụng hệ thống hở khi trữ phôi và đại đa số các trung tâm đều sử dụng thành công hệ thống này. Một số trung tâm cũng đưa vào thử nghiệm khi sử dụng hệ thống kín, tuy nhiên, kết quả lại không như mong đợi. Cho đến nay, vẫn chưa có đủ chứng cứ chứng minh hiệu quả tối ưu mang lại từ hệ thống kín; 13 trẻ sinh sống và 20 trường hợp thai tiến triển là con số quá ít ỏi mà các nghiên cứu này công bố, trong khi hiện nay trên toàn thế giới, hàng chục nghìn trẻ ra đời khi sử dụng hệ thống trữ lạnh hở.

1.3.2.5. Quy trình thực hiện.

Quy trình làm lạnh và rã đông trong thủy tinh hóa tương đối đơn giản và ít mất thời gian hơn so với hạ nhiệt độ chậm.

Quá trình làm lạnh bao gồm hai giai đoạn:

- (1) Giai đoạn cân bằng: nồng độ CPA chiếm 20-50% so với môi trường thủy tinh hoá, thời gian tiếp xúc 5-15 phút (tùy từng phác đồ) đảm bảo loại nước khỏi tế bào và CPA sẽ đi vào tế bào thay thế nước.
- (2) Giai đoạn thủy tinh hoá: nồng độ CPA cao (3-6M), thời gian tiếp xúc trong vòng khoảng 1 phút giúp nước được loại bỏ hoàn toàn triệt để.

Tế bào làm lạnh tối ưu ($>20.000^{\circ}\text{C}$, tùy phác đồ và dụng cụ bảo quản) cho phép nước ra khỏi tế bào nhanh chóng vượt qua giai đoạn nhiệt độ nhạy cảm dễ dẫn đến tổn thương tế bào (15° đến -5°C), đặc biệt là với tế bào có hàm lượng lipid cao như noãn và phôi trước giai đoạn nén.

Sau khi tiếp xúc với dung dịch chứa hỗn hợp CPA ở nồng độ cao trong thời gian trung bình 10-15 phút, tế bào được đặt lên các dụng cụ chứa và nhúng trực tiếp vào ni-tơ lỏng mà không phải trải qua giai đoạn hạ nhiệt.

Rã đông

Quá trình rã đông diễn ra gần như tương tự hạ nhiệt độ chậm, dù tốc độ làm ấm cao hơn. Thông thường, mẫu tế bào trước khi rã đông nên được giữ trong không khí khoảng 1-3 giây để hạn chế các thương tổn cho tế bào do sự

thành lập của các bóng khí. Nếu hệ thống kín được sử dụng thì mẫu thử được nhúng vào bể nước ấm, trong khi đối với hệ thống mở, mẫu thử được nhúng trực tiếp vào môi trường ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, mẫu thử cũng được cho tiếp xúc với các loại môi trường rã đông với nồng độ CPA giảm dần để loại CPA và đưa tế bào về điều kiện sinh lý. Toàn bộ quá trình rã đông thường kéo dài khoảng 15-20 phút.

Khi rã đông, nước chuyển từ trạng thái rắn sang lỏng, làm giảm áp suất thẩm thấu ngoại bào nhanh chóng, gây áp lực thẩm thấu lên màng tế bào. Nếu CPA không khuếch tán ra khỏi tế bào nhanh chóng, mà nước đi vào tế bào quá nhanh sẽ gây vỡ tế bào. Hiện tượng tái hình thành tinh thể đá có thể xảy ra bên trong tế bào khi nhiệt độ dưới 0°C, do đó, tốc độ rã đông cũng cần phải phù hợp để giúp tế bào vượt qua khoảng nhiệt độ này. Tuy nhiên trong đông lạnh, nếu tốc độ rã đông nhanh thì nước sẽ không đủ thời gian để trở lại tế bào, dẫn đến màng tế bào bị co mà không thể hồi phục; còn nếu tốc độ rã đông chậm, tế bào phải tiếp xúc với CPA lâu, dễ dẫn đến gây độc cho tế bào. Giải pháp cho vấn đề này là sử dụng nồng độ CPA cao không thấm qua màng trong giai đoạn rã để hạn chế hiện tượng sốc thẩm thấu trên.

1.3.2.6. Ưu và nhược điểm của phương pháp thủy tinh hóa.

Với thủy tinh hóa, một trong những nguyên nhân chính gây tổn thương tế bào là sự hình thành tinh thể đá nội, ngoại bào được ngăn ngừa một cách hoàn toàn do nồng độ CPA sử dụng rất cao nên tế bào được khử nước triệt để. Các nghiên cứu cho thấy tỉ lệ sống của tế bào sau rã đông cao hơn hẳn so với hạ nhiệt độ chậm. Bên cạnh đó, hiệu quả vượt trội của thủy tinh hóa trong cải thiện tỉ lệ thai lâm sàng với các chu kỳ chuyển phôi trữ hay trữ lạnh nõn cũng được xem là một ưu điểm của kỹ thuật này (Kuwayama và cs, 2005, 2007, Vajta và Nagy, 2006; Loutradis và cs., 2008; Cobo và cs., 2010; Rudick và cs., 2010) [29], [31], [10], [35], [36], [37]. Ngoài ra, thời gian cho một chu trình đông lạnh - rã đông trong thủy tinh hóa được rút ngắn rất nhiều, đây là một thuận lợi cho những trung tâm có số chu kỳ điều trị lớn. Bên cạnh đó,

việc không cần sử dụng các thiết bị hạ nhiệt độ theo chương trình có kiểm soát còn giúp các trung tâm tiết kiệm chi phí đầu tư ban đầu cũng như các chi phí bảo dưỡng định kỳ.

Tuy nhiên, một số ý kiến lo ngại việc triển khai thường quy phương pháp thủy tinh hóa để thay thế hoàn toàn phương pháp hạ nhiệt độ chậm có thể có một số nguy cơ, trong đó tiếp xúc trực tiếp với ni-tơ lỏng của mẫu trữ được chú ý nhiều nhất. Như đã đề cập, tốc độ hạ nhiệt cao trong thủy tinh hóa có thể đạt được bằng cách sử dụng các dụng cụ chứa mẫu trữ chuyên biệt và nhúng trực tiếp vào ni-tơ lỏng. Trong khi đó, ni-tơ lỏng dùng trong các vật dụng tiếp xúc và các thao tác trong labo thường không mang tính vô trùng tuyệt đối. Việc lây nhiễm chéo giữa các mẫu trong quá trình lưu trữ cũng đã được ghi nhận (Vajta và Nagy, 2006) [10]. Tuy nhiên, sự ra đời của hệ thống kín (closed system) trong thủy tinh hóa như cryotip [35] hay cryopette (Keskinetepe và cs.,...2009) [38] đã phần nào giải quyết các mối lo ngại trên.

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

1. Diện tích bề mặt: noãn có diện tích bề mặt/ thể tích tế bào lớn hơn so với phôi giai đoạn phân chia, phôi lại có diện tích bề mặt/ thể tích tế bào khác biệt so với tinh trùng. Do đó, noãn và phôi cần nhiều thời gian hơn để đạt được trạng thái cân bằng thẩm thấu trong môi trường chứa CPA so với tinh trùng.

2. Thay đổi về thể tích tế bào: thay đổi đột ngột thể tích tế bào trong suốt quá trình trữ lạnh / rã đông thường là nguyên nhân trực tiếp gây nên các tổn thương và làm tế bào trở nên nhạy cảm hơn dẫn đến stress. Quá trình cân bằng cần được thực hiện nhằm hạn chế tối thiểu các biến đổi lớn về thể tích tế bào, đồng thời hạn chế tối đa việc tế bào tiếp xúc với các chất độc.

3. Nhiệt độ làm lạnh: mức độ làm lạnh tối ưu phụ thuộc vào dạng tế bào, loại và nồng độ CPA. Tương tự như vậy, mức độ rã đông cũng phụ thuộc vào dạng và nồng độ CPA, ngoài ra, thêm một trong những yếu tố sinh lý khác chính là tỉ lệ bề mặt tế bào/ thể tích tế bào, sự xâm nhập của nước và cuối

cùng là năng lượng hoạt hoá Arrhenius (phương trình Arrhenius mô phỏng các phản ứng phụ thuộc vào nhiệt độ). Mức độ làm lạnh/ rã đông đôi khi phù hợp với dạng tế bào này, nhưng có khi lại không phù hợp và gây hại cho các dạng tế bào khác.

4. Thẩm thấu: khi tiến hành trữ đông, các tế bào thường phải đáp ứng lại với các biến đổi lớn về thể tích tế bào dưới áp lực thẩm thấu tạo bởi nồng độ dịch ngoại bào.

5. Thời gian: được nhắc đến ở đây chính là tổng thời gian tiếp xúc với chất bảo quản đông lạnh trước khi nhúng tế bào vào nitơ lỏng.

6. Dụng cụ sử dụng.

7. Kỹ năng và kinh nghiệm của chuyên viên phối hợp.

Ba yếu tố chính ảnh hưởng đến sự thành công của phương pháp thủy tinh hoá (Yahin và Arav, 2007) [11]:

- Tốc độ làm lạnh, tốc độ rã đông.
- Độ nhớt của môi trường, phụ thuộc vào thành phần của môi trường trữ lạnh.
- Thể tích mẫu trữ lạnh.

Mối liên hệ của các yếu tố trên được thể hiện trong phương trình sau (Yahin và Arav, 2007) [11]:

Xác suất thành công = Tốc độ làm lạnh và rã đông \times Độ nhớt / Thể tích

Tăng tốc độ làm lạnh/ rã đông, tăng độ nhớt môi trường trữ lạnh và giảm thể tích môi trường sẽ nâng cao khả năng thành công của thủy tinh hoá.

- Khi giảm thể tích môi trường sẽ làm tăng tốc độ làm lạnh, tế bào tiếp xúc ít với môi trường thủy tinh hoá với nồng độ cao trong thời gian dài, làm giảm độc tính do CPA gây ra cho tế bào.

- Giảm thể tích môi trường sẽ giảm được lượng nước có trong môi trường, hạn chế được sự hình thành của những tinh thể đá ngoại bào cũng như nội bào. Tăng tỉ lệ thành công của thủy tinh hoá.

- Trong môi trường thủy tinh hoá gồm có pha lỏng và pha khí. Khi đông lạnh, pha lỏng sẽ bị đông lại, pha khí sẽ không bị đông, hình thành những bọt khí nhỏ trong môi trường; khi rã đông, nhiều bọt khí sẽ gom lại thành một bọt

khí lớn, có thể phá vỡ màng tế bào. Việc hạn chế thể tích môi trường, sẽ làm giảm pha khí trong môi trường, làm giảm tối thiểu bọt khí hình thành.

Để đạt được các yêu cầu trên, dụng cụ và môi trường trữ lạnh có vai trò lớn trong việc gia tăng hiệu quả của một qui trình trữ-rã đông.

1.4.2. Tuổi của người vợ.

Tuổi của người vợ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới kết quả có thai. Tuổi càng cao thì tỷ lệ có thai càng giảm, đặc biệt sau tuổi 40. Theo nghiên cứu của J.X.Wang ở Australia tỷ lệ có thai lâm sàng của phụ nữ chuyển phôi đông lạnh <40 tuổi là 16,4% cao hơn đáng kể so với tỷ lệ có thai lâm sàng của phụ nữ chuyển phôi đông lạnh ở tuổi 40-44 là 7,5% [39]. Tương tự, theo P-O Karlstrom (1997) tỷ lệ này là 19% và 5% với ($p < 0,01$) [40]. Theo tác giả Maryam Eftekhari (2014) tỷ lệ mang thai sau khi FET ở phụ nữ trong độ tuổi <35 là 57,7%; Ngược lại, tỷ lệ mang thai ở những bệnh nhân ở độ tuổi > 35 là 29,2%. Phân tích thống kê cho thấy rằng phụ nữ trẻ <35 tuổi và nhóm từ 35-40 tuổi có một sự khác biệt đáng kể trong tỷ lệ có thai sau FET ($p < 0,0001$) [41].

Cho đến nay người ta cho rằng tỷ lệ thành công giảm chủ yếu do giảm chất lượng và số lượng trứng có được khi kích thích buồng trứng [42]. 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 [43],[44].

Y văn thế giới cho thấy chương trình cho trứng rất hiệu quả đối với các BN lớn tuổi. Đặc biệt, Paulson và cộng sự, năm 1997 đã báo cáo thành công ở một trường hợp 63 tuổi và đây được ghi nhận là trường hợp phụ nữ lớn tuổi nhất trên thế giới có thai bằng kỹ thuật xin trứng – TTON [45].

Các bằng chứng khoa học hiện nay xác nhận từ cung người có thể duy trì khả năng mang thai rất lâu sau khi mãn kinh nếu được sự hỗ trợ của nội tiết ngoại sinh giúp NMTC phát triển thích hợp cho sự làm tổ và phát triển của phôi [45],[46].

1.4.3. Nguyên nhân vô sinh

Theo J.X. Wang (2001) và cs nhóm BN <40 tuổi chuyển phôi đông lạnh bị tắc vòi tử cung có tỷ lệ làm tổ là 8,2% thấp hơn đáng kể so với các nhóm nguyên nhân khác 10,2% [39].

Theo Maryam Eftekhar (2014) thì không có sự khác biệt về tỷ lệ có thai giữa các nhóm nguyên nhân vô sinh [41].

Formatted: Font: 12 pt

1.4.4. Kỹ thuật hỗ trợ.

Theo Hu và cs (1999) tỷ lệ làm tổ sau chuyển phôi đông lạnh ở BN được hỗ trợ thụ tinh bằng kỹ thuật ICSI là 18% cao hơn hẳn ở BN chuyển phôi đông lạnh sau chu kỳ IVF thông thường là 9,1% [47].

Theo Maryam Eftekhar (2014) thì không có sự khác biệt về tỷ lệ có thai giữa nhóm BN được hỗ trợ thụ tinh bằng kỹ thuật ICSI với chu kỳ IVF cổ điển [40].

Formatted: Font: 12 pt

1.4.5. Thời gian bảo quản phôi.

Theo các tác giả Machtinger (2002) [48], Fogarty (2000) [49] thời gian bảo quản không ảnh hưởng tới thời gian sống của phôi. A Revel (2004) [50] báo cáo một trường hợp phụ nữ 39 tuổi, đó sinh đôi sau khi chuyển phôi trữ lạnh 12 năm.

Theo Nguyễn Thị Minh và cs [51] làm tại trung tâm Hỗ Trợ Sinh Sản - bệnh viện Phụ Sản Trung Ương, tỷ lệ phôi còn nguyên vẹn sau rã đông của phôi độ 3 trước khi đông và kết quả có thai giữa thời gian bảo quản phôi dưới 12 tháng và 12-22,5 tháng là không có sự khác biệt.

1.4.6. Tuổi phôi trước đông.

Đã có rất nhiều nghiên cứu so sánh kết quả sau chuyển phôi đông lạnh ở các tuổi phôi khác nhau: giai đoạn tiền nhân, giai đoạn phân chia sớm, giai đoạn phôi nang. Phần đông các tác giả đều báo cáo rằng đông phôi giai đoạn tiền nhân có tỷ lệ sống sau rã đông cao nhất. Tuy nhiên, tỷ lệ làm tổ và có thai lâm sàng liên quan với tuổi phôi trước đông ở các nghiên cứu khác nhau là rất khác nhau.

- **Đông phôi giai đoạn tiền nhân:**

Nhiều trung tâm có xu hướng đông lạnh phôi giai đoạn tiền nhân để tránh chọn lựa phôi. Đặc biệt nh ở Đức hay Thụy Sĩ theo luật Bảo vệ phôi chỉ cho phép đông phôi giai đoạn tiền nhân Schroder AK. (2003) [52].

Đông phôi giai đoạn tiền nhân là biện pháp được nhiều trung tâm chọn lựa khi cần đông phôi toàn bộ của những bệnh nhân có nguy cơ quá kích buồng trứng (QKBT). Nghiên cứu hồi cứu ngẫu nhiên của Ferraretti (1999), [53] phân tích trên 125 bệnh nhân có nguy cơ QKBT, có $E2 \geq 1500$ vào ngày tiêm HCG và có ≥ 15 noãn. Số bệnh nhân này được chia làm 2 nhóm: nhóm chứng A: $n = 67$, chuyển phôi tươi; nhóm B: $n = 58$, đông phôi toàn bộ ở giai đoạn tiền nhân. Kết quả cho thấy tỷ lệ có thai (PR) của nhóm A là 46,3%, nhóm B là 48,3%; Tỷ lệ sinh sống (live birth rate = LBR) của nhóm A là 38,8%, nhóm B là 39,6%. Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Hơn nữa, ở nhóm B không có QKBT trong khi nhóm A có 4 trường hợp triệu chứng QKBT tăng.

Có nhiều nghiên cứu đưa ra ưu thế của đông phôi giai đoạn tiền nhân so với các giai đoạn khác.

Theo nghiên cứu của Senn A (2000), trên 382 bệnh nhân chia làm 3 nhóm: nhóm 1: đông phôi giai đoạn tiền nhân, nhóm 2: đông phôi giai đoạn phân chia sớm, nhóm 3: 89 bệnh nhân không đông phôi được do phôi phát triển kém, kết quả là tỷ lệ có thai (PR) và tỷ lệ sinh sống (LBR) sau chuyển phôi tươi giống nhau ở các nhóm. Tuy nhiên, tỷ lệ làm tổ (IR) và tỷ lệ có thai (PR) sau chuyển phôi đông lạnh (FET) ở nhóm 1 cao hơn rõ rệt nhóm 2: 10,5% so với 5,9%; 19,5% so với 10,9% ($P \leq 0,2$) [54].

Tương tự, A.Demoulin (1991), khi rã đông 494 phôi ở giai đoạn tiền nhân và 492 phôi giai đoạn phân chia nhiều tế bào cho thấy: tỷ lệ phôi đạt tiêu chuẩn để chuyển là 54% và 47%, PR và IR là 17,9% và 10,7% so với 5,5% và 4,7% [55].

Nghiên cứu của Salumets A. (2003), trên 4006 phôi và 1657 chu kỳ rã đông cho kết quả: Tỷ lệ sống (SR) cao nhất ở nhóm đông phôi giai đoạn tiền nhân (86,5%), tiếp theo là phôi ngày 2 (61,7%), cuối cùng là ngày 3 (43,1%) [56].

Đặc biệt, nghiên cứu của Veek LL. (1999), trên 776 chu kỳ chuyển phôi đông lạnh và 2039 phôi rã đông đã nhận thấy tỷ lệ có thai sau chuyển phôi tiền nhân đông lạnh so với chuyển phôi tươi là như nhau [57].

Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác như nghiên cứu của Amarine ZO 2004, [58] hoặc nghiên cứu của Horne, G và cs (1997), [59] lại đưa ra kết luận là tỷ lệ sống của phôi sau rã đông và tỷ lệ có thai sau chuyển phôi đông lạnh của phôi giai đoạn tiền nhân và giai đoạn phân chia sớm cũng không có gì khác biệt.

*** Đông phôi giai đoạn phân chia sớm:**

Một trong những ảnh hưởng xấu nhất của quá trình đông lạnh và rã đông là làm thoái hoá những tế bào của phôi ở giai đoạn phân chia sớm Edgar, D. H. 2000 [60].

Các nghiên cứu trên phôi đông lạnh - rã đông giai đoạn phân chia sớm cho thấy phôi có khả năng sống khi còn giữ được ít nhất một nửa số tế bào còn nguyên trong phôi sau rã đông. Tỷ lệ phôi sống (SR) sau rã đông khoảng 50 - 80%. Tỷ lệ sống cao nhất khi phôi trước đông có hình thái bình thường, không có mảnh vỡ (fragment) và các tế bào đồng đều (Mandelbaum 1994, [61], Testart và cs., Kartrum và cs. 2003 [trích dẫn từ 57]).

Đối với những phôi có tỷ lệ mảnh vỡ chiếm hơn 50% thì không nên đông lạnh vì tỷ lệ thoái hóa sau rã đông sẽ rất cao. Khả năng sống của phôi còn phụ thuộc vào sự phân chia tiếp của tế bào. Cũng có nhiều ý kiến cho rằng tỷ lệ sống sót giảm khi đông phôi có số tế bào tăng (Harthorne và cs., Lassalle và cs.) [trích dẫn từ 57].

Tuy nhiên, nghiên cứu của Christophe Sifer. 2006, [62] khi so sánh đông lạnh phôi ngày 2 và ngày 3 cho thấy tỷ lệ phôi sống sau rã đông không khác nhau nhưng tỷ lệ làm tổ và có thai lâm sàng của ngày 3 tốt hơn ngày 2. Trái lại, theo Salumets A 2003, [56] tỷ lệ sống sót thấp và tỷ lệ sảy thai tăng đã làm giảm hiệu quả của nhóm chuyển phôi đông lạnh ngày 3 so với ngày 1 và ngày 2. Theo tác giả này tỷ lệ sảy thai tăng sau chuyển phôi đông lạnh ngày 3 có thể do sự phá hủy tế bào trong quá trình đông phôi và rã đông.

Ngoài ra, lại có nghiên cứu cho thấy tỷ lệ sống của phôi ngày 3 cao hơn ngày 2 nhưng tỷ lệ có thai không có gì khác biệt [63], [64]. Tóm lại, các nghiên cứu so sánh giữa đông phôi ngày 2 và ngày 3 có kết quả rất khác nhau.

*** Đông phôi giai đoạn phôi nang (blastocyst):**

Ở nhiều nước trên thế giới, luật pháp chỉ cho phép chuyển tối đa 3- 4 phôi để tránh đa thai [65].

Hơn nữa, một số bang ở Mỹ và nhiều nước ở châu Âu chỉ cho phép chuyển 1- 2 phôi [66].

Vì vậy, việc nuôi cấy và chọn lựa được phôi tốt nhất luôn luôn là mục tiêu để các trung tâm TTTON phấn đấu và hoàn thiện. Chỉ những phôi tốt và nuôi cấy trong môi trường tốt mới phát triển được thành phôi nang. Do đó, khi chỉ được chuyển 1- 2 phôi, các nhà chuyên môn có xu hướng muốn chuyển phôi nang để chọn lọc được những phôi tốt nhất và chọn được thời điểm chuyển phôi sinh lý hơn. Khi nuôi phôi đến giai đoạn phôi nang thì đương nhiên là sẽ có những trường hợp thừa phôi nang để đông phôi. Có rất nhiều nghiên cứu trên thế giới về đông phôi nang cho kết quả trái ngược nhau. Nói chung, những báo cáo gần đây cho thấy kết quả tốt hơn rất nhiều, có lẽ vì phương pháp đông phôi nang đã được hoàn thiện dần dần.

Nghiên cứu của Kostas, 2001[66] phân tích 560 phôi đông lạnh ở giai đoạn sớm (nhóm 1) và 444 phôi nang đông lạnh (nhóm 2) cho thấy SR ở phôi rã đông giai đoạn sớm là 89%, ở phôi nang rã đông là 56%. ở nhóm 1, tỷ lệ phôi phát triển tiếp đến phôi nang là 24,5%, tỷ lệ làm tổ (IR) là 20,6%, trong khi nhóm 2 tỷ lệ làm tổ (IR) là 5,3%.

Theo nghiên cứu mới đây của Lieberman và Tucker MJ (2006), [67] so sánh hai phương pháp phôi thủy tinh hoá và đông lạnh chậm trên phôi ngày 5 và 6 cho thấy phương pháp thủy tinh hoá có tỷ lệ sống của phôi sau rã đông rất khả quan.

Phương pháp này đã được nhiều trung tâm thụ tinh ống nghiệm áp dụng vì tính tiện lợi cũng như kết quả của nó cũng đang dần được khẳng định.

1.4.7. Số phôi được chuyển vào buồng tử cung.

Số phôi được chuyển vào buồng tử cung tăng thì khả năng có thai tăng lên, tuy nhiên, luôn kèm theo nguy cơ đa thai. Theo P-O Karlstrom: số phôi

được chuyển vào buồng tử cung là 3-2 phôi thì tỷ lệ có thai là 27%-23% cao hơn đáng kể so với tỷ lệ có thai là 14% khi chỉ chuyển được 1 phôi [68].

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

Chất lượng phôi chuyển là yếu tố quan trọng nhất quyết định sự thành công của các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản. Các chứng cứ đều cho thấy tỷ lệ có thai giảm khi chất lượng phôi chuyển kém. Tỷ lệ có thai giảm từ 53.8% ở bệnh nhân có ít nhất một phôi tốt (TQE – top quality embryo) xuống 23,6% ở bệnh nhân không có TQE.

Kết quả của một nghiên cứu trước đây tại trung tâm Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Phụ sản Trung ương trên 50 trường hợp chuyển phôi đông lạnh không ghi nhận trường hợp có thai nào ở nhóm bệnh nhân chuyển phôi kém (phôi độ 1) [69].

Tương tự như vậy, Đặng Quang Vinh và cs. (2005) cũng đã đưa ra nhận xét các trường hợp chuyển phôi đông lạnh có thai khi có ít nhất một phôi chất lượng tốt được chuyển trả vào buồng tử cung [70].

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh và cs. (2006) với 192 chu kỳ chuyển phôi cũng cho thấy tỷ lệ có thai giảm khi chất lượng phôi giảm. Với những trường hợp có ít nhất hai phôi tốt (phôi độ 3), có phân chia tiếp để chuyển: kết quả có thai đạt 46,9%, cao hơn các trường hợp chỉ có một phôi tốt để chuyển (34,4%) và tỷ lệ có thai giảm rõ khi bệnh nhân chỉ có phôi chất lượng trung bình (phôi độ 2) để chuyển (25%). Đặc biệt, tỷ lệ có thai giảm đáng thất vọng chỉ còn 8,3% (1/12) ở những bệnh nhân chuyển các phôi độ 1 nói chung và thậm chí không có trường hợp có thai nào ở nhóm bệnh nhân chỉ có phôi độ 1 mà tỷ lệ mảnh vỡ > 50%. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) [51].

Nghiên cứu của John F Payne và cs. (2005) cũng cho thấy tỷ lệ có thai tăng khi số phôi tốt tăng. Tỷ lệ có thai khi có ≥ 2 phôi tốt là 42,9%; có 1 phôi tốt là 40%, không có phôi tốt nào là 26,1% [71].

Phan Thị Thanh Lan (2007) nghiên cứu 60 bệnh nhân sau chuyển phôi đông lạnh chậm: với 10 bệnh nhân có thai lâm sàng, thì trong số phôi chuyển vào buồng tử cung có ít nhất một phôi phân chia tiếp. Trái lại, với 16 bệnh

nhân, trong số phôi chuyển vào buồng tử cung không có phôi phân chia tiếp, đều không có thai [72].

Qua các nghiên cứu có thể thấy chất lượng phôi rất đóng vai trò then chốt đối với tỷ lệ có thai. Đánh giá đúng chất lượng phôi chuyển sẽ góp phần nâng cao tỷ lệ có thai đồng thời quyết định được số phôi chuyển để giảm tỷ lệ đa thai cho bệnh nhân.

1.4.9. Ảnh hưởng của kỹ thuật chuyển phôi.

Khảo sát ảnh hưởng của kỹ thuật chuyển phôi, theo Lê Thị Phương Lan – 2004 [69]: kết quả phân tích 868 trường hợp IVF/ICSI cho thấy tỷ lệ có thai giảm đáng kể từ 33.6% xuống 19.2% khi so sánh các trường hợp chuyển phôi dễ với chuyển phôi khó. Mansour (1994) cũng đưa ra kết luận tương tự với tỷ lệ 20% và 4% [73].

Nghiên cứu của Cem Ficicioglu và cs. (2005), [74] trên 1158 trường hợp chuyển phôi chia 3 nhóm: nhóm chuyển phôi dễ (827), nhóm chuyển phôi vừa (284), nhóm chuyển phôi khó (47). Kết quả tỷ lệ có thai của 3 nhóm trên lần lượt là 41,4%, 36,2% và 17% ($p < 0,05$ giữa nhóm 1 và 3, giữa nhóm 2 và 3; $p > 0,05$ giữa nhóm 1 và 2).

Nghiên cứu của Candido Tomas và cs. (2002), [75] cũng cho kết quả tương tự: tỷ lệ có thai của nhóm chuyển phôi dễ và chuyển phôi vừa là 30,3%; tỷ lệ có thai của nhóm chuyển phôi khó là 21,1% ($p = 0.0002$).

Tuy vậy, một số tác giả khác Noyes N (1999), [50] Tur-Kaspa (1998), [76] lại cho rằng chuyển phôi khó không ảnh hưởng hoặc chuyển phôi rất khó mới ảnh hưởng tới kết quả có thai.

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

1.4.10.1. Ảnh hưởng của độ dày nội mạc tử cung

Ảnh hưởng của độ dày nội mạc tử cung trên tỷ lệ mang thai ở những bệnh nhân FET đã được đánh giá bởi nhiều tác giả, với kết quả gây tranh cãi.

Một tổng quan hệ thống và phân tích gộp của Mazdak Momeni 2014, tổng kết 14 nghiên cứu báo cáo một nội mạc tử cung dày hơn đáng kể trong chu kỳ thụ thai so với chu kỳ không thụ thai [77].

Tuy nhiên, một số báo cáo bằng cách sử dụng siêu âm bụng đã cho kết quả trái ngược. Liu et al. báo cáo không có sự tương quan giữa độ dày nội mạc tử cung được đo bằng siêu âm bụng và kết quả mô học của nội mạc tử cung [78].

Một số tác giả thấy một tỷ lệ mang thai cao hơn ở độ dày nội mạc tử cung nhất định: El-Toukhy nhận thấy: khi đo vào ngày bổ sung progesterone, nếu độ dày NMTC đạt 9-14 mm thì tỷ lệ làm tổ và tỷ lệ có thai cao hơn so với độ dày NMTC 7-8 mm [79]. Singh nhìn vào độ dày nội mạc tử cung, mô hình và lưu lượng máu tiểu nội mạc tử cung cho thấy tỷ lệ mang thai cao hơn khi dòng máu đến nội mạc tử cung là ở khu vực III (khu hypoechogenic Inner xâm nhập mạch máu). Họ cũng tìm thấy rằng tỉ lệ có thai cao nhất với độ dày nội mạc tử cung từ 8-10 mm [80]. Chen lưu ý rằng: nếu hình ảnh nội mạc tử cung không ở dạng 3 lá thì ngay cả với một độ dày nội mạc tử cung vừa phải 7-14 mm đã có một ảnh hưởng bất lợi về kết cục thai kỳ [81]. Tác giả kết luận rằng khi nội mạc tử cung mỏng hơn (<8 mm) và không có hình ảnh 3 lá thì nên huỷ bỏ chu kỳ đó và bắt đầu lại.

Như vậy, những phát hiện này hỗ trợ tầm quan trọng của độ dày nội mạc tử cung, nhưng các yếu tố khác nên được xem xét.

Trong khi một số tác giả khác không thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa độ dày NMTC và tỷ lệ mang thai ở bệnh nhân FET. Check J.H 2004 với độ dày NMTC từ 7-14mm không ảnh hưởng kết quả có thai [82].

Các tác giả khác báo cáo một ngưỡng của <7mm và / hoặc > 14 mm được gắn liền với một sự giảm đáng kể tỉ lệ thụ tinh và mang thai. Lê.T.P.Lan & cs, 2004 không thấy trường hợp có thai nào trong nhóm bệnh nhân (BN) chuyển phôi đông lạnh khi NMTC<8mm [74]. C.POPE.2004 Tỷ lệ có thai tăng khi NM đạt 9-12mm.Tuy nhiên tình trạng NMTC quá dày (>14,5mm) cũng ảnh hưởng tới kết quả có thai [83].

Hiện không có cut-off kết luận giá trị của độ dày nội mạc tử cung được đưa ra để giúp các bác sĩ tư vấn ở các cặp vợ chồng về kết quả. Lý do cho sự tranh cãi như vậy có thể là do: trong các nghiên cứu, chỉ có một số lượng tương đối thấp các chu kỳ FET có bệnh nhân với hai đầu cực của độ dày nội mạc tử cung (quá mỏng <7mm, hoặc quá dày > 14mm). Tính không đồng nhất trong các nghiên cứu như: cách thức chuẩn bị NMTC, thời điểm sử dụng, cách thức siêu âm (âm đạo vs đường bụng), và sự khác biệt trong đánh giá thống kê, làm cho họ không thể đưa ra được đồng thuận về giá trị tiên đoán của độ dày nội mạc tử cung.

Mặc dù thực tế rằng: nhiều nghiên cứu điều tra độ dày nội mạc tử cung trong chu kỳ FET vẫn còn chưa biết liệu các độ dày nội mạc tử cung trung bình trong chu kỳ FET thành công là bao nhiêu. Tuy nhiên, các tác giả đều cho rằng: mặc dù có thể có một mối quan hệ giữa độ dày nội mạc tử cung và tỷ lệ mang thai, nhưng để xác định sự tiếp nhận của NMTC cần thêm nhiều phương pháp đánh giá phức tạp hơn là một số đo siêu âm duy nhất [84],[85],[86],[87],[88],[89].

1.4.10.2. Ảnh hưởng của các phương pháp chuẩn bị NMTC tới kết quả có thai

Theo các tác giả (J Family 2015, Simon A 1998) [84], [85]: Đặc điểm NMTC về độ dày và hình ảnh trên siêu âm giữa hai nhóm có sử dụng và không sử dụng GnRHa trước E2 + P4, để chuẩn bị NMTC cho chuyển phôi đông lạnh là không có sự khác biệt. Các nghiên cứu này cũng cho biết tỷ lệ có thai giữa 2 nhóm là tương đương.

Glujovsky D (2010), thực hiện một tổng quan hệ thống và phân tích gộp 20 nghiên cứu lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng cho biết: không có lợi ích đáng kể nào về NMTC cũng như cải thiện tỷ lệ có thai nếu sử dụng thêm GnRHa trước E2 + P4, để chuẩn bị NMTC cho chuyển phôi đông lạnh [86].

Sử dụng cả hai cơ sở dữ liệu MEDLINE và EMBASE một tổng quan hệ thống và phân tích gộp của Khoa Sản và Phụ khoa, Đại học Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, Hà Lan đã thực hiện.

Nghiên cứu so sánh tỷ lệ thai lâm sàng và tỷ lệ thai tiến triển cũng như tỷ lệ sinh sống ở 3 nhóm (i) theo dõi chu kỳ tự nhiên để chuyển phôi đông

lạnh (NC-FET) so với sử dụng nội tiết ngoại sinh E2+ P4 liều thay đổi (NC-FET), (ii) NC-FET so với chu kỳ E2 + P4 + GnRHa (AC-FET), (iii) AC-FET so với NC-FET. Kết quả tổng cộng 43 ấn phẩm được chọn để thẩm định và 20 bài báo được đưa vào đánh giá cuối cùng. Cả 3 so sánh trên đều thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ thai lâm sàng, tỷ lệ thai tiến triển hoặc tỷ lệ sinh sống. Kết luận dựa vào các tài liệu hiện nay không thể xác định một phương pháp chuẩn bị nội mạc tử cung trong FET là hiệu quả hơn hẳn về tỷ lệ có thai. Vì vậy, tất cả các phương pháp hiện hành chuẩn bị nội mạc tử cung xuất hiện đều có thể được áp dụng.

Ghobara T, (2008); tiến hành tìm kiếm ở các tạp chí CENTRAL, DARE, MEDLINE (1950-2007), EMBASE (1980-2007) và CINAHL (1982-2007), với tiêu chí lựa chọn là các nghiên cứu thử nghiệm ngẫu nhiên (RCT) so sánh các phác đồ chu kỳ khác nhau và các phương pháp khác nhau được sử dụng để chuẩn bị nội mạc tử cung trong FET trong hỗ trợ sinh sản. Mục tiêu: xác định xem có sự khác biệt trong kết quả giữa FET chu kỳ tự nhiên, FET chu kỳ kích thích buồng trứng và FET sử dụng nội tiết ngoại sinh (E2 +P4 và GnRHa + E2 + P4) hay không? Kết quả tổng như sau:

1. Sử dụng nội tiết ngoại sinh so với chu kỳ tự nhiên): so sánh này cho thấy không có sự khác biệt đáng kể trong kết quả nhưng vẫn còn khoảng tin cậy rộng, và sự khác nhau (OR CI 0,40 1,06, 95% đến 2,80, P 0,91) 0,2).
2. GnRHa + E2 + P4 so với E2 + P4: so sánh này cho thấy rằng tỷ lệ sinh sống trên một phụ nữ cao hơn đáng kể ở nhóm cũ (OR 0.38, 95% CI 0,17-0,84, P 0,02). Tỷ lệ có thai lâm sàng là cũng cao hơn nhưng không đáng kể như vậy (OR 0,76, KTC 95% 0,52-1,10, P 0,14).
3. E2 + P4 so với hormone kích thích nang (FSH).
4. E2 + P4 so với clomiphene
5. GnRHa + E2 + P4 so với clomiphene
Không có sự khác biệt về kết quả có thai khi so sánh các phác đồ trên.
6. Clomiphene + (HMG) so với HMG: tỷ lệ mang thai cao hơn đáng kể ở nhóm HMG (OR CI 0,46, 95% 0,23 đến 0,92). Cũng có những chu kỳ hủy ít hơn và tỷ lệ đa thai thấp hơn khi HMG được sử dụng mà không clomiphene nhưng không có ý nghĩa thống kê [87].

Tại thời điểm hiện tại không có đủ bằng chứng để khẳng định sử dụng phác đồ nào là tối ưu nhất hay có đủ bằng chứng để khuyến cáo bất kỳ một giao thức cụ thể nào để chuẩn bị NMTC cho chuyển phôi đông lạnh. Tuy nhiên, trong thực tế thực hành tại Việt Nam, phác đồ nội tiết ngoại sinh (E2 + P4) được sử dụng nhiều nhất bởi sự đơn giản trong theo dõi, chi phí thấp, và hiệu quả đạt được rất tốt.

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

Kỹ thuật hỗ trợ phôi thoát màng (AH) là một trong các kỹ thuật được áp dụng trong Hỗ trợ sinh sản nhằm mục đích giúp cho phôi thoát ra khỏi màng trong suốt dễ dàng hơn, qua đó làm tăng tỉ lệ làm tổ của phôi và tỉ lệ có thai trong Thụ tinh ống nghiệm (TTON).

Phôi trữ lạnh: Nhiều nghiên cứu đã khẳng định, quá trình trữ lạnh và rã đông phôi gây ảnh hưởng lên cấu trúc màng ZP, làm cho màng ZP trở nên cứng chắc, từ đó làm chậm và giảm khả năng của phôi thoát màng [87]. Theo đánh giá trên lâm sàng cho thấy, kỹ thuật hỗ trợ phôi thoát màng có hiệu quả nhất đối với các phôi rã đông sau trữ lạnh.

Các tác giả Check JH (1996) [82], Nguyễn Thị Liên Hương (2012) [88]: thấy tỷ lệ thai lâm sàng tăng lên rõ rệt khi hỗ trợ phôi thoát màng trước chuyển phôi trữ lạnh.

Theo tổng quan hệ thống và phân tích tổng hợp các thử nghiệm ngẫu nhiên có kiểm soát của tác giả Martins WP (2011) [89], hỗ trợ phôi thoát màng làm tăng xu hướng có thai lâm sàng cho bệnh nhân chuyển phôi đông lạnh (RR = 1,36; 95% CI = 1,08-1,72, p<0,01).

Như vậy, có rất nhiều yếu tố có thể ảnh hưởng tới kết quả chuyển phôi trữ lạnh. Mức độ ảnh hưởng của các yếu tố ở những nghiên cứu khác nhau là rất khác nhau. Nhưng phần lớn các tác giả đều công nhận 5 yếu tố: tuổi vợ, số lượng phôi, chất lượng phôi, độ dày niêm mạc ngày chuyển phôi và kỹ thuật chuyển phôi là ảnh hưởng nhiều nhất. Nghiên cứu tìm ra mức độ tương quan và giá trị tiên lượng cụ thể của 5 yếu tố trên là rất cần thiết.

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 chuyển 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 chuyển phôi.
- Đối tượng 2: BN trữ phôi thủy tinh hóa (không hạn chế tuổi chuyển 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 chuyển 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. Cỡ mẫu nghiên cứu

Cỡ mẫu được tính theo công thức nghiên cứu mô tả theo dõi dọc [90].

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

Trong đó:

n = Cỡ mẫu nghiên cứu

$Z_{(1-\alpha/2)}$ = 1,96 với Hệ số tin cậy 95% ($\alpha = 0,05$).

d = sai số tuyệt đối, chọn $d = 0,09$

Commented [M1]: cần tính theo cỡ mẫu khác

Formatted: Font: 14 pt

Field Code Changed

Field Code Changed

$p =$ 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].

Cỡ mẫu tối thiểu là 48 bệnh nhân cho nhóm đông chậm và 99 bệnh nhân cho nhóm thủy 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 thủy tinh hoá (với 162 bệnh nhân đông phôi ngày 3 và 162 bệnh nhân đông phôi ngày 2).

2.6. Phương pháp tiến hành và thu thập số liệu

Đối tượng 1: Quy trình đông chậm (phụ lục 1).

- Sau khi phôi tươi chất lượng tốt nhất được lựa chọn để chuyển phôi, những phôi dư đã được đánh giá chất lượng, chia đều 3 loại phôi: tốt, trung bình, xấu trên mỗi cọng trữ, đánh dấu cọng, ghi rõ số cọng, số phôi và trữ lạnh theo phương pháp đông lạnh chậm.

- Áp dụng quy trình đông lạnh chậm theo Gothenburg, Thụy Điển, (1999).

- Sử dụng máy đông lạnh Planer.

- Môi trường đông lạnh và rã đông của Vitrolife- Thụy Điển.

- Tại thời điểm nghiên cứu, số phôi dư này được rã đông và chuyển phôi.

Đối tượng 2: Quy trình thủy tinh hóa (phụ lục 2).

- Tại thời điểm nghiên cứu: những phôi dư được đánh giá chất lượng, chia đều 3 loại phôi: tốt, trung bình, xấu trên mỗi cọng trữ, đánh dấu cọng, ghi rõ số cọng, số phôi và trữ lạnh theo phương pháp thủy tinh hoá. Sau đó số phôi dư này được rã đông và chuyển phôi.

- Sử dụng hệ thống hờ.
- Môi trường đông lạnh và rã đông của Vitrolife - Thụy Điển.

Với cả 2 đối tượng:

- Phôi được rã đông, đánh giá chất lượng và nuôi qua đêm. Mục tiêu khi rã đông là có ít nhất 1 phôi sống, chúng tôi rã số phôi trữ cho tới khi đạt mục tiêu này.

- Đánh giá chất lượng phôi trước chuyển.

- Với số phôi chuyển, nếu có nhiều hơn 6 phôi sống, chúng tôi sẽ chỉ lựa chọn 6 phôi tốt nhất để chuyển.

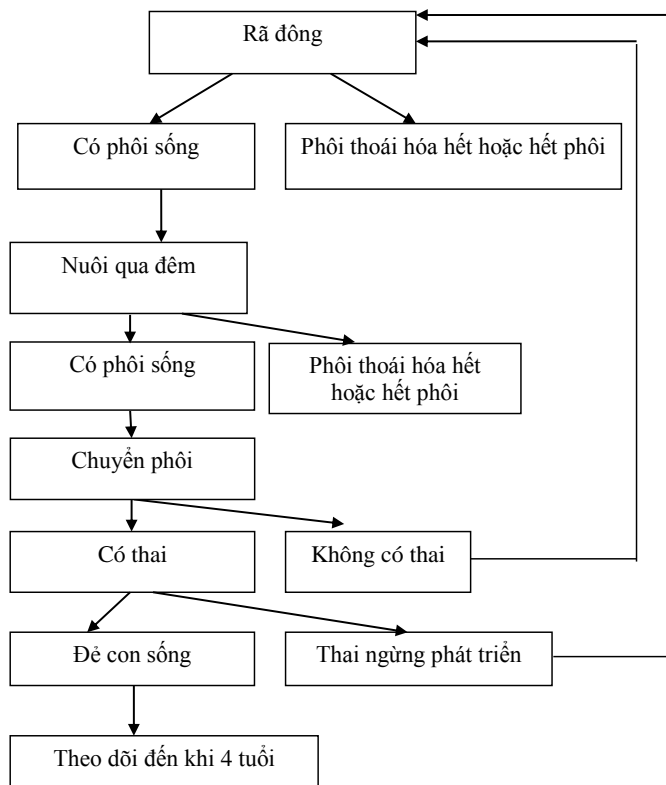
- BN được rã đông và chuyển phôi trữ cho đến khi đạt mục tiêu đẻ con sống hoặc hết phôi.

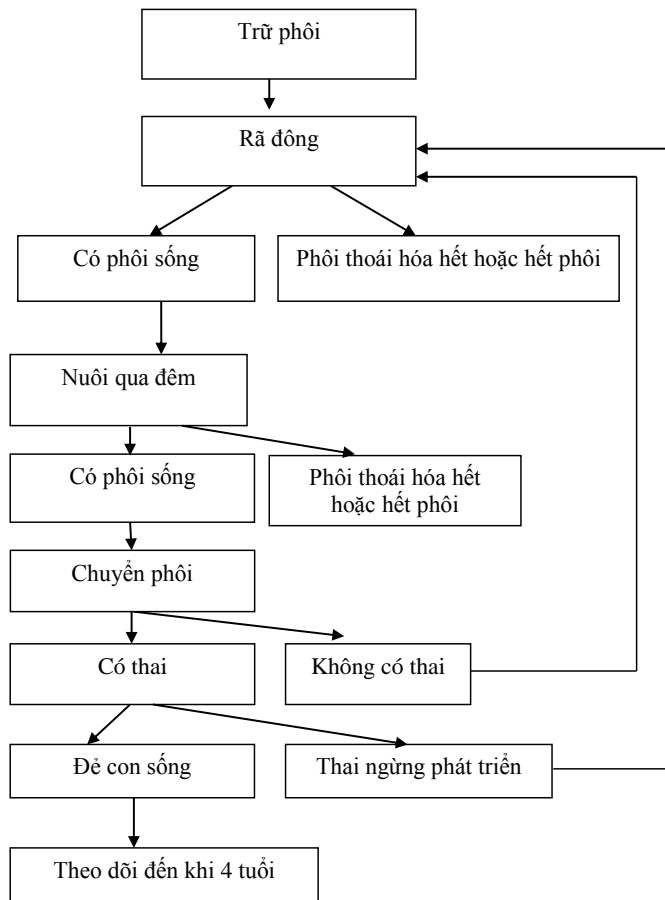
- Trong chu kỳ chuyển phôi trữ lạnh, niêm mạc tử cung được chuẩn bị bằng estradiol và progesterone ngoại sinh. Nếu có thai sẽ được hỗ trợ hoàng thể đến khi thai 12 tuần.(Quy trình chuẩn bị niêm mạc tử cung và hỗ trợ hoàng thể - phụ lục 3).

Tất cả các thông tin trên được ghi đầy đủ trong hồ sơ nghiên cứu.

2.7. Sơ đồ nghiên cứu.

Hình 2.1: Sơ đồ nghiên cứu nhóm phôi đông chậm



Hình 2.2: Sơ đồ nghiên cứu nhóm phôi thủy tinh hóa

2.8. Các chỉ tiêu và biến số nghiên cứu.

2.8.1. Phôi.

- Số lượng phôi trước đông (tốt, trung bình, xấu).
- Số lượng phôi sau rã (tốt, trung bình, xấu).
- Số lượng phôi trước chuyển (tốt, trung bình, xấu).
- Tỷ lệ phôi sống sau rã đông: được tính bằng phần trăm số phôi sống sau rã đông trên tổng số phôi rã.
- Tỷ lệ phôi rã đông thoái hoá hoàn toàn: được tính bằng phần trăm số phôi thoái hoá hoàn toàn sau rã đông trên tổng số phôi rã.
- Tỷ lệ phôi sống nguyên vẹn 100%: được tính bằng phần trăm số phôi sống nguyên vẹn 100% sau rã đông trên tổng số phôi rã.
- Tỷ lệ phôi sau rã đông phân chia tiếp: được tính bằng phần trăm số phôi phân chia qua đêm từ 2 tế bào trở lên trên tổng số phôi sống sau rã.

2.8.2. Một số yếu tố liên quan đến tỷ lệ có thai:

- Tuổi mẹ (tuổi được tính vào thời điểm chuyển phôi)
- Số lượng phôi chuyển.
- Chất lượng phôi.
- Độ dày niêm mạc tử cung.
- Điểm chuyển phôi

Tiêu chuẩn chấm điểm phôi ngày 2, ngày 3, ngày 4 (phụ lục 4)

Đánh giá thường quy của Trung tâm Hỗ trợ sinh sản Quốc Gia, về thời điểm, cách đánh giá chất lượng phôi, dựa vào tỷ lệ các mảnh vỡ bào tương (fragments), tốc độ phân chia của phôi và độ đồng đều của các tế bào.

Bảng 2.1: Thời điểm quan sát phôi, và giai đoạn phát triển tương ứng ở từng thời điểm

	Thời điểm (sau cấy IVF/ICSI) h	Giai đoạn phát triển tương ứng
Đánh giá phôi ngày 2	44±1	4 tế bào
Đánh giá phôi ngày 3	68±1	8 tế bào
Đánh giá phôi ngày 4	92±1	Phôi dâu (morula)

+ Phôi trước đông:

- Độ 3 (Grade III, HIPS (high implantation score)): độ chiết quang sáng, màng Zona còn nguyên vẹn, các tế bào đồng đều, không có fragments hoặc dưới 10%, phôi ngày 2 có 4-5 tế bào, phôi ngày 3 có từ 6-8 tế bào.

- Độ 2 (Grade II): ngày 2 có 3-4 tế bào, hoặc ngày 3 có 6-8 tế bào, các tế bào tương đối đồng đều, hoặc tỷ lệ fragments $\geq 10\%$, $< 25\%$.

- Độ 1a (Grade I): ngày 2 có 2 tế bào, hoặc ngày 3 có 3-4 tế bào, hoặc fragments $\geq 25\%$, hoặc các tế bào không đồng đều, màng Zona nguyên vẹn.

- Độ 1b: fragments $\geq 50\%$.

+ Sau rã đông: đánh giá theo sự phân độ trên, đồng thời còn dựa vào độ % thoái hoá của tế bào như sau: nhóm thoái hoá hoàn toàn (THHT); nhóm 1 (TH1) thoái hoá $< 25\%$; nhóm 2 (TH2) thoái hoá từ 25-50%; nhóm 3 (TH3) thoái hoá $\geq 50\%$.

Phôi sống: còn ít nhất 50% số tế bào so với phôi trước khi đông.

+ Trước chuyển phôi: dựa vào các phân độ phôi trước đông và độ thoái hoá, sự phân chia tiếp của phôi:

- Độ 3: còn nguyên vẹn không bị thoái hoá, khi nuôi qua đêm có ít nhất một phôi bào phân chia tiếp.

- Độ 2: thoái hoá <25%, khi nuôi qua đêm có ít nhất một phôi bào phân chia hoặc các phôi bào tương đối không đồng đều.

- Độ 1a: không có phôi bào phân chia tiếp, hoặc thoái hoá $\geq 25\%$, <50%, hoặc các phôi bào không đồng đều.

- Độ 1b: thoái hoá >50%.

Từ sau năm 2012, cách phân độ phôi như sau:

+ Phôi độ 4: có 4 - 5 tế bào vào ngày thứ 2 hoặc có 7 - 8 tế bào vào ngày thứ 3, các tế bào đồng đều, không có mảnh vỡ (fragments).

+ Phôi độ 3: có 4 - 5 tế bào vào ngày thứ 2 hoặc có 7 - 8 tế bào vào ngày thứ 3, các tế bào đồng đều, tỷ lệ mảnh vỡ (fragments) <10%.

+ Phôi độ 2: có 3 - 4 tế bào vào ngày thứ 2 hoặc có 6 - 8 tế bào vào ngày thứ 3, các tế bào không đồng đều hoặc tỷ lệ mảnh vỡ bào tương lớn hơn 10% và ít hơn 25%.

+ Phôi độ 1: có 2 tế bào vào ngày thứ 2 hoặc có ≤ 5 tế bào vào ngày thứ 3 hoặc tỷ lệ mảnh vỡ bào tương >25%.

- Ở nghiên cứu này, để đồng nhất trong cách đánh giá, dựa theo đồng thuận Alpha -2011 [92], chúng tôi gọi phôi độ 4, 3 là phôi tốt (độ 3), phôi độ 2 là phôi trung bình, phôi độ 1a, 1b là phôi xấu (độ 1).

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Đánh giá phôi ở giai đoạn phân chia

Bảng 2.2. Đồng thuận đánh giá phôi ở giai đoạn phân chia

Thang điểm	Đánh giá	Mô tả
1	Tốt	- <10% phân mảnh bào tương - Kích thước phôi bào phù hợp theo giai đoạn phát triển - Không có đa nhân
2	Trung bình	- 10 -25% phân mảnh bào tương - Phần lớn phôi bào có kích thước phù hợp với giai đoạn phát triển - Không có đa nhân
3	Xấu	- Phân mảnh bào tương nặng - Kích thước tế bào không phù hợp với giai đoạn phát triển - Đa nhân

Đánh giá chất lượng phôi ngày 4.**Bảng 2.3. Đồng thuận đánh giá chất lượng phôi ngày 4**

Phân loại	Mô tả
Tốt	. Phôi đã bước vào lần phân chia thứ 4 (khoảng 16 phôi bào) . Hiện tượng nén đã diễn ra ở toàn bộ thể tích phôi
Trung bình	. Phôi đã bước vào lần phân chia thứ 4 (khoảng 16 phôi bào) . Hiện tượng nén đã diễn ra ở phần lớn thể tích phôi
Xấu	. Hiện tượng nén đã diễn ra ít hơn 1/2 thể tích phôi, vẫn còn sự hiện diện của 2-3 phôi bào còn rõ màng tế bào . Hiện tượng nén xảy ra ở phôi trước khi phôi đạt đến giai đoạn 8 tế bào

Chấm điểm chuyển phôi (theo thường quy của Trung tâm HTSS Quốc gia).

1-Chấm điểm chất lượng phôi trước chuyển:

- . 2 điểm : có ≥ 2 phôi độ 3.
- . 1 điểm : có 1 phôi độ 3.
- . 0 điểm : không có phôi độ 3.

2- Chấm điểm độ dày NMTC trước chuyển phôi

- . 2 điểm : $7\text{mm} < \text{độ dày NMTC} < 14\text{mm}$.
- . 1 điểm : $\text{độ dày NMTC} = 7\text{mm}$ hoặc $= 14\text{mm}$.
- . 0 điểm : $\text{độ dày NMTC} < 7\text{mm}$ hoặc $> 14\text{mm}$.

3- Chấm điểm kỹ thuật chuyển phôi:

- . 2 điểm: Cathéter sau chuyển phôi sạch, không nhày máu, không sót phôi, không kẹt cổ tử cung, không nong cổ tử cung.

. 1 điểm: Cathéter sau chuyển phôi có nhày hoặc/ và kẹp cổ tử cung, không sót phôi, không nong cổ tử cung.

. 0 điểm: Cathéter sau chuyển phôi có máu hoặc sót phôi, hoặc nong cổ tử cung.

Điểm chuyển phôi là tổng điểm của 3 yếu tố: chất lượng phôi trước chuyển + độ dày NMTC trước chuyển + kỹ thuật chuyển phôi.

Điểm chuyển phôi cao nhất là 6, thấp nhất là 0.

2.8.3. Thai.

- Tỷ lệ có thai sau chuyển phôi rã đông: được tính bằng phần trăm số bệnh nhân có thai trên tổng số bệnh nhân tiến hành rã đông.

- Tỷ lệ sinh sống sau chuyển phôi rã đông: được tính bằng phần trăm số bệnh nhân đẻ con sống trên tổng số bệnh nhân tiến hành rã đông.

- Tỷ lệ thai ngừng tiến triển sau chuyển phôi rã đông: được tính bằng phần trăm tổng số bệnh nhân (thai sinh hóa + thai sảy + thai lưu)/ tổng số bệnh nhân tiến hành rã đông.

Các tỷ lệ được tính dựa trên các định nghĩa của Ủy ban Quốc tế giám sát Kỹ thuật Hỗ trợ sinh sản (ICMART) và Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) sửa đổi danh mục các thuật ngữ ART, 2009 [93].

2.8.4. Diễn biến thai kỳ:

- Có thai sinh hoá, có thai lâm sàng, thai sảy, thai lưu, đẻ non.

+ Thai sinh hóa: Sau chuyển phôi 14 ngày, xét nghiệm β hCG \geq 25ui/ml, nhưng không phát triển thành thai lâm sàng.

+ Thai lâm sàng: Xác định khi phát hiện thấy túi thai và tim thai trong buồng tử cung qua siêu âm.

+ Thai sảy: Là hiện tượng gián đoạn thai nghén trước 22 tuần.

+ Thai lưu: Là hiện tượng thai bị chết, còn lưu lại trong buồng tử cung từ 48 giờ trở lên.

+ Đẻ non: Là hiện tượng gián đoạn thai nghén khi thai có thể sống được (tuổi thai từ 22 đến dưới 37 tuần).

+ Thai đủ tháng: Tuổi thai từ 37 đến 40 tuần.

+ Thai già tháng: Tuổi thai trên 42 tuần.

- Để con sống khoẻ mạnh, để con dị tật, chết chu sinh, giới tính, cân nặng khi sinh, tuần tuổi thai khi sinh.

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, thông qua bảng phỏng vấn cha mẹ trẻ (phụ lục 5).

- Vẽ biểu đồ phát triển cân nặng, chiều cao của từng trẻ theo độ tuổi.

- Đánh giá phát triển cân nặng, chiều cao theo biểu đồ bách phân vị của WHO – 2007: [94].

+ Nếu nằm trong giới hạn từ đường bách phân vị 15 đến 85 là bình thường.

+ Nếu nằm từ đường bách phân vị 85 đến 97 là thừa cân, cao vượt trội.

+ Nếu nằm trên đường bách phân vị 97 là béo phì, cao quá mức.

+ Nếu nằm từ đường bách phân vị 3 đến 15 là suy dinh dưỡng, thấp còi.

+ Nếu nằm dưới đường bách phân vị 3 là suy dinh dưỡng nặng, thấp lùn.

- Đánh giá phát triển trí tuệ, tâm vận động bình thường hay bất thường theo tài liệu “Hướng dẫn phát hiện sớm, can thiệp sớm, trẻ em khuyết tật” do Bộ Y tế – Việt Nam ban hành năm 2014 [95].

Trẻ nghi ngờ có rối loạn phát triển khi không làm được 2 trong 3 kỹ năng của các lĩnh vực: Giao tiếp – Ngôn ngữ; Vận động thô; Vận động tinh; Bắt trước – Học; Cá nhân – Xã hội, hoặc có 1 trong các dấu hiệu bất thường hoặc dị tật giác quan. Nghiên cứu viên sẽ khuyên gia đình đưa trẻ đi khám và được chẩn đoán xác định tại bệnh viện chuyên khoa.

Hẹn lịch sàng lọc tiếp theo cho tất cả mọi trẻ (bình thường và bất thường) cho tới lúc 4 tuổi.

2.9. Kỹ thuật thu thập số liệu

Bệnh nhân được hỏi theo bảng thu nhận số liệu, các kết quả khám và xét nghiệm cũng được thu thập.

Các số liệu về mẫu nghiên cứu sẽ được thu nhập trực tiếp và liên tục vào chương trình SPSS, các dữ liệu về chất lượng phôi, mã bệnh nhân được ghi trong sổ nhật ký lab thụ tinh ống nghiệm, vị trí cất phôi đông lạnh được ghi trong sổ theo dõi đông phôi.

2.10. Xử lý và phân tích số liệu

Số liệu được kiểm tra hàng ngày, được kiểm tra lại trước khi nhập phiếu trên máy tính bằng phần mềm Epi Info 6.04. Có sử dụng phần kiểm tra (CHECK). Số liệu được làm sạch, sau đó xử lý phân tích bằng phần mềm SPSS 17.0. Các biến số được tính toán và trình bày theo số lượng phần trăm.

- Các kiểm định (Test) thống kê, kiểm định giá thuyết và ước lượng khoảng được sử dụng để đánh giá sự khác biệt. Giá trị P, OR và 95% CI được tính.

- So sánh các tỷ lệ bằng kiểm định “khi” bình phương (χ^2). So sánh các giá trị trung bình bằng T-Student test.

- Sử dụng đường cong ROC tìm ngưỡng giá trị: số lượng phôi tốt, số lượng phôi chuyển, điểm chuyển phôi, độ dày niêm mạc tử cung trong tiên đoán kết quả có thai sau chuyển phôi rã đông.

- Tính hệ số tương quan (r) giữa số lượng phôi trước đông với số lượng phôi sau rã và số lượng phôi trước chuyển.

- Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Formatted: Font: Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Bold, Vietnamese

2.11. Một số sai sót và cách khắc phục

Khống chế sai sót bằng cách chọn bệnh nhân vào nghiên cứu theo đúng tiêu chuẩn chọn mẫu, chọn bệnh nhân vào các phác đồ nghiên cứu theo đúng phương pháp chọn mẫu.

Các chỉ số và biến số cần cho nghiên cứu đều được định nghĩa và phân loại rõ ràng để tránh sai sót hệ thống.

Người nghiên cứu trực tiếp thu thập thông tin và theo dõi bệnh nhân thông qua phiếu thu thập số liệu với đầy đủ thông tin phục vụ cho nghiên cứu để tránh sai sót phỏng vấn.

2.12. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

- Mục tiêu nghiên cứu, các kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu không làm ảnh hưởng tới sức khỏe cũng như quyền lợi của của đối tượng nghiên cứu. Mục đích chính của đề tài là góp phần định hướng cho công tác điều trị hiệu quả hơn.

- Được sự đồng ý của đối tượng nghiên cứu: Ký vào bản cam kết thực hiện các kỹ thuật HTSS và đồng ý tham gia vào nghiên cứu.

- Bệnh nhân có quyền từ chối tham gia nghiên cứu tại bất kỳ thời điểm nào.

- Các thông tin riêng liên quan đến bệnh nhân được giữ kín, các số liệu thu thập chỉ được phục vụ cho nghiên cứu và được thông báo cho trường và bệnh viện.

- Đề cương đã thông qua hội đồng Y đức bệnh viện Phụ sản Trung ương và hội đồng đề cương của trường Đại học Y Hà Nội.

- Đảm bảo không xảy ra sai sót trong quá trình thao tác kỹ thuật.

- Được Giám đốc Trung tâm Hỗ trợ sinh sản cho phép thực hiện nghiên cứu theo đề cương đã được phê duyệt.

- Các thủ tục hành chính trong nghiên cứu phải tuân thủ đúng theo qui định và luật pháp Việt Nam đã ban hành trong lĩnh vực HTSS.

Chương 3

Formatted: Font: 16 pt, Bold, Vietnamese

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu trên 220 bệnh nhân chuyển phôi đông chậm, 324 bệnh nhân chuyển phôi thủy tinh hóa, có 2245 phôi được rã đông, tại trung tâm hỗ trợ sinh sản quốc gia, từ 1/2013 đến 4/2019 thu được kết quả sau:

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

3.1.1. Đặc điểm mẫu phôi nghiên cứu.

Bảng 3.1. Đặc điểm mẫu phôi nghiên cứu.

Đặc điểm	Đông lạnh chậm		Thủy tinh hóa		Tổng
	Nhóm phôi ngày 2	Nhóm phôi ngày 3	Nhóm phôi ngày 2	Nhóm phôi ngày 3	
Số phôi đông	850	271	876	796	2793
Số phôi rã	736	253	700	556	2245
Số phôi sống	460	143	552	391	1546
Số phôi sống nguyên vẹn	289	84	471	383	1227
Số phôi phân chia tiếp	182	53	313	203	751
Số phôi thoái hóa hoàn toàn	263	106	172	173	714
Số phôi chuyển	420	137	501	390	1448

* Với phương pháp đông lạnh chậm:

- Ở nhóm phôi ngày 2: có 12/162 BN (7,4%) toàn bộ số phôi trữ bị thoái hoá sau khi rã.

- Ở nhóm phôi ngày 3, số liệu là 13/58 (22,4%), nên không có phôi để nuôi tiếp, BN không có phôi để chuyển.

* Với phương pháp thủy tinh hóa:

- Ở nhóm phôi ngày 2: có 7/162 BN (4,5%) toàn bộ số phôi trữ bị thoái hoá sau khi rã.

- Ở nhóm phôi ngày 3, số liệu là 19/162 (9,9%), nên không có phôi để nuôi tiếp, BN không có phôi để chuyển.

Trong số phôi sống, sau khi nuôi qua đêm, ở nhóm phôi ngày 2: với phương pháp đông lạnh chậm có thêm 20/460 (4,4%) phôi bị thoái hoá hoàn toàn. Với phương pháp thủy tinh hóa số liệu là 36/552 (6,5%).

Ở nhóm phôi ngày 3, với phương pháp đông lạnh chậm có thêm 7/143(4,9%) phôi bị thoái hoá hoàn toàn. Với phương pháp thủy tinh hóa số liệu là 14/391 (3,6%).

Với những BN có phôi bị thoái hóa hết sẽ được ghi nhận.

Bảng 3.2. Số lượng phôi trước đông, sau rã, trước chuyển theo phân độ phôi.

Số lượng phôi	Đông lạnh chậm		Thủy tinh hóa		Tổng
	Nhóm phôi ngày 2	Nhóm phôi ngày 3	Nhóm phôi ngày 2	Nhóm phôi ngày 3	
Trước đông độ 1 (xấu)	235	74	176	162	645
Trước đông độ 2 (trung bình)	194	78	293	116	681
Trước đông độ 3 (tốt)	307	101	231	278	919
Sau rã độ 1 (xấu)	249	72	264	134	719
Sau rã độ 2 (trung bình)	76	48	190	137	451
Sau rã độ 3 (tốt)	148	27	110	126	411
Trước chuyển độ 1 (xấu)	239	69	197	87	592
Trước chuyển độ 2 (trung bình)	60	23	144	110	337
Trước chuyển độ 3 (tốt)	121	43	160	193	517

3.1.2. Mối tương quan về số lượng phôi qua các bước kỹ thuật theo phân độ phôi.

3.1.2.1. Mối tương quan giữa số lượng phôi trước đông và số lượng phôi sau rã của 2 phương pháp.

* Với phôi tốt.

Bảng 3.3. Mối tương quan giữa số lượng phôi tốt (độ 3) trước đông và số lượng phôi tốt (độ 3) sau rã của 2 phương pháp.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	r= 0,499 $r^2 = 24,9\%$ $y=0,248x + 0,354$ $p= 0,003$	r= 0,585 $r^2 = 34,2\%$ $y=0,219x + 0,268$ $p < 0,001$
Nhóm phôi ngày 3	r= 0,389 $r^2 = 15,1\%$ $y=0,157x+0,173$ $p < 0,001$	r= 0,472 $r^2 = 22,3\%$ $y=0,181x + 0,46$ $p < 0,001$

Nhận xét:

* Với phương pháp đông lạnh chậm: ở cả 2 nhóm phôi ngày 2 và ngày 3 hệ số tương quan giữa số lượng phôi tốt trước đông và số lượng phôi tốt sau rã kém chặt ($r < 0,5$).

* Với phương pháp thủy tinh hóa: chỉ ở nhóm phôi ngày 2, số phôi tốt sau rã có tương quan chặt và có ý nghĩa thống kê với số phôi tốt trước đông. Với nhóm phôi ngày 3, tương quan này kém chặt.

* Với phôi trung bình.

Bảng 3.4. Mối tương quan giữa số lượng phôi trung bình (độ 2) trước đông và số lượng phôi trung bình (độ 2) sau rã của 2 phương pháp.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	r= 0,361 $r^2 = 13\%$ $y=0,178x + 0,184$ $p= 0,000$	r= 0,463 $r^2 = 21,4\%$ $y=0,658x + 0,276$ $p < 0,001$
Nhóm phôi ngày 3	r= 0,164 $r^2 = 2,7\%$ $y=0,1x + 0,66$ $p < 0,275$	r= 0,217 $r^2 = 4,7\%$ $y=0,12x + 0,691$ $p < 0,012$

Nhận xét: Ở cả 2 phương pháp và nhóm tuổi phôi: số lượng phôi trung bình (độ 2) trước đông không tương quan hoặc có tương quan yếu với số lượng phôi trung bình (độ 2) sau rã.

* Với phôi xấu.

Bảng 3.5. Mối tương quan giữa số lượng phôi xấu (độ 1) trước đông và số lượng phôi xấu (độ 1) sau rã của 2 phương pháp.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	r= 0,439 $r^2 = 19,3\%$ $y=0,302x + 1,118$ $p= 0,000$	r= 0,554 $r^2 = 30,7\%$ $y=0,432x + 0,931$ $p< 0,000$
Nhóm phôi ngày 3	r= 0,497 $r^2 = 24,7\%$, $y=0,444x + 0,737$ $p<0,000$	r= 0,141 $r^2 = 2\%$ $y=0,52x + 0,73$ $p=0,149$

Nhận xét: Ở cả 2 phương pháp và nhóm tuổi phôi, số lượng phôi xấu (độ 1) sau rã có tương quan kém chặt hoặc không tương quan với số lượng phôi xấu (độ 1) trước đông.

3.1.2.2 Mối tương quan giữa số lượng phôi sau rã và số lượng phôi trước chuyển của 2 phương pháp.

* Với phôi tốt.

Bảng 3.6. Mối tương quan giữa số lượng phôi tốt (độ 3) sau rã và số lượng phôi tốt (độ 3) trước chuyển của 2 phương pháp.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	r=0,743 $r^2=55,2\%$ $y=0,617x + 0,183$ $p< 0,000$	r=0,631 $r^2=39,8\%$ $y=0,819x + 0,45$ $p< 0,000$
Nhóm phôi ngày 3	r= 0,592 $r^2=35,1\%$ $y=0,777x+0,38$ $p<0,000$	r=0,686 $r^2=47,1\%$ $y=0,811x+0,561$ $p<0,000$

Nhận xét: Ở cả 2 phương pháp, có mối tương quan tuyến tính chặt giữa số lượng phôi tốt (độ 3) sau rã và số lượng phôi tốt (độ 3) trước chuyển.

* Với phôi trung bình.

Bảng 3.7. Mối tương quan giữa số lượng phôi trung bình (độ 2) sau rã và số lượng phôi trung bình (độ 2) trước chuyển của 2 phương pháp.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	r=0,148 $r^2=22\%$ $y=0,109x + 0,319$ $p= 0,06$	r=0,352 $r^2=12,4\%$ $y=0,302x + 0,541$ $p< 0,000$
Nhóm phôi ngày 3	r= 0,349 $r^2=12,2\%$ $y=0,228x+0,208$ $p<0,000$	r=0,34 $r^2=11,5\%$ $y=0,322x+0,413$ $p<0,000$

Nhận xét: Ở cả 2 phương pháp có tương quan kém chặt hoặc không tương quan giữa số lượng phôi trung bình (độ 2) sau rã và số lượng phôi trung bình (độ 2) trước chuyển.

* Với phôi xấu

Bảng 3.8: Mối tương quan giữa số lượng phôi xấu (độ 1) sau rã và số lượng phôi xấu (độ 1) trước chuyển của 2 phương pháp.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	r=0,748 $r^2=55,9\%$ $y=0,675x + 0,438$ $p<0,001$	r=0,422 $r^2=17,8\%$ $y=0,376x + 0,616$ $p< 0,001$
Nhóm phôi ngày 3	r= 0,727 $r^2=52,9\%$ $y=0,721x+0,294$ $p<0,001$	r=0,708 $r^2=50,2\%$ $y=0,619x+0,25$ $p<0,001$

Nhận xét:

- Ở cả 2 phương pháp có tương quan và tương quan tuyến tính chặt giữa số lượng phôi xấu (độ 1) sau rã và số lượng phôi xấu (độ 1) trước chuyển.

3.1.2.3. *Mối tương quan giữa số lượng phôi tốt trước đông và số lượng phôi tốt trước chuyển của 2 phương pháp.*

Bảng 3.9: Mối tương quan giữa số lượng phôi tốt (độ 3) trước đông và số lượng phôi tốt (độ 3) trước chuyển của 2 phương pháp.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	r=0,419 $r^2=17,6\%$ $y=0,172x + 0,438$ $p<0,001$	r=0,392 $r^2=15,4\%$ $y=0,195x + 0,64$ $p< 0,001$
Nhóm phôi ngày 3	r= 0,091 $r^2=0,8\%$ $y=0,44x + 0,659$ $p=0,544$	r=0,284 $r^2=8,1\%$ $y=0,132x + 0,959$ $p=0.001$

Nhận xét:

- Ở phương pháp thủy tinh hóa: cả nhóm ngày 2 và nhóm ngày 3, số lượng phôi tốt trước đông có tương quan yếu với số lượng phôi tốt trước chuyển.

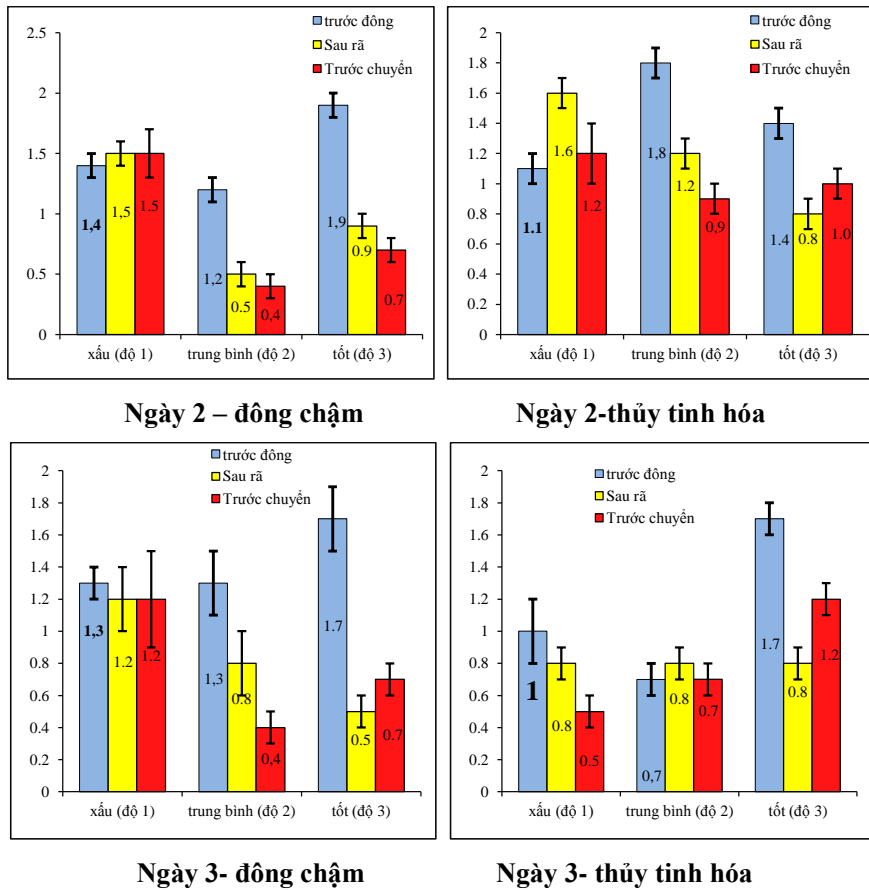
- Ở phương pháp đông chậm: nhóm ngày 2, số lượng phôi tốt trước đông có tương quan yếu với số lượng phôi tốt trước chuyển; nhóm phôi ngày 3, không có tương quan.

Bảng 3.10: Bảng giá trị ước lượng tính theo phương trình tương quan giữa số lượng phôi tốt trước đông và số lượng phôi tốt trước chuyển.

Số lượng phôi tốt trước chuyển	Số lượng phôi tốt trước đông			
	Đông chậm		Thủy tinh hóa	
	Nhóm phôi ngày 2	Nhóm phôi ngày 3	Nhóm phôi ngày 2	Nhóm phôi ngày 3
1	4	1	2	1
2	10	4	7	8

Nhận xét: Với cả 2 phương pháp, để trước chuyển có thể thu được 1- 2 phôi tốt, trước đông cần ít nhất 4 phôi tốt.

3.1.3. Chất lượng phôi trước và sau rã đông.



Biểu đồ 3.1: Diễn biến chất lượng phôi theo các thời điểm: trước đông, sau rã, trước chuyển.

Nhận xét: với cả 2 phương pháp trữ lạnh và 2 nhóm tuổi phôi:

- Sau rã đông: so với trước đông, trung bình số phôi độ 2- độ 3/ chu kỳ FET đều giảm.
- Trước chuyển: so với sau rã, trung bình số phôi độ 1- độ 2/ chu kỳ FET đều giảm. Trung bình số phôi độ 3/ chu kỳ FET có xu hướng tăng. Đặc biệt, ở nhóm ngày 3- thủy tinh hóa, trung bình số phôi độ 3/ chu kỳ FET tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 3.11. Trung bình số phôi trước đông/ chu kỳ FET theo phân độ phôi.

Chất lượng phôi trước đông	Đông lạnh chậm			Thủy tinh hóa		
	Nhóm phôi ngày 2	Nhóm phôi ngày 3	P	Nhóm phôi ngày 2	Nhóm phôi ngày 3	P
	(Ia)	(Ib)		(IIa)	(IIb)	
	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$		$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	
Xấu	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,3	p>0,05	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,2	p>0,05
Trung bình	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,2	p>0,05	1,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	p<0,05
Tốt	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,3	p>0,05	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2	p>0,05

Nhận xét:

- Với phương pháp đông lạnh chậm: trung bình số phôi tốt, trung bình, xấu trước đông/ chu kỳ FET ở nhóm ngày 2, ngày 3 là như nhau.
- Với phương pháp thủy tinh hóa: trung bình số phôi tốt và xấu trước đông/ chu kỳ FET ở nhóm ngày 2, ngày 3 là như nhau. Nhưng trung bình số phôi độ 2 (trung bình) trước đông/chu kỳ FET ở nhóm phôi ngày 2 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm phôi ngày 3 (p<0,05).

Bảng 3.12. Trung bình số phôi sau rã/chu kỳ FET theo phân độ phôi.

Chất lượng phôi sau rã đông	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
	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$		$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	
Xấu	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,2	p>0,05	1,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	p<0,05
Trung bình	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,2	p<0,05	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	p<0,05
Tốt	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1	p<0,05	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	p>0,05

Nhận xét:

- Với phương pháp đông lạnh chậm: hai nhóm ngày 2 và ngày 3 đã có sự khác nhau về chất lượng phôi: Trung bình số phôi xấu sau rã/chu kỳ FET 2 nhóm là như nhau. Nhưng, trung bình số phôi tốt sau rã/chu kỳ FET của nhóm phôi ngày 2 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm phôi ngày 3. Đồng thời, trung bình số phôi độ 2 (trung bình) sau rã/chu kỳ FET của nhóm ngày 2 thấp hơn so với nhóm ngày 3 với $p < 0,05$.
- Với phương pháp thủy tinh hóa: Trung bình số phôi tốt sau rã/ chu kỳ FET 2 nhóm là như nhau. Nhưng, trung bình số phôi xấu và độ 2 (trung bình) sau rã/chu kỳ FET của nhóm phôi ngày 2 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm phôi ngày 3 ($p < 0,05$).

Formatted: Font: 16 pt, Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Bảng 3.13. Trung bình số phôi trước chuyển/chu kỳ FET theo phân độ phôi

Chất lượng phôi trước chuyển	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
	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$		$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	
Xấu	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,2	p>0,05	1,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	p<0,05
Trung bình	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	p>0,05	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	p<0,05
Tốt	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	p>0,05	1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	p>0,05

Nhận xét:

- Với phương pháp đông lạnh chậm: Trung bình số phôi trước chuyển (xấu), (trung bình), (tốt)/chu kỳ FET của 2 nhóm ngày 2 và ngày 3 là tương đương.
- Với phương pháp thủy tinh hóa: Trung bình số phôi trước chuyển (tốt)/chu kỳ FET của nhóm ngày 2 và ngày 3 là tương đương. Nhưng, trung bình số phôi trước chuyển (xấu) và độ 2 (trung bình)/chu kỳ FET của nhóm phôi ngày 2 cao hơn nhóm phôi ngày 3 có ý nghĩa thống kê (p< 0,05).

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

Nhận xét:

- Với cả 2 phương pháp trữ lạnh: 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.

Formatted: Font: Not Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Not Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Not Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Not Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Not Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Not Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Not Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Not Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Not Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Not Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Not Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Not Bold, Vietnamese

Formatted: Vietnamese

- Với từng nhóm tuổi phôi: 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. Đồng thời, tỷ lệ phôi thoái hoá hoàn toàn của phương pháp thủy tinh hóa có xu hướng thấp hơn phương pháp đông chậm.

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

3.2.1. Đặc điểm của bệnh nhân nghiên cứu

3.2.1.1. Nhóm tuổi.

Bảng 3.15. Nhóm tuổi

Nhóm tuổi	Đông lạnh chậm		Thủy tinh hóa		Chung	
	N	%	n	%	n	%
Tuổi > 35	75	34,1%	98	30,2%	173	31,8%
Tuổi ≤ 35	145	65,9%	226	69,8%	371	68,2%
Tổng	220	100%	324	100%	544	100%

Nhận xét: nhóm dưới 35 tuổi chiếm 68,2%, nhóm trên 35 tuổi chiếm 31,8%. BN lớn tuổi nhất thực hiện kỹ thuật chuyển phôi trữ lạnh, trong nghiên cứu của chúng tôi, ở cả 2 phương pháp là 57 tuổi.

3.2.1.2. Điểm chuyển phôi.

Bảng 3.16. Điểm chuyển phôi

Điểm chuyển phôi	Đông lạnh chậm		Thủy tinh hóa		Chung	
	N	%	n	%	N	%
2	2	1,1%	1	0,3%	3	0,6%
3	9	4,8%	4	1,2%	13	2,7%
4	103	54,5%	86	28,8%	189	38,7%
5	33	17,4%	115	38,5%	148	30,3%
6	42	23,2%	93	31,2%	135	27,7%
Tổng	189	100%	299	100%	488	100%

Nhận xét: Có 56 bệnh nhân không có phôi để chuyển (10.3%) nên không chấm điểm.

3.2.1.3. Số phôi chuyển/ chu kỳ FET

Bảng 3.17. Số phôi chuyển/ chu kỳ FET.

Số phôi chuyển/ chu kỳ FET	Đông lạnh chậm		Thủy tinh hóa		Chung	
	N	%	n	%	n	%
0	30	13,6%	26	8%	56	10,3%
1	26	11,8%	27	8,3%	53	9,7%
2	57	25,9%	87	26,9%	144	26,5%
3	40	18,2%	83	25,6%	123	22,6%
4	37	16,8%	65	20,1%	102	18,8%
5	24	10,9%	36	11,1%	60	11%
6	6	2,7%	0	0%	6	1%
Tổng	220	100%	324	100%	544	100%

Nhận xét: Ở cả 2 phương pháp nhóm bệnh nhân được chuyển 2 phôi chiếm tỷ lệ cao nhất.

3.2.1.4. Một số đặc điểm của 2 nhóm BN đông phôi ngày 2 và BN đông phôi ngày 3 của 2 phương pháp.

Bảng 3.18. Một số đặc điểm của 2 nhóm BN đông phôi ngày 2 và BN đông phôi ngày 3 của 2 phương pháp.

Đặc điểm	Đông lạnh chậm			Thủy tinh hóa		
	Nhóm BN đông phôi ngày 2	Nhóm BN đông phôi ngày 3	P	Nhóm BN đông phôi ngày 2	Nhóm BN đông phôi ngày 3	P
Tuổi vợ	33,9 ± 6	33,4 ± 4,8	p > 0,05	33,1 ± 5,8	33,9 ± 5,5	p > 0,05
Độ dày niêm mạc tử cung (mm)	9,2 ± 1,4	9 ± 1	p > 0,05	9,8 ± 1,4	10,2 ± 1,7	p > 0,05
Điểm chuyển phôi	4 ± 1,7	3,6 ± 2,1	p > 0,05	5,1 ± 1	4,7 ± 0,9	p < 0,05
Số phôi rã đông/ chu kỳ FET	4,5 ± 2,2	4,4 ± 2,4	p > 0,05	4,3 ± 1,8	3,4 ± 1,4	p < 0,05
Số phôi chuyển/ chu kỳ FET	2,6 ± 1,5	2,4 ± 1,8	p > 0,05	3,1 ± 1,4	2,4 ± 1,3	p < 0,05

Nhận xét: tuổi trung bình của bệnh nhân chuyển phôi đông lạnh nằm trong độ tuổi sinh đẻ từ 18- 35 tuổi.

- Độ dày niêm mạc trung bình của 2 nhóm BN đông phôi ngày 2 và BN đông phôi ngày 3, ở cả 2 phương pháp đều đạt được ở nhóm 2 điểm ($> 7\text{mm}$ và $< 14\text{mm}$), nhóm tốt nhất cho phôi làm tổ.

Trong nghiên cứu này, độ dày niêm mạc mỏng nhất tiến hành chuyển phôi ở phương pháp đông lạnh chậm là 4 mm, ở phương pháp thủy tinh hóa là 5,8mm. Độ dày niêm mạc dày nhất tiến hành chuyển phôi ở phương pháp đông lạnh chậm là 14 mm, ở phương pháp thủy tinh hóa là 17mm.

- Với phương pháp đông lạnh chậm: không có sự khác biệt giữa 2 nhóm BN đông phôi ngày 2 và BN đông phôi ngày 3 về điểm chuyển phôi, số phôi rã đông/ chu kỳ FET, số phôi chuyển/ chu kỳ FET.

- Với phương pháp thủy tinh hóa: nhóm BN đông phôi ngày 2 cao hơn nhóm BN đông phôi ngày 3 có ý nghĩa thống kê về điểm chuyển phôi, số phôi rã đông/ chu kỳ FET, số phôi chuyển/ chu kỳ FET.

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

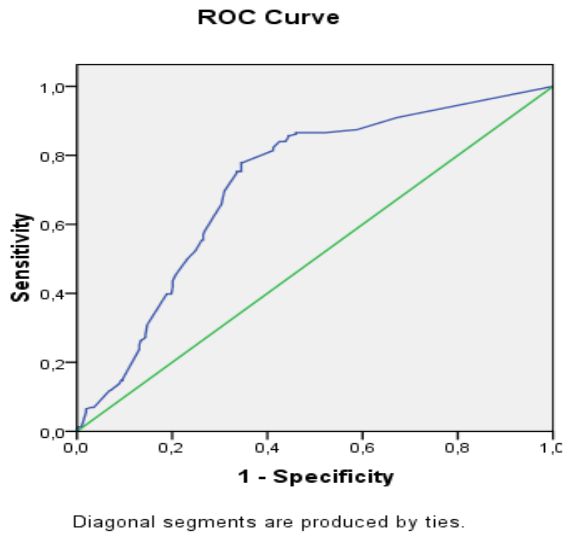
3.2.2.1. Mối liên quan giữa tuổi vợ và kết quả có thai.

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%

Nhận xét: Không có sự khác biệt về tỷ lệ có thai giữa 2 nhóm tuổi trên 35 và dưới 35 ($p=0,543$).

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



Biểu đồ 3.2. 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. - $P < 0.0001$.

- Dựa vào đường cong ROC, điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là tại điểm cắt đó đường cong đổi chiều, điểm cắt 8,05 có độ nhạy là 77,9%, độ đặc hiệu 65,2%.

Bảng 3.20. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của độ dày niêm mạc tử cung.

Độ dày niêm mạc tử cung	Độ nhạy (Se)	1 – Specificity	Độ đặc hiệu (Sp)	Độ dày niêm mạc tử cung	Độ nhạy (Se)	1 - Specificity	Độ đặc hiệu (Sp)
-1,0000	1,000	1,000	0,000	9,5500	0,455	0,208	0,792
,5000	0,944	0,796	0,204	9,6500	0,437	0,201	0,799
1,5000	0,909	0,671	0,329	9,7500	0,420	0,201	0,799
2,5000	0,874	0,588	0,412	9,8500	0,398	0,198	0,802
3,5000	0,866	0,521	0,479	9,9500	0,398	0,188	0,812
4,5000	0,866	0,495	0,505	10,0500	0,307	0,147	0,853
5,4000	0,866	0,460	0,540	10,1500	0,303	0,147	0,853
5,9000	0,861	0,460	0,540	10,2500	0,281	0,144	0,856
6,2500	0,857	0,447	0,553	10,3500	0,273	0,144	0,856
6,7000	0,857	0,444	0,556	10,4500	0,268	0,141	0,859
6,9500	0,853	0,444	0,556	10,5500	0,264	0,134	0,866
7,1000	0,840	0,438	0,562	10,7000	0,251	0,131	0,869
7,2500	0,840	0,435	0,565	10,8500	0,247	0,131	0,869
7,3500	0,840	0,428	0,572	10,9500	0,238	0,131	0,869
7,4500	0,840	0,425	0,575	11,1000	0,152	0,096	0,904
7,5500	0,831	0,419	0,581	11,2500	0,147	0,096	0,904
7,6500	0,827	0,415	0,585	11,3500	0,147	0,093	0,907
7,7500	0,823	0,412	0,588	11,4500	0,139	0,089	0,911
7,9000	0,814	0,412	0,588	11,5500	0,126	0,077	0,923
8,0500	0,779	0,348	0,652	11,6500	0,121	0,073	0,927
8,1500	0,779	0,345	0,655	11,8500	0,117	0,067	0,933
8,2500	0,753	0,345	0,655	12,0500	0,074	0,038	0,962
8,3500	0,753	0,335	0,665	12,2000	0,069	0,035	0,965
8,4500	0,749	0,335	0,665	12,3500	0,069	0,032	0,968
8,5500	0,710	0,316	0,684	12,4500	0,069	0,029	0,971
8,6500	0,697	0,310	0,690	12,5500	0,065	0,019	0,981
8,7500	0,680	0,307	0,693	12,6500	0,061	0,019	0,981
8,8500	0,658	0,304	0,696	12,8500	0,056	0,019	0,981
8,9500	0,645	0,297	0,703	13,1000	0,013	0,010	0,990
9,0500	0,580	0,268	0,732	13,3500	0,013	0,006	0,994
9,1500	0,571	0,265	0,735	13,7500	0,013	0,003	0,997
9,2300	0,554	0,265	0,735	14,1500	0,009	0,000	1,000
9,2800	0,554	0,262	0,738	15,6500	0,004	0,000	1,000
9,3500	0,524	0,249	0,751	18,0000	0,000	0,000	1,000
9,4500	0,502	0,233	0,767				

Nhận xét: Tại điểm cắt càng thấp của độ dày niêm mạc tử cung, giá trị tiên lượng kết quả có thai có độ nhạy càng cao và độ đặc hiệu càng thấp. Tại các điểm cắt càng cao giá trị tiên lượng kết quả có thai với độ nhạy càng thấp và độ đặc hiệu càng cao. Tại điểm cắt =14,15mm, độ đặc hiệu là 100%. Nghĩa là không có ai có thai mà độ dày niêm mạc > 14mm.

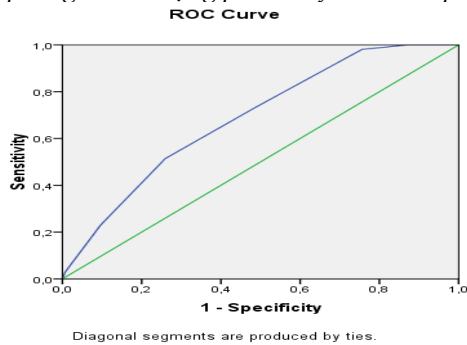
Bảng 3.21. Tỷ suất chênh về kết quả có thai giữa các nhóm độ dày niêm mạc tử cung.

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

Nhận xét:

- Nếu niêm mạc tử cung 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 niêm mạc tử cung ≤ 8mm hoặc >14mm, sẽ làm giảm khả năng có thai xuống còn 36,3% và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

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



Biểu đồ 3.3. 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. - $P < 0,0001$.
- Dựa vào đường cong ROC, điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là tại điểm cắt đó đường cong đối chiều, điểm cắt 3 có độ nhạy là 73,3%, độ đặc hiệu 51,3%. Chỉ số J cao nhất = 24,6%.

Bảng 3.22. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi chuyển.

Số phôi chuyển	Độ nhạy (Se)	Độ đặc hiệu (Sp)	Chỉ số J (Se+Sp-1)	Giá trị tiên đoán dương tính
0	1,000	0,000	0,000	0,000
1	1,000	0,128	0,128	0,215
2	0,981	0,244	0,221	0,237
3	0,733	0,513	0,246	0,266
4	0,514	0,74	0,209	0,321
5	0,229	0,904	0,133	0,364
6	0,029	0,993	0,022	0,5

Nhận xét: Số phôi chuyển càng cao thì độ nhạy càng giảm, độ đặc hiệu và giá trị tiên đoán dương tính càng cao.

3.2.2.4. Mối liên quan giữa chất lượng phôi ở từng giai đoạn với kết quả có thai.

3.2.2.4.1. Mối liên quan giữa chất lượng phôi trước đông và kết quả có thai

* Mối liên quan giữa có phôi tốt trước đông và kết quả có thai.

Bảng 3.23. Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi tốt trước đông và kết quả có thai.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	OR 5,719 CI 95% (1,298 – 25,378) p= 0,011	OR 3,71 CI 95% (1,578 – 8,813) p= 0,002
Nhóm phôi ngày 3	OR 0,357 CI 95% (0,071 – 1,888) p= 0,217	OR 2,743 CI 95% (1,126 – 6,78) p= 0,023

Nhận xét:

- Ở nhóm phôi ngày 2, nếu trước đông bệnh nhân có phôi (tốt) sẽ làm tăng khả năng có thai có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Với phương pháp đông chậm tăng khả năng có thai lên 5,719 lần.

Với phương pháp thủy tinh hóa tăng khả năng có thai lên 3,71 lần.

- Ở nhóm phôi ngày 3, với phương pháp thủy tinh hóa, nếu trước đông bệnh nhân có phôi tốt sẽ làm tăng khả năng có thai lên 2,743 lần ($p < 0,05$). Tuy nhiên, với phương pháp đông chậm, khả năng có thai không tăng.

* Mọi liên quan giữa có phôi trung bình (độ 2) trước đông và kết quả có thai.

Bảng 3.24. Mọi liên quan giữa có ≥ 1 phôi trung bình (độ 2) trước đông và kết quả có thai.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	OR 0,94 CI 95% (0,405 – 2,275) p= 0,926	OR 1,325 CI 95% (0,378 – 3,127) p= 0,49
Nhóm phôi ngày 3	OR 1,464 CI 95% (0,262 – 8,417) p = 0,654	OR 1,11 CI 95% (0,551 – 2,486) p = 0,682

Nhận xét: Ở cả 2 phương pháp, với cả nhóm phôi ngày 2 và ngày 3, nếu trước đông bệnh nhân có phôi độ 2 (trung bình) sẽ làm tăng khả năng có thai nhưng không có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$.

* Mọi liên quan giữa có phôi xấu trước đông và kết quả có thai.

Bảng 3.25. Mọi liên quan giữa có ≥ 1 phôi xấu trước đông và kết quả có thai.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	OR 0,863 CI 95% (0,381 – 2,047) p= 0,771	OR 0,907 CI 95% (0,423 – 1,986) p= 0,825
Nhóm phôi ngày 3	OR 0,701 CI 95% (0,146 – 3,552) p= 0,687	OR 0,306 CI 95% (0,145 – 0,657) p= 0,002

Nhận xét:

- Với nhóm phôi ngày 2, ở cả 2 phương pháp, nếu trước đông bệnh nhân có phôi (xấu) sẽ làm giảm khả năng có thai nhưng không có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$.

- Với nhóm phôi ngày 3, ở phương pháp đông chậm, nếu trước đông bệnh nhân có phôi (xấu) sẽ làm giảm khả năng có thai nhưng không có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$.
- Ở phương pháp thủy tinh hóa, nếu trước đông bệnh nhân có phôi (xấu) sẽ làm giảm khả năng có thai có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

3.2.2.4.2. Mối liên quan giữa chất lượng phôi sau rã và kết quả có thai.

* Mối liên quan giữa có phôi tốt sau rã và kết quả có thai.

Bảng 3.26. Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi tốt sau rã và kết quả có thai.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	OR 5,733 CI 95% (2,159 – 15,225) p= 0,000	OR 10,281 CI 95% (4,255 – 24,842) p= 0,000
Nhóm phôi ngày 3	OR 2,27 CI 95% (0,25 – 20,582) p= 0,456	OR 4,331 CI 95% (1,927 – 9,738) p= 0,000

Nhận xét:

- Với phương pháp thủy tinh hóa, nếu sau rã bệnh nhân có phôi (tốt) sẽ làm tăng khả năng có thai có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Ở nhóm phôi ngày 2 tăng khả năng có thai lên 10,281 lần.

Ở nhóm phôi ngày 3 tăng khả năng có thai lên 4,331 lần.

- Với phương pháp đông chậm, ở nhóm phôi ngày 2, nếu sau rã bệnh nhân có phôi (tốt) sẽ làm tăng khả năng có thai lên 5,733 lần, nhưng nhóm phôi ngày 3 tăng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

**Mối liên quan giữa có phôi trung bình (độ 2) sau rã và kết quả có thai.*

Bảng 3.27. Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi trung bình (độ 2) sau rã và kết quả có thai.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	OR 0,347 CI 95% (0,147 – 0,819) p= 0,013	OR 0,603 CI 95% (0,283 – 1,284) p= 0,187
Nhóm phôi ngày 3	OR 0,108 CI 95% (0,012 – 0,961) p= 0,02	OR 0,721 CI 95% (0,345 – 1,503) p= 0,381

Nhận xét: Ở cả 2 phương pháp, với cả 2 nhóm phôi ngày 2 và ngày 3, nếu sau rã bệnh nhân có phôi độ 2 (trung bình) sẽ làm giảm khả năng có thai. Đặc biệt, với phương pháp đông chậm, giảm có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

** Mối liên quan giữa có phôi xấu (độ 1) sau rã và kết quả có thai.*

Bảng 3.28. Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi xấu sau rã và kết quả có thai.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	OR 1,036 CI 95% (0,429-2,504) p= 0,938	OR 0,55 CI 95% (0,203 – 1,303) p= 0,17
Nhóm phôi ngày 3	OR 1,071 CI 95% (0,217 – 5,293) p= 0,933	OR 0,416 CI 95% (0,192 – 0,9) p= 0,024

Nhận xét: - Với phương pháp đông chậm, ở cả 2 nhóm phôi ngày 2 và ngày 3, nếu sau rã bệnh nhân có phôi (xấu) sẽ làm tăng khả năng có thai nhưng không có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$.

-Với phương pháp thủy tinh hóa, ở nhóm phôi ngày 3, nếu sau rã bệnh nhân có phôi (xấu) sẽ làm giảm khả năng có thai có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

Ở nhóm phôi ngày 2, nếu sau rã bệnh nhân có phôi (xấu) sẽ làm tăng khả năng có thai nhưng không có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$.

3.2.2.4.3. *Mối liên quan giữa chất lượng phôi trước chuyển và kết quả có thai.*

* *Mối liên quan giữa có phôi tốt trước chuyển và kết quả có thai.*

Bảng 3.29: Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi tốt trước chuyển và kết quả có thai.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	OR 5,87 CI 95% (2,296 – 15,102) p= 0,000	OR 9,651 CI 95% (3,73 – 24,974) p= 0,000
Nhóm phôi ngày 3	OR 2,246 CI 95% (0,453 – 11,133) p= 0,313	OR 8,905 CI 95% (2,597 – 30,531) p= 0,000

Nhận xét: Ở nhóm phôi ngày 2, nếu trước chuyển bệnh nhân có phôi (tốt) sẽ làm tăng khả năng có thai có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Với phương pháp đông chậm tăng khả năng có thai lên 5,87 lần.

Với phương pháp thủy tinh hóa tăng khả năng có thai lên 9,651 lần.

- Ở nhóm phôi ngày 3, với phương pháp thủy tinh hóa, nếu trước chuyển bệnh nhân có phôi (tốt) sẽ làm tăng khả năng có thai lên 8,905 lần ($p < 0,05$). Tuy nhiên, với phương pháp đông chậm, khả năng có thai tăng lên nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,313$).

* *Mối liên quan giữa có phôi trung bình (độ 2) trước chuyển và kết quả có thai.*

Bảng 3.30. Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi trung bình (độ 2) trước chuyển và kết quả có thai.

	Đông chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	OR 0,581 CI 95% (0,236 – 1,429) p= 0,234	OR 0,671 CI 95% (0,319 – 1,411) p= 0,291
Nhóm phôi ngày 3	OR 0,367 CI 95% (0,071 – 1,888) p= 0,217	OR 0,568 CI 95% (0,266 – 1,216) p= 0,143

Nhận xét: Ở cả 2 phương pháp, với cả 2 nhóm phôi ngày 2 và ngày 3, nếu trước chuyển bệnh nhân có phôi độ 2 (trung bình) sẽ làm giảm khả năng có thai nhưng không có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$.

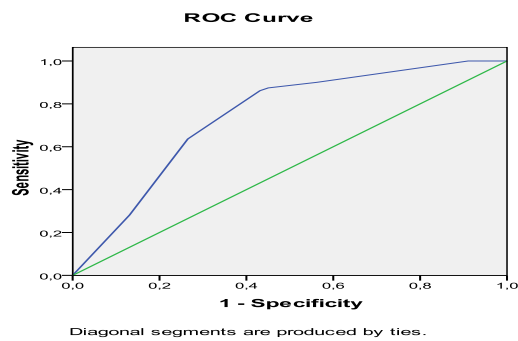
* *Mối liên quan giữa có phôi xấu trước chuyển và kết quả có thai.*

Bảng 3.31. Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi xấu trước chuyển và kết quả có thai.

	Đồng chậm	Thủy tinh hóa
Nhóm phôi ngày 2	OR 1,554 CI 95% (0,649 – 3,722) p= 0,32	OR 1,036 CI 95% (0,473 – 2,271) p= 0,929
Nhóm phôi ngày 3	OR 1,162 CI 95% (0,235 – 5,752) p= 0,853	OR 0,592 CI 95% (0,256 – 1,365) p= 0,216

Nhận xét: Ở cả 2 phương pháp, với cả 2 nhóm phôi ngày 2 và ngày 3, nếu trước chuyển bệnh nhân có phôi (xấu) sẽ làm giảm khả năng có thai hoặc tăng nhưng không có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$.

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



Biểu đồ 3.4. 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.

- Dựa vào đường cong ROC, điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là tại điểm cắt đó đường cong đối chiều, điểm cắt 4 có độ nhạy là 86,1%, độ đặc hiệu 56,9%. Chỉ số J cao nhất = 43%.

Bảng 3.32. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của điểm chuyển phôi.

<u>Điểm chuyển phôi</u>	<u>Độ nhạy (Se)</u>	<u>Độ đặc hiệu (Sp)</u>	<u>Chỉ số J (Se+Sp-1)</u>	<u>Giá trị tiên đoán dương tính</u>
<u>2</u>	<u>0,900</u>	<u>0,438</u>	<u>0,338</u>	<u>0,000</u>
<u>3</u>	<u>0,874</u>	<u>0,55</u>	<u>0,424</u>	<u>0,028</u>
<u>4</u>	<u>0,861</u>	<u>0,569</u>	<u>0,430</u>	<u>0,084</u>
<u>5</u>	<u>0,636</u>	<u>0,735</u>	<u>0,371</u>	<u>0,125</u>
<u>6</u>	<u>0,281</u>	<u>0,869</u>	<u>0,150</u>	<u>0,193</u>

Nhận xét: Điểm chuyển phôi càng cao thì độ nhạy càng giảm, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng cao.

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 trước đông trong tiên lượng kết quả có thai.

*Ở phương pháp đông chậm.

±

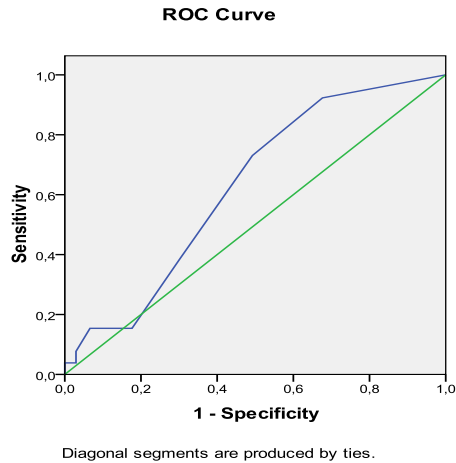
+ Với nhóm phôi ngày 2.

Formatted: Font: 14 pt, Font color: Auto, English (United States)

Formatted: Justified, Line spacing: Multiple 1.2 li

Formatted: Vietnamese

Formatted: Justified, Line spacing: Multiple 1.2 li



Biểu đồ 3.5. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 2 trước đông chậm trong tiên lượng kết quả có thai.

Nhận xét:

Số lượng phôi tốt trước đông có giá trị trong tiên lượng kết quả có thai, dù giá trị tiên lượng không cao vì:

- Diện tích dưới đường cong: 0,626. - P = 0,043.

- Dựa vào đường cong ROC, điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là tại điểm cắt đó đường cong đổi chiều.

Trong nghiên cứu này sẽ chọn điểm cắt có giá trị chẩn đoán thỏa mãn các điều kiện: độ nhạy và độ đặc hiệu đều cao nhưng ưu tiên độ đặc hiệu cao hơn độ nhạy, độ đặc hiệu > 50% và chỉ số (J) cao nhất. Vì vậy điểm cắt 2 là điểm cắt được chọn của số lượng phôi tốt trước trong tiên lượng kết quả có thai.

Bảng 3.33. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 2 trước đông chậm.

Số lượng phôi tốt trước đông	Độ nhạy (Se)	Giá trị chẩn đoán dương tính	Độ đặc hiệu (Sp)	Chỉ số J (J=Se+Sp-1)
0	1,000	0,000	0,000	0,000
1	0,923	0,207	0,324	0,247

2	0,731	0,221	0,507	0,238
3	0,385	0,296	0,699	0,84
4	0,154	0,298	0,824	-0,22
5	0,154	0,302	0,897	0,51
6	0,154	0,307	0,919	0,73
8	0,154	0,308	0,934	0,88
9	0,077	0,333	0,971	0,48
10	0,038	0,400	0,971	0,9
12	0,038	0,450	0,978	0,16
14	0,038	0,500	0,997	0,31
15	0,038	1,000	1,000	0,38

Nhận xét: Tại điểm cắt càng thấp của số lượng phôi tốt trước đông, giá trị tiên lượng kết quả có thai có độ nhạy càng cao, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng thấp. Tại các điểm cắt càng cao giá trị tiên lượng kết quả có thai với độ nhạy càng thấp, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng cao, giá trị tiên đoán dương tính càng cao. Tại điểm cắt = 15, độ đặc hiệu là 100%, giá trị chẩn đoán dương tính là 100%. Nghĩa là nếu trước đông có từ 15 phôi tốt trở lên thì khả năng có thai là 100%.

Điểm cắt 2 có độ nhạy là 73,1%, độ đặc hiệu 50,7%, chỉ số (J) 23,8.

Điểm cắt 1 có độ nhạy là 92,3%, độ đặc hiệu 32,4%, chỉ số (J) 24,7.

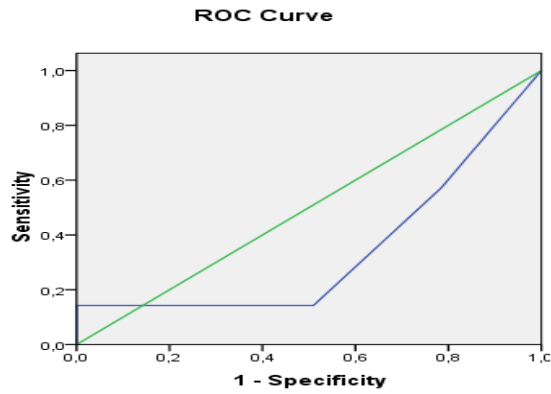
Chọn điểm cắt 2 vì có giá trị chẩn đoán dương tính cao hơn sẽ cho giá trị chẩn đoán phân biệt cao, đồng thời đảm bảo độ đặc hiệu > 50%.

± Với nhóm phôi ngày 3.

Formatted: Font: Not Bold, Not Italic, Font color: Black, Vietnamese, Condensed by 0.2 pt

Formatted: Font: Not Bold, Not Italic, Font color: Black, Vietnamese, Condensed by 0.2 pt

Formatted: Font: 14 pt, Font color: Black, Vietnamese, Condensed by 0.2 pt



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 3 trước đông chậm trong tiên lượng kết quả có thai.

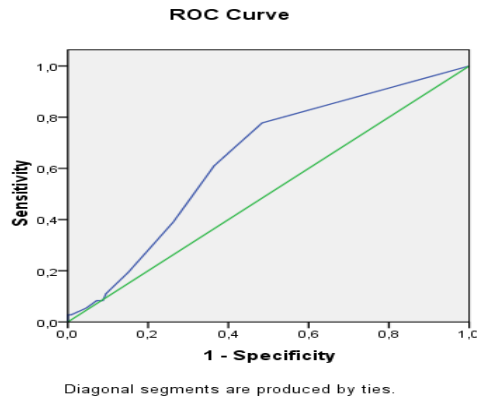
Nhận xét:

Số lượng phôi tốt trước đông không có giá trị trong tiên lượng kết quả có thai vì:

- Diện tích dưới đường cong: 0,34. - P = 0,174.

* Ở phương pháp thủy tinh hóa.

±. Với nhóm phôi ngày 2.



Biểu đồ 3.7. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 2 trước đông thủy tinh hóa trong tiên lượng kết quả có thai.

Nhận xét:

Số lượng phôi tốt trước đông 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

- Dựa vào đường cong ROC, điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là tại điểm cắt đó đường cong đổi chiều.

Trong nghiên cứu này sẽ chọn điểm cắt có giá trị chẩn đoán thỏa mãn các điều kiện: độ nhạy và độ đặc hiệu đều cao nhưng ưu tiên độ đặc hiệu cao hơn độ nhạy, độ đặc hiệu > 50% và chỉ số (J) cao nhất. Vì vậy điểm cắt 1 là điểm cắt được chọn của số lượng phôi tốt trước đông trong tiên lượng kết quả có thai.

Bảng 3.34. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 2 trước đông thủy tinh hóa.

Số lượng phôi tốt trước đông	Độ nhạy (Se)	Giá trị chẩn đoán dương tính	Độ đặc hiệu (Sp)	Chỉ số J (J=Se+Sp-1)
0	1,000	0,000	0,000	0,000
1	0,778	0,315	0,516	0,294
2	0,611	0,324	0,635	0,246
3	0,389	0,358	0,738	0,127
4	0,194	0,369	0,849	0,043
5	0,111	0,375	0,905	0,016
6	0,083	0,389	0,913	-0,004
7	0,083	0,400	0,929	0,012
10	,056	0,450	0,952	0,008
11	,028	0,500	0,992	0,020
17	,028	1,000	1,000	0,028

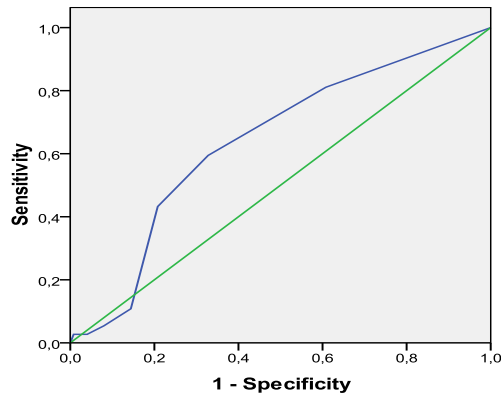
Nhận xét: Tại điểm cắt càng thấp của số lượng phôi tốt trước đông, giá trị tiên lượng kết quả có thai có độ nhạy càng cao, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng thấp. Tại các điểm cắt càng cao giá trị tiên lượng kết quả có thai với độ nhạy càng thấp, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng cao. Tại điểm cắt = 17, độ đặc hiệu là 100%, giá trị chẩn đoán dương tính 100%. Nghĩa là nếu trước đông có từ 17 phôi tốt trở lên thì khả năng có thai là 100%.

Điểm cắt 1 có độ nhạy là 77,8%, độ đặc hiệu 51,6%, chỉ số (J) 29,4.

Chọn điểm cắt 1 vì có tỷ số khả dĩ dương cao nhất sẽ cho giá trị chẩn đoán phân biệt cao, đồng thời đảm bảo độ đặc hiệu > 50%.

[± 3.2.4.7.2.2](#) Với nhóm phôi ngày 3.

ROC Curve



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 3 trước đông thủy tinh hóa trong tiên lượng kết quả có thai.

Nhận xét:

Số lượng phôi tốt trước đông 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

- Dựa vào đường cong ROC, điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là tại điểm cắt đó đường cong đổi chiều.

Trong nghiên cứu này sẽ chọn điểm cắt có giá trị chẩn đoán thỏa mãn các điều kiện: độ nhạy và độ đặc hiệu đều cao nhưng ưu tiên độ đặc hiệu cao hơn độ nhạy, độ đặc hiệu > 50%, độ nhạy > 50% và chỉ số (J) cao nhất. Vì vậy điểm cắt 2 là điểm cắt được chọn của số lượng phôi tốt trước đông trong tiên lượng kết quả có thai.

Bảng 3.35. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 3 trước đông thủy tinh hóa.

Số lượng phôi tốt trước đông	Độ nhạy (Se)	Giá trị chẩn đoán dương tính	Độ đặc hiệu (Sp)	Chỉ số J (J=Se+Sp-1)
0	1,000	0,000	0,000	0,000
1	0,811	0,021	0,392	0,203
2	0,595	0,037	0,672	0,267
3	0,432	0,077	0,792	0,224
4	0,108	0,143	0,856	-0,036
5	0,081	0,200	0,888	-0,031
6	0,054	0,250	0,920	-0,026
8	0,027	0,500	0,968	-0,005
11	0,027	1,000	0,992	0,019

Nhận xét: Tại điểm cắt càng thấp của số lượng phôi tốt trước đông, giá trị tiên lượng kết quả có thai có độ nhạy càng cao, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng thấp. Tại các điểm cắt càng cao giá trị tiên lượng kết quả có thai với độ nhạy càng thấp, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng cao. Tại điểm cắt = 11, giá trị chẩn đoán dương tính là 100%. Nghĩa là nếu trước đông có từ 11 phôi tốt trở lên thì khả năng có thai là 100%.

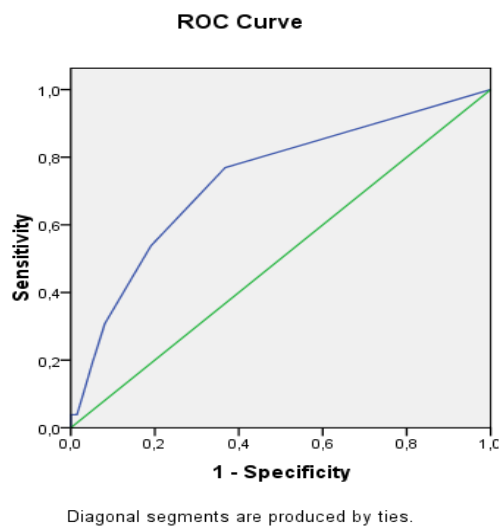
Điểm cắt 2 có độ nhạy là 59,5%, độ đặc hiệu 67,2%, chỉ số (J) 26,7.

Chọn điểm cắt 2 vì có chỉ số J cao nhất sẽ cho giá trị chẩn đoán phân biệt cao, đồng thời đảm bảo độ đặc hiệu > 50%.

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

* Ở phương pháp đông chậm.

± Với nhóm phôi ngày 2.



Biểu đồ 3.9. 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 sau rã có giá trị tốt trong tiên lượng kết quả có thai vì:

- Diện tích dưới đường cong: 0,734. - $P < 0,0001$.

- Dựa vào đường cong ROC, điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là tại điểm cắt đó đường cong đổi chiều. Điểm cắt 1 có độ nhạy là 76,9%, độ đặc hiệu 63,2%, chỉ số (J) cao nhất 40,1.

Formatted: Font: Not Bold, Not Italic, Vietnamese

Formatted: Vietnamese

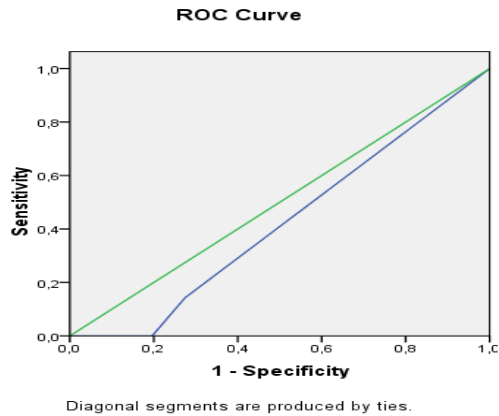
Bảng 3.36. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 2 sau rã đông chậm.

Số lượng phôi tốt sau rã	Độ nhạy (Se)	Độ đặc hiệu (Sp)	Chỉ số J (J= Se+Sp-1)	Giá trị chẩn đoán dương tính
0	1,000	0,000	0,000	0,000
1	0,769	0,632	0,401	0,286
2	0,538	0,809	0,347	0,35
3	0,308	0,919	0,227	0,421
4	0,192	0,949	0,141	0,433
5	0,038	0,985	0,023	0,483
9	0,038	1,000	0,038	1,000

Nhận xét: Tại điểm cắt càng thấp của số lượng phôi tốt sau rã, giá trị tiên lượng kết quả có thai có độ nhạy càng cao, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng thấp. Tại các điểm cắt càng cao giá trị tiên lượng kết quả có thai với độ nhạy càng thấp, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng cao. Tại điểm cắt = 9, độ đặc hiệu là 100%. Nghĩa là nếu sau rã có từ 9 phôi tốt trở lên thì khả năng có thai là 100%.

Trong nghiên cứu này sẽ chọn điểm cắt có giá trị chẩn đoán thỏa mãn các điều kiện: độ nhạy và độ đặc hiệu đều cao nhưng ưu tiên độ đặc hiệu cao hơn độ nhạy, độ đặc hiệu > 50%, độ nhạy > 50% và chỉ số (J) cao nhất. Vì vậy điểm cắt 1 là điểm cắt được chọn của số lượng phôi tốt sau rã trong tiên lượng kết quả có thai.

± Với nhóm phôi ngày 3.



Biểu đồ 3.10. 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.

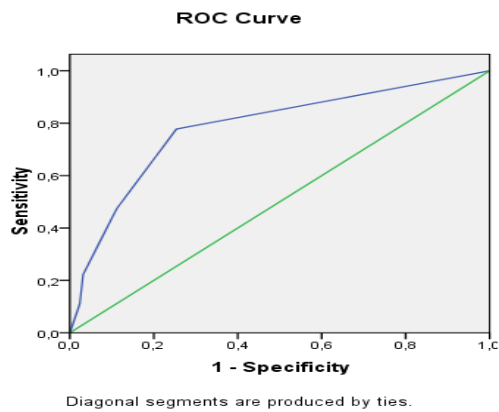
Nhận xét:

Số lượng phôi tốt sau rã không có giá trị trong tiên lượng kết quả có thai vì:

- Diện tích dưới đường cong: 0,42. - $P < 0,492$.

* Ở phương pháp thủy tinh hóa

Formatted: 30, Line spacing: Multiple 1.35 li



Biểu đồ 3.11. 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 sau rã có giá trị tiên lượng khá tốt kết quả có thai vì:

- Diện tích dưới đường cong: 0,783. - $P < 0,0001$.

- Dựa vào đường cong ROC, điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là tại điểm cắt đó đường cong đối chiều, điểm cắt 1 có độ nhạy là 77,8%, độ đặc hiệu 74,6%, chỉ số (J) cao nhất 52,4.

Bảng 3.37. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 2 sau rã thủy tinh hóa

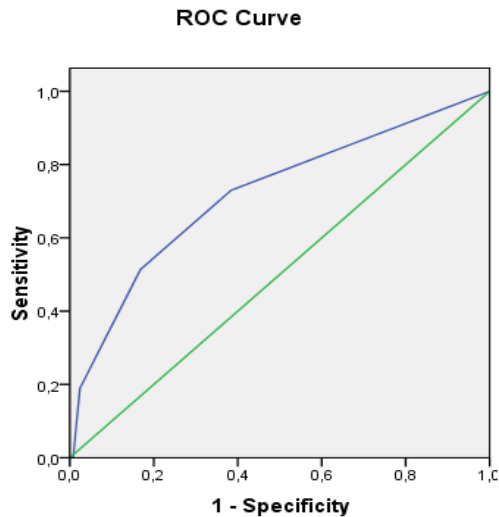
Số lượng phôi tốt sau rã	Độ nhạy (Se)	Độ đặc hiệu (Sp)	Chỉ số J (J=Se+Sp-1)	Giá trị chẩn đoán dương tính
0	1,000	0,000	0,000	0,000
1	0,778	0,746	0,524	0,467
2	0,472	0,889	0,361	0,548
3	0,222	0,968	0,190	0,667
4	0,111	0,976	0,087	0,751
5	0,089	0,989	0,078	0,783

4- Nhận xét: Tại điểm cắt càng thấp của số lượng phôi tốt sau rã, giá trị tiên lượng kết quả có thai có độ nhạy càng cao, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng thấp. Tại các điểm cắt càng cao giá trị tiên lượng kết quả có thai với độ nhạy càng thấp, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng cao.

Trong nghiên cứu này sẽ chọn điểm cắt có giá trị chẩn đoán thỏa mãn các điều kiện: độ nhạy và độ đặc hiệu đều cao nhưng ưu tiên độ đặc hiệu cao hơn độ nhạy, độ đặc hiệu $> 50\%$, độ nhạy $> 50\%$ và chỉ số (J) cao nhất. Vì vậy điểm cắt 1 là điểm cắt được chọn của số lượng phôi tốt sau rã trong tiên lượng kết quả có thai.

Formatted: Normal, Indent: First line: 1.27 cm, Line spacing: 1.5 lines, No bullets or numbering

± Với nhóm phôi ngày 3.



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 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. - $P < 0.0001$.

-Dựa vào đường cong ROC, điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là tại điểm cắt đó đường cong đổi chiều.

Trong nghiên cứu này sẽ chọn điểm cắt có giá trị chẩn đoán thỏa mãn các điều kiện: độ nhạy và độ đặc hiệu đều cao nhưng ưu tiên độ đặc hiệu cao hơn độ nhạy, độ đặc hiệu $> 50\%$, độ nhạy $> 50\%$ và chỉ số (J) cao nhất. Vì vậy điểm cắt 2 là điểm cắt được chọn của số lượng phôi tốt sau rã trong tiên lượng kết quả có thai.

Bảng 3.38. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 3 sau rã thủy tinh hóa.

Số lượng phôi tốt sau rã	Độ nhạy (Se)	Độ đặc hiệu (Sp)	Chỉ số J (J=Se+Sp-1)	Giá trị chẩn đoán dương tính
0	1,000	0,000	0,000	0,000
1	0,730	0,616	0,346	0,360
2	0,514	0,832	0,346	0,475
3	0,189	0,976	0,165	0,700
4	0,160	0,992	0,152	0,780
5	0,090	0,994	0,084	0,890

Nhận xét: Tại điểm cắt càng thấp của số lượng phôi tốt sau rã, giá trị tiên lượng kết quả có thai có độ nhạy càng cao, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng thấp. Tại các điểm cắt càng cao giá trị tiên lượng kết quả có thai với độ nhạy càng thấp, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng cao.

Điểm cắt 2 có độ nhạy là 73%, độ đặc hiệu 61,6%, chỉ số (J) 34,6.

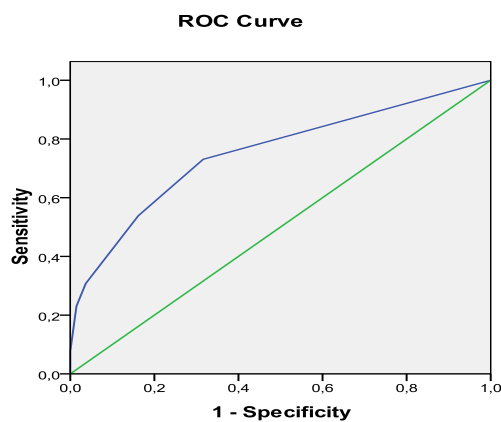
Điểm cắt 1 có độ nhạy là 51,4%, độ đặc hiệu 83,2%, chỉ số (J) 34,6.

Chọn điểm cắt 2 vì có giá trị chẩn đoán dương tính cao hơn.

4. 3.2.4.6.3. Giá trị của số lượng phôi tốt trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai.

*Ở phương pháp đông chậm

+ Với phôi ngày 2.



Formatted: Font: Times New Roman, 14 pt, Bold, Italic, Font color: Black

Formatted: Font: Times New Roman, 14 pt, Bold, Italic, Font color: Black

Formatted: Font: Not Bold, Font color: Black, Vietnamese

Biểu đồ 3.13. 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 trước chuyển có giá trị tốt trong tiên lượng kết quả có thai vì:

- Diện tích dưới đường cong: 0,751. - $P < 0.0001$.

- Dựa vào đường cong ROC, điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là tại điểm cắt đó đường cong đổi chiều, điểm cắt 1 có độ nhạy là 73,1%, độ đặc hiệu 68,4%, chỉ số (J) cao nhất 41,5.

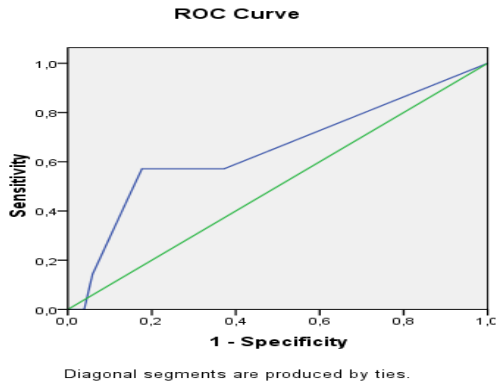
Bảng 3.39. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 2- đông chậm trước chuyển.

Số lượng phôi tốt trước chuyển	Độ nhạy (Se)	Độ đặc hiệu (Sp)	Giá trị tiên đoán dương tính	Chỉ số J (J=Se+Sp-1)
0	1,000	0,000	0,000	0,000
1	0,731	0,684	0,307	0,415
2	0,538	0,838	0,389	0,376
3	0,308	0,963	0,615	0,271
4	0,231	0,985	0,750	0,216
5	0,077	1,000	1,000	0,077

Nhận xét: Tại điểm cắt càng thấp của số lượng phôi tốt trước chuyển, giá trị tiên lượng kết quả có thai có độ nhạy càng cao, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng thấp. Tại các điểm cắt càng cao giá trị tiên lượng kết quả có thai với độ nhạy càng thấp, giá trị tiên đoán dương tính và độ đặc hiệu càng cao. Tại điểm cắt 5, độ đặc hiệu = 100%, giá trị tiên đoán dương tính = 100%. Nghĩa là nếu trước chuyển, có từ 5 phôi tốt trở lên thì khả năng có thai là 100%.

Trong nghiên cứu này sẽ chọn điểm cắt có giá trị chẩn đoán thỏa mãn các điều kiện: độ nhạy và độ đặc hiệu đều cao nhưng ưu tiên độ đặc hiệu cao hơn độ nhạy, độ đặc hiệu > 50%, độ đặc hiệu > 50% và chỉ số (J) cao nhất. Vì vậy điểm cắt 1 là điểm cắt được chọn của số lượng phôi tốt trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai.

± Với phôi ngày 3.



Biểu đồ 3.14. 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.

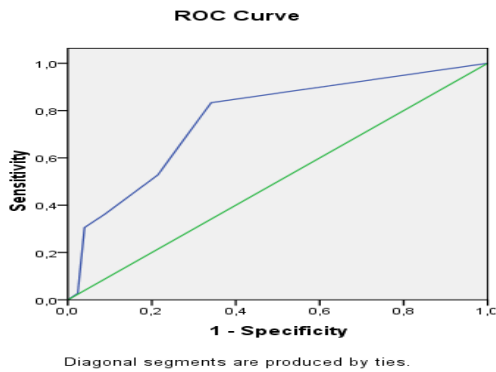
Nhận xét:

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.

* Ở phương pháp thủy tinh hóa.

± Với phôi ngày 2.



Biểu đồ 3.15. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 2- thủy tinh hóa trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai.

Nhận xét:

Số lượng phôi tốt trước chuyển có giá trị tiên lượng khá tốt kết quả có thai vì:

- Diện tích dưới đường cong: 0,766. - $P < 0.0001$.

- Dựa vào đường cong ROC, điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là tại điểm cắt đó đường cong đối chiều, điểm cắt 1 có độ nhạy là 83,3%, độ đặc hiệu 65,9%, chỉ số (J) cao nhất 49,2.

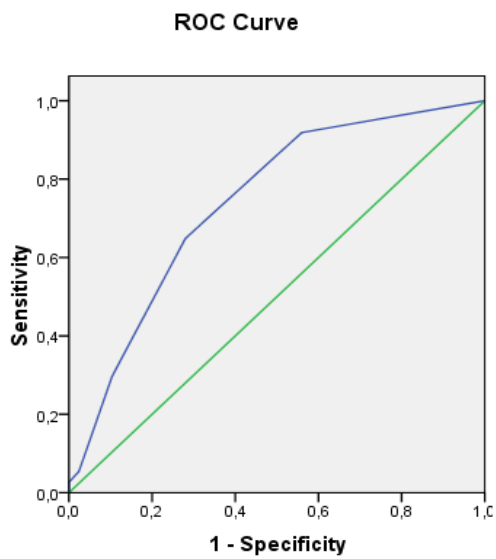
Bảng 3.40. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 2- thủy tinh hóa trước chuyển.

Số lượng phôi tốt trước chuyển	Độ nhạy (Se)	Độ đặc hiệu (Sp)	Giá trị tiên đoán dương tính	Chỉ số J (J=Se+Sp-1)
0	1,000	0,000	0,000	0,000
1	0,833	0,659	0,411	0,492
2	0,528	0,786	0,413	0,314
3	0,361	0,913	0,542	0,274
4	0,306	0,960	0,6875	0,266
5	0,028	0,976	0,725	0,004

Nhận xét: Tại điểm cắt càng thấp của số lượng phôi trước chuyển độ 3, giá trị tiên lượng kết quả có thai có độ nhạy càng cao và độ đặc hiệu càng thấp. Tại các điểm cắt càng cao giá trị tiên lượng kết quả có thai với độ nhạy càng thấp và độ đặc hiệu, giá trị chẩn đoán dương tính càng cao.

Trong nghiên cứu này sẽ chọn điểm cắt có giá trị chẩn đoán thỏa mãn các điều kiện: độ nhạy và độ đặc hiệu đều cao nhưng ưu tiên độ đặc hiệu cao

hơn độ nhạy, độ đặc hiệu > 50%, độ nhạy > 50% và chỉ số (J) cao nhất. Vì vậy điểm cắt 1 là điểm cắt được chọn của số lượng phôi tốt trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai.



Diagonal segments are produced by ties.

Biểu đồ 3.16. Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 3- thủy tinh hóa trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai.

Nhận xét:

Số lượng phôi tốt trước chuyển có giá trị tiên lượng khá tốt kết quả có thai vì:

- Diện tích dưới đường cong: 0,74. - $P < 0,0001$.

- Dựa vào đường cong ROC, điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là tại điểm cắt đó đường cong đối chiều, điểm cắt 2 có độ nhạy là 64,9%, độ đặc hiệu 72%, chỉ số (J) cao nhất 36,9.

Bảng 3.41. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 3- thủy tinh hóa trước chuyển

Số lượng phôi tốt trước chuyển	Độ nhạy (Se)	Độ đặc hiệu (Sp)	Chỉ số J (J=Se+Sp-1)	Giá trị tiên đoán dương tính
0	1,000	0,000	0,000	0,000
1	0,919	0,440	0,359	0,327
2	0,649	0,720	0,369	0,407
3	0,297	0,896	0,193	0,458
4	0,054	0,976	0,030	0,500
5	0,027	1,000	0,027	1,000

Nhận xét: Tại điểm cắt càng thấp của số lượng phôi trước chuyển độ 3, giá trị tiên lượng kết quả có thai có độ nhạy càng cao và độ đặc hiệu càng thấp. Tại các điểm cắt càng cao giá trị tiên lượng kết quả có thai với độ nhạy càng thấp và độ đặc hiệu càng cao. Tại điểm cắt = 5, độ đặc hiệu là 100%. Nghĩa là nếu trước chuyển có từ 5 phôi tốt trở lên thì khả năng có thai là 100%.

Trong nghiên cứu này sẽ chọn điểm cắt có giá trị chẩn đoán thỏa mãn các điều kiện: độ nhạy và độ đặc hiệu đều cao nhưng ưu tiên độ đặc hiệu cao hơn độ nhạy, độ đặc hiệu > 50%, độ nhạy > 50% và chỉ số (J) cao nhất. Vì vậy điểm cắt 2 là điểm cắt được chọn của số lượng phôi tốt trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai.

3.2.2.5. Phân tích hồi quy đa biến các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả có thai ở phương pháp thủy tinh hóa.

Các đặc điểm lâm sàng và các yếu tố trong quá trình chuyển phôi cùng tác động lên kết quả có thai. Sau khi loại bỏ yếu tố “tuổi mẹ” không ảnh hưởng đến tỷ lệ có thai trong phân tích đơn biến, chúng tôi đưa các yếu tố vào phân tích hồi quy nhị biến logistics để xem xét vai trò của các biến khi tác động cùng lúc trong chu kỳ chuyển phôi thủy tinh hóa. Kết quả thu được trình bày trong bảng 3.41.

Bảng 3.42. Phân tích hồi quy đa biến các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả có thai ở phương pháp thủy tinh hóa.

Các chỉ tiêu	Hệ số hồi quy (B)	P	OR hiệu chỉnh	95% C.I.
Điểm chuyển phôi	0,399	0,007	1,490	1,117 - 1,987
Số phôi tốt trước chuyển	0,338	0,005	1,403	1,106 – 1,779
Số phôi tốt sau rã	0,307	0,021	1,360	1,047 – 1,766
Số phôi tốt trước đông	0,089	0,111	1,106	1,002 – 1,325
Số lượng phôi chuyển	0,218	0,045	1,243	1,005 – 1,537
Độ dày NMTC >8- 14mm Khác	0,320	0,025	1,377	0,799 – 2,374

Nhận xét:

- Sau khi đưa vào mô hình hồi quy nhị biến chúng tôi thấy yếu tố: điểm chuyển phôi, số phôi tốt ở các giai đoạn kỹ thuật (trước chuyển/ sau rã/ trước đông), độ dày NMTC và số lượng phôi chuyển có ảnh hưởng đến kết quả có thai có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

- Hệ số hồi quy (B) của 5 yếu tố mang dấu dương, thể hiện số lượng phôi chuyển, điểm chuyển phôi, số lượng phôi tốt ở các giai đoạn kỹ thuật càng cao càng làm tăng khả năng có thai. Mức độ ảnh hưởng của điểm chuyển phôi là cao nhất, do hệ số hồi quy cao nhất (B=0,339), tiếp đến là số phôi tốt trước chuyển, độ dày NMTC, số phôi tốt sau rã, số lượng phôi chuyển. Yếu tố có phôi tốt trước đông tác động thấp nhất (B=0,089).

- Độ dày niêm mạc tử cung từ 8-14mm làm tăng khả năng có thai hơn 1,377 lần so với những chu kỳ có độ dày niêm mạc nằm ngoài khoảng này (95CI= 0,799-2,374).

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.

3.2.3.1.1. Tỷ lệ có thai và diễn tiến thai kỳ sau chuyển phôi đông chậm.

Bảng 3.43. 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	

Nhận xét: So sánh tỷ lệ có thai ở nhóm phôi ngày 2 (15,4%) so với nhóm phôi ngày 3 (12,1%) sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$.

So sánh tỷ lệ đẻ con sống ở nhóm phôi ngày 2 (13%) so với nhóm phôi ngày 3 (7%), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$.

3.2.3.1.2. Tỷ lệ có thai và diễn tiến thai kỳ sau chuyển phôi thủy tinh hóa.

Bảng 3.44. 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	

Nhận xét:

Kết quả có thai trong nghiên cứu của chúng tôi lần lượt là: 22,2% với nhóm phôi ngày 2 và 22,8% với nhóm phôi ngày 3. Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$.

- Sự khác biệt về tỷ lệ đẻ con sống giữa nhóm chuyển phôi đông lạnh ngày 3 (13%) với nhóm ngày 2 (17,3%) là không có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$.

Bảng 3.45. Tỷ lệ có thai và diễn tiến thai kỳ của 2 phương pháp.

Kết quả	Đông chậm		Thủy tinh hóa	
	n	Tỷ lệ	n	Tỷ lệ
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</u> <u>(0,91%)</u>	<u>7</u>	<u>7/324</u> <u>(2,2%)</u>
<u>Đa thai</u>	<u>3</u>	<u>3/220</u> <u>(1,4%)</u>	<u>6</u>	<u>6/324</u> <u>(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: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Font: Not Bold, Vietnamese

Formatted: Font: Not Bold, Vietnamese

Nhận xét: tỷ lệ có thai, tỷ lệ thai ngừng tiến triển, tỷ lệ đẻ con sống của phương pháp thủy tinh hóa có xu hướng cao hơn phương pháp đông chậm.

Cân nặng trung bình khi sinh, tuổi thai trung bình khi sinh của 2 phương pháp có xu hướng không có sự khác biệt.

3.2.3.2. -*Kết quả theo dõi trẻ sau sinh đến khi 4 tuổi của 2 phương pháp.*
 3.2.3.2.1. *Giá trị trung bình của các số đo cân nặng trẻ sơ sinh theo tuổi thai*

Bảng 3.46. 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	

Nhận xét:

- Giá trị cân nặng trung bình của trẻ sơ sinh theo tuổi thai, sau chuyển phôi đông lạnh ở cả 2 phương pháp có xu hướng không khác nhau và không khác với trẻ sinh ra từ thụ thai tự nhiên (* theo biểu đồ của WHO-2007) [96].
- Với phương pháp thủy tinh hóa: Có 6 ca song thai, cân nặng thấp nhất 1900g, tuổi thai thấp nhất 32 tuần.
- Với phương pháp đông chậm: có 1 ca tam thai, giảm thiểu 1 thai, 2 ca song thai, cân nặng thấp nhất 1600g, tuổi thai thấp nhất 33 tuần.

3.2.3.2.2. Giá trị trung bình của các số đo cân nặng, chiều cao trẻ từ 3 tháng đến 4 tuổi

Bảng 3.47. Cân nặng, chiều cao trung bình thô của trẻ sơ trai, gái tương ứng từ 3 tháng đến 4 tuổi.

Tuổi	Đông lạnh (Cân nặng – chiều cao trung bình)		Thủy tinh hóa (Cân nặng – chiều cao trung bình)		Trẻ sinh tự nhiên (Cân nặng – chiều cao trung bình)*		P
	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	$P_{Ia-IIIa}>0,05$ $P_{IIa-IIIa}>0,05$ $P_{Ib-IIIb}>0,05$ $P_{IIb-IIIb}>0,05$
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	

Nhận xét: Giá trị cân nặng, chiều cao trung bình của trẻ từ 3 tháng đến 4 tuổi, sau chuyển phôi đông lạnh ở cả 2 phương pháp có xu hướng không khác nhau và không khác với trẻ sinh ra từ thụ thai tự nhiên (* theo biểu đồ của WHO-2007) [96].

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

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

- Nhóm chuyển phôi đông chậm: Mất đầu 2 trẻ, 26 trẻ khác ghi nhận phát triển trí tuệ, tâm vận động bình thường, không ghi nhận có bệnh lý di truyền, không di tật bẩm sinh.

- Nhóm chuyển phôi thùy tinh hóa: Mất đầu 3 trẻ, 49 trẻ ghi nhận phát triển trí tuệ, tâm vận động bình thường, không có bệnh lý di truyền, không di tật bẩm sinh.

+ 1 trường hợp đẻ non 35 tuần, 2400g, mắc tứ chứng Fallot, sau đẻ 18 ngày chết do trào ngược dạ dày - thực quản. Phát hiện dị tật qua siêu âm lúc thai 30 tuần. 35 tuần vỡ ối, mổ lấy thai. Bệnh nhân xin phôi của người 36 tuổi. Trước chuyển có 4 phôi tốt ngày 2. Trường hợp này mẹ 45 tuổi, lúc mang thai bị tiền sản giật nặng. Năm 2014, BN xin trứng của em gái, quá trình mang thai bình thường, đẻ mổ con trai 3300g, khỏe mạnh (hồ sơ mẹ mã số 1280/13).

+ 1 trường hợp đẻ non thai 32 tuần, 2200g, phát triển thể chất, vận động, trí tuệ chậm hơn so với trẻ cùng tuổi. Đông phôi ngày 3, trước chuyển có 2 phôi tốt, 1 phôi trung bình (hồ sơ mẹ mã số 495/12).

+ 1 trường hợp suy giảm thị lực bẩm sinh, (loạn, cận 2 mắt 3,7- 4 diop). Hiện tại thị lực 2 mắt còn 2/10. Đông phôi ngày 2, trước chuyển có 4 phôi tốt, đẻ đủ tháng 40 tuần, cân nặng khi sinh 3300g. Bỏ mắt cũng mắc tật khúc xạ (loạn, cận 2,5-3 diop) (hồ sơ mẹ mã số 1063/11).

Formatted: Font: 14 pt

Chương 4

BÀN LUẬN

Formatted: Font: 16 pt, Bold, Font color: Auto, Vietnamese

4.1. Bàn luận về phương pháp nghiên cứu.

4.1.1. Đối tượng nghiên cứu và phương pháp nghiên cứu.

Đông lạnh chậm và thủy tinh hóa là 2 phương pháp trữ lạnh được sử dụng phổ biến hiện nay. Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu đánh giá tỷ lệ phôi sống sau rã và kết quả có thai của từng phương pháp.

Một nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên giữa 2 phương pháp sẽ là thiết kế nghiên cứu lý tưởng để đánh giá hiệu quả của 2 phương pháp.

Tuy nhiên, thực tế tại Trung tâm HTSS Quốc gia, tại thời điểm nghiên cứu đã tiến hành trữ phôi mới, theo phương pháp thủy tinh hóa và tiếp tục rã đông những trường hợp phôi đã đông chậm.

Do đó thiết kế nghiên cứu là mô tả [theo dõi dọc](#). Thiết kế nghiên cứu này là tối ưu, rất có giá trị, độ tin cậy cao, cung cấp nhiều thông tin (kể cả các yếu tố gây nhiễu), có thể kiểm định ảnh hưởng nhiều mặt của từng phương pháp trữ lạnh đến sự phát triển của con người từ giai đoạn phôi thai cho đến về sau. Thiết kế nghiên cứu này cho phép người điều tra xác định được cỡ mẫu thích hợp cho 2 nhóm đông chậm và nhóm thủy tinh hóa, đồng thời cho phép tính toán trực tiếp tỷ lệ mới mắc bệnh ở cả 2 nhóm.

Formatted: Vietnamese

Ở nhóm đông chậm những thông tin về số lượng, chất lượng phôi trước đông, kỹ thuật hỗ trợ, lý do đông phôi, tuổi phôi trước đông, được lấy [hồi cứu](#) từ nhật ký lab, được đánh giá và ghi chép bởi các nhân viên có kinh nghiệm. Các thông tin từ thời điểm rã đông trở đi sẽ được nghiên cứu viên trực tiếp thu thập vào phiếu nghiên cứu.

Ở nhóm thủy tinh hóa nghiên cứu viên sẽ thu thập thông tin ngay từ thời điểm trữ phôi trở đi, giúp làm giảm các sai số, tăng độ tin cậy và sức mạnh của nghiên cứu.

4.1.2. Cỡ mẫu nghiên cứu – Đặc điểm nghiên cứu

Cỡ mẫu trong nghiên cứu này, áp dụng theo công thức tính cỡ mẫu của Tổ chức Y tế thế giới có tham chiếu nghiên cứu trước đó, về tỉ lệ thai lâm sàng của chính trung tâm HTSS Quốc gia, để đảm bảo tính khả thi, thực tiễn. Kết quả nghiên cứu phản ánh chính xác, khoa học.

Với tổng số 544 bệnh nhân được theo dõi dọc từ khi trữ đông đến khi có kết quả có thai, sinh sống, là cỡ mẫu đủ lớn.

Với 83 trẻ sinh sống theo dõi dọc đến khi trẻ 4 tuổi là nghiên cứu dài hơi, công phu, chưa từng được thực hiện trước đó tại Việt Nam.

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

4.2.1. Đặc điểm mẫu phôi nghiên cứu

Quá trình trữ lạnh và chuyển phôi trữ diễn ra qua nhiều bước. Mỗi bước kỹ thuật đều tác động đến phôi và ảnh hưởng tới kết quả có thai. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã nghiên cứu sự thay đổi về số lượng và chất lượng phôi sau mỗi bước kỹ thuật và mối liên quan với kết quả có thai.

Ở cả 2 phương pháp trữ đông, tất cả số phôi còn dư đều được trữ lạnh, sau khi đã chấm điểm chất lượng phôi. Mục đích của việc lựa chọn này nhằm nghiên cứu mối liên quan chất lượng phôi trước đông với khả năng sống sau rã và khả năng phân chia tiếp của cả 3 loại phôi tốt, phôi trung bình, phôi xấu.

Trong nghiên cứu này, với tổng số 2245 phôi rã đông, bao gồm 919 phôi tốt, 681 phôi trung bình, 645 phôi xấu (bảng 3.1; bảng 3.2), là số lượng phôi đủ lớn, phân bố chuẩn, đủ để đưa ra kết luận đảm bảo khoa học, mang tính đại diện cho quần thể.

4.2.2. Mối tương quan về số lượng phôi qua các bước kỹ thuật.

Trong trữ và rã đông phôi, sau mỗi bước kỹ thuật, phôi đều chịu sự tác động dẫn tới sự thay đổi về số lượng và chất lượng. Câu hỏi đặt ra là: dựa vào số lượng và chất lượng phôi trước đông có thể dự đoán được số lượng và chất

lượng phôi sau rã, trước chuyển hay không? Để tìm hiểu chính xác sự thay đổi số lượng của các loại phôi tốt, trung bình, xấu qua các bước kỹ thuật, ở 2 phương pháp, chúng tôi tìm hiểu hệ số tương quan và mô hình hồi quy tuyến tính như sau:

4.2.2.1. *Mối tương quan giữa số lượng phôi trước đông và số lượng phôi sau rã.*

Việc tìm hiểu mối tương quan giữa số lượng phôi trước đông và số lượng phôi sau rã của cả 3 loại: (tốt, trung bình, xấu) có ý nghĩa đánh giá tác động của quy trình trữ lạnh lên phôi, đồng thời xác định khả năng bảo toàn chất lượng của từng loại phôi.

* *Với phôi tốt (Bảng 3.3):*

- Ở cả 2 phương pháp trữ lạnh, sau thống kê đều cho kết quả hệ số tương quan kém chặt ($r < 0,5$) giữa số lượng phôi tốt trước đông và số lượng phôi tốt sau rã; trừ nhóm phôi ngày 2- thủy tinh hóa ($r = 0,585$). Điều đó có nghĩa là do ảnh hưởng của quá trình đông lạnh chậm nên không thể dự đoán được số lượng phôi tốt sau rã dựa vào số lượng phôi tốt trước đông.

Có thể, ở nhóm phôi ngày 2, do có số lượng phôi bào ít hơn nhóm phôi ngày 3, nên tác động của chất bảo quản đông lạnh và quá trình trữ và rã đông thủy tinh hóa ít hơn (68,9%) so với nhóm phôi ngày 3 (81,8%). Kết quả là: số lượng và chất lượng của nhóm phôi tốt ngày 2 ít bị biến đổi hơn so với nhóm phôi ngày 3.

Tác giả Zdrovka Velera (2013) nghiên cứu trên nhóm phôi ngày 2 đông lạnh nhận thấy: 78% các chu kỳ có phôi tốt trước đông ($n=1319$), thì ít nhất sau rã vẫn còn phôi chất lượng tốt [96].

Tóm lại: dù có mối tương quan tuyến tính giữa số lượng phôi tốt trước đông và số lượng phôi tốt sau rã, nhưng mối tương quan này kém chặt, đặc biệt với phương pháp đông lạnh chậm và ở nhóm phôi ngày 3. Điều này thể hiện quá trình hạ nhiệt chậm gây tổn hại tế bào nhiều hơn quá trình thủy tinh hóa. Ở cả 2 phương pháp, với phôi có số lượng phôi bào lớn hơn sẽ bị tổn hại nhiều hơn.

* *Với phôi trung bình. (Bảng 3.4):* Ở cả 2 phương pháp: số lượng phôi độ 2 (trung bình) trước đông không có ý nghĩa dự báo cho số lượng phôi độ 2 (trung bình) sau rã.

* *Với phôi xấu. (Bảng 3.5):* Số lượng phôi xấu sau rã tăng lên, do đó, số lượng xấu phôi trước đông không có ý nghĩa dự báo cho số lượng phôi xấu sau rã.

Nguyên nhân khá dễ hiểu, là do ảnh hưởng của quá trình trữ và rã đông làm cho một số phôi độ 2 (trung bình) bị giảm chất lượng, chuyển thành phôi độ 1 (xấu), thậm chí bị thoái hóa. Ngay cả phôi (tốt) cũng không còn giữ nguyên được chất lượng như trước đông, sẽ giảm thành phôi độ 2 (trung bình), độ 1 (xấu), hay thoái hóa. Kết quả là: số lượng phôi độ 1 (xấu) sau rã tăng lên, số lượng phôi độ 3 (tốt) giảm đi và số lượng phôi độ 2 (trung bình) thay đổi.

4.2.1.2 *Mối tương quan giữa số lượng phôi sau rã và số lượng phôi trước chuyển.*

Xác định mối tương quan giữa số lượng phôi sau rã và số lượng phôi trước chuyển của cả 3 loại: (tốt, trung bình, xấu), lại có ý nghĩa đánh giá kỹ thuật nuôi cấy phôi sau rã đông, đồng thời xác định khả năng phân chia tiếp của từng loại phôi.

* *Với phôi tốt. (Bảng 3.6):* Ở cả 2 phương pháp, có mối tương quan tuyến tính chặt giữa số lượng phôi (tốt) sau rã và số lượng phôi (tốt) trước chuyển. Điều này có nghĩa: quá trình nuôi cấy phôi sau rã là khá tốt, ít ảnh hưởng và ít làm thay đổi chất lượng phôi, đặc biệt với phôi tốt.

* *Với phôi trung bình. (Bảng 3.7):* Ở cả 2 phương pháp, có mối tương quan tuyến tính giữa số lượng phôi độ 2 (trung bình) sau rã và số lượng phôi độ 2 (trung bình) trước chuyển, nhưng tương quan này kém chặt. Đặc biệt, nhóm phôi ngày 2- đông chậm không có tương quan.

- Nguyên nhân: số phôi độ 2 trước chuyển = số phôi độ 2 sau rã gửi nguyên được chất lượng phôi + một số phôi độ 3 sau quá trình rã và nuôi cấy bị ảnh hưởng và làm thay đổi chất lượng phôi chỉ còn được độ 2.

* *Với phôi xấu. (Bảng 3.8): Ở cả 2 phương pháp trữ lạnh: Có mối tương quan tuyến tính chặt giữa số lượng phôi (xấu) sau rã và số lượng phôi (xấu) trước chuyển. Trừ nhóm phôi ngày 2- thủy tinh hóa có tương quan kém chặt.*

Tóm lại, với phôi xấu sau rã, dù được nuôi cấy thêm 1 ngày trước chuyển, cũng không làm thay đổi chất lượng phôi.

4.2.1.3. Mối tương quan giữa số lượng phôi (tốt) trước đông và số lượng phôi (tốt) trước chuyển.

Với cả 2 phương pháp, do ảnh hưởng của quá trình trữ lạnh và rã đông, số lượng phôi tốt trước đông và số lượng phôi tốt trước chuyển, có liên quan tuyến tính nhưng kém chặt (bảng 3.9).

Dù vậy, trong thực hành trữ phôi tại lab, câu hỏi được đặt ra là: Nếu muốn thu được 1 đến 2 phôi tốt trước chuyển thì trước đông cần trữ bao nhiêu phôi? Và nên trữ bao nhiêu phôi trên 1 cọng rạ, để chủ động tiên lượng số phôi tốt thu được trước chuyển và tiên lượng kết quả có thai; đồng thời tiết kiệm số cọng rạ và số phôi cho mỗi lần trữ và rã đông? Câu trả lời: để thu được từ 1 đến 2 phôi tốt trước chuyển thì số lượng phôi cần trữ là bội số chung nhỏ nhất của số lượng được tính theo phương trình tương quan tại bảng 3.10. Số lượng phải trữ là 4 phôi cho cả 2 phương pháp. Có thể trữ 4 phôi trên 1 cọng rạ, với 2 giọt môi trường, mỗi giọt môi trường chứa 2 phôi. Khi rã 4 phôi, có khả năng thu được cao nhất là 2 phôi tốt cho phương pháp thủy tinh hóa. Trường hợp, không thu được phôi tốt nào có thể xem xét rã tiếp cọng thứ 2.

4.2.3. Đánh giá chất lượng phôi sau rã và trước chuyển.

4.2.3.1. Đánh giá chất lượng phôi trước đông, sau rã, trước chuyển tính theo trung bình số phôi/chu kỳ FET.

* *Diễn biến chất lượng phôi theo các thời điểm: trước đông, sau rã, trước chuyển.*

Từ kết quả nghiên cứu và phân tích trên cho thấy rằng: do tác động của quá trình trữ lạnh, số lượng phôi sống sau rã đông giảm, do một số lượng không nhỏ phôi thoái hóa hoàn toàn. Số lượng các loại phôi tốt, trung bình,

xấu thay đổi rất nhiều. Những biến đổi về lượng đó đã dẫn tới sự biến đổi về chất, thể hiện ở biểu đồ 3.1. Cụ thể là, so với trước đông: Trung bình số phôi độ 2 – độ 3 sau rã/ chu kỳ FET đều giảm có ý nghĩa thống kê, ($p < 0,05$), nhưng trung bình số phôi độ 1 sau rã/ chu kỳ FET tăng, ($p < 0,05$).

Sau rã đông, phôi được hỗ trợ phôi thoát màng và nuôi qua đêm: phôi xấu (độ 1) và phần lớn phôi trung bình (độ 2) vẫn không phân chia tiếp, không cải thiện chất lượng, thậm chí thoái hóa tiếp. Kết quả là, so với sau rã: Trung bình số phôi độ 1- độ 2 trước chuyển/ chu kỳ FET đều giảm. Tuy nhiên, trung bình số phôi tốt (độ 3) trước chuyển/ chu kỳ FET có xu hướng tăng. Kết quả này có được là do, quy trình nuôi cấy sau rã đông là rất tốt, không làm giảm chất lượng phôi, đặc biệt là phôi độ 3. Ngoài ra, một số phôi độ 2 trong quá trình nuôi cấy sau rã đông, những phôi bào “khỏe mạnh” đã phát triển bù trừ và phân chia tiếp, tạo thêm được một số phôi hình thái tốt vào ngày 3, giúp cho trung bình số phôi độ 3 trước chuyển/ chu kỳ FET tăng lên. Đặc biệt, ở nhóm phôi ngày 3 – thủy tinh hóa, trung bình số phôi độ 3 trước chuyển/ chu kỳ FET tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

** Phương pháp đông chậm:*

Ban đầu, chất lượng phôi trước đông không có sự khác biệt giữa 2 nhóm tuổi phôi (ngày 2 và ngày 3) với $p > 0,05$ (Bảng 3.11).

Sau rã: hai nhóm tuổi phôi đã có sự khác nhau về chất lượng phôi: Trung bình số phôi xấu /chu kỳ FET 2 nhóm tuổi phôi là như nhau. Nhưng, trung bình số phôi tốt/ chu kỳ FET của nhóm phôi ngày 2 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm phôi ngày 3. Đồng thời, trung bình số phôi độ 2/chu kỳ FET của nhóm ngày 2 thấp hơn so với nhóm ngày 3 với $p < 0,05$ (Bảng 3.12).

Điều này nói nên rằng: cùng là phôi chất lượng tốt, nhưng sau rã đông, nhóm phôi ngày 2 bảo toàn chất lượng tốt hơn phôi ngày 3. Phải chăng, do nhóm phôi ngày 3 có số lượng phôi bào lớn hơn, nên trong quá trình đông lạnh chậm, số phôi bào bị tổn thương nhiều hơn?

Chất lượng phôi trước chuyển của 2 nhóm tuổi phôi là tương đương ($p > 0,05$) (Bảng 3.13). Như vậy, dù trung bình số phôi tốt sau rã/chu kỳ FET ở nhóm ngày 2 cao hơn nhóm ngày 3. Nhưng sau rã đông, trong quá trình phát triển sinh lý, giai đoạn từ 4 đến 6 tế bào, phôi ngày 2 hay bị block (ngừng phát triển). Trái lại các phôi ngày 3 đã trải qua giai đoạn này trước khi bước vào giai đoạn trữ lạnh nên có thể khả năng sống và phát triển của phôi tốt hơn so với phôi ngày 2. Kết quả là: trung bình số phôi tốt trước chuyển/chu kỳ FET của 2 nhóm tuổi phôi là như nhau.

** Phương pháp thủy tinh hóa:*

- Trước đông trung bình số phôi tốt/chu kỳ FET của 2 nhóm phôi ngày 2 và ngày 3 là như nhau (Bảng 3.11). Kết quả thu được sau rã đông và trước chuyển phôi: trung bình số phôi tốt/chu kỳ FET của 2 nhóm tuổi phôi cũng tương đương nhau, $p > 0,05$ (bảng 3.12; bảng 3.13).

Trong nghiên cứu này, trung bình số phôi độ 2 trước đông/chu kỳ FET của nhóm phôi ngày 2 cao hơn nhóm phôi ngày 3 có ý nghĩa thống kê, $p < 0,05$ (bảng 3.11). Điều này làm cho sau rã đông và trước chuyển phôi trung bình số phôi độ 2/chu kỳ FET, trung bình số phôi xấu (độ 1) /chu kỳ FET của nhóm phôi ngày 2 cao hơn nhóm phôi ngày 3, khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p < 0,05$ (bảng 3.12; bảng 3.13).

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

** Phương pháp đông chậm. (Bảng 3.14):*

- Với nhóm phôi ngày 2: ở nghiên cứu này, tỷ lệ phôi sống sau rã (62,5%) và tỷ lệ phôi sống nguyên vẹn sau rã là (39,3%) thấp hơn nghiên cứu của Mojtaba R. V- 2009 [97] là 82,8% và 56,2%. Còn trong nghiên cứu của Kuwayama M -2005 [29] chỉ trừ những phôi chất lượng tốt (4-6 tế bào, có dưới 20% mảnh vỡ bào tương), thì tỷ lệ sống của phôi ngày 2 còn cao hơn là 91%.

- Với nhóm phôi ngày 3: tỷ lệ phôi sống sau rã của nghiên cứu này (56,5%) thấp hơn nghiên cứu của Rama Raju- 2008 [98] là 60%, Li Y-2007

[99] là 91%, Balaban -2008 [100] là 88,7% do 2 tác giả này cũng chỉ chọn phôi tốt (có 6-8 tế bào, dưới 20% mảnh vỡ bào tương) để trữ. Cũng theo tác giả Balaban -2008, tỷ lệ phôi phân chia tiếp là 49,5%, cao hơn của nghiên cứu này là 21%.

Tỷ lệ phôi sống và tỷ lệ phôi có các phôi bào sống nguyên vẹn sau rã đông khi sử dụng phương pháp đông lạnh chậm là khá thấp. Hơn nữa số liệu của chúng tôi cũng cho thấy rằng tỷ lệ phôi thoái hoá hoàn toàn và số chu kỳ không có phôi chuyển do toàn bộ số phôi trữ bị thoái hoá là cao. Chính vì vậy, số lượng phôi rã đông trong mỗi chu kỳ chuyển phôi trữ là khá cao.

** Phương pháp thủy tinh hóa:*

- Tỷ lệ phôi sống sau rã ở nhóm phôi ngày 2 (78,9%) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm phôi ngày 3 (70,3%), $p < 0,05$.

- Tỷ lệ phôi thoái hoá hoàn toàn của nhóm phôi ngày 2 (25,6%) thấp hơn nhóm phôi ngày 3 (31,1%) có ý nghĩa thống kê, $p < 0,05$.

- Tỷ lệ phôi phân chia tiếp trên tổng số phôi sống sau rã đông trong nghiên cứu này khá thấp (56,7%) cho nhóm phôi ngày 2, (51,9%) cho nhóm phôi ngày 3. Tỷ lệ phôi phân chia tiếp của nhóm phôi ngày 2 cao hơn nhóm phôi ngày 3 có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

** So sánh với các nghiên cứu khác:*

- Theo nghiên cứu hồi cứu của tác giả Chi F- 2013 [101], tỷ lệ phôi sống sau rã đông của 2 nhóm là tương đương: nhóm ngày 2 (92,7%), nhóm ngày 3 (92,8%) khi tác giả chỉ chọn phôi tốt, đồng nhất về số lượng cho 2 nhóm.

- Tỷ lệ sống (78,9%) và tỷ lệ sống nguyên vẹn (67,3%) của phôi ngày 2 thấp hơn nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Lan -2011 [102] lần lượt là 100% và 99,1%. Nguyên nhân của sự thấp hơn này có thể là do sự khác nhau khi lựa chọn phôi trữ. Chúng tôi lấy cả 3 loại phôi: tốt, trung bình, xấu để trữ. Còn trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Lan chỉ trữ những phôi chất lượng tốt (4-6 tế bào, có dưới 20% mảnh vỡ bào tương).

- Tỷ lệ phôi ngày 3 sống sau rã (70,3%) thấp hơn nghiên cứu của Rama Raju -2009 [103] là 90,37%, Nina Desai -2010 [104] là 93,5%. do các tác giả này cũng chỉ chọn phôi tốt (có 6-8 tế bào, dưới 20% mảnh vỡ bào tương) để trữ.

- Theo nghiên cứu Giovanna Fasano-2014 [105], áp dụng thủy tinh hoá với môi trường của Vitrolife cho phôi ở giai đoạn phân chia (gồm phôi ngày 2 có 4-6 tế bào- ngày 3 có 8-12 tế bào, các tế bào đồng đều, <30% mảnh vỡ bào tương) thì tỷ lệ phôi sống là 87,6%, tỷ lệ sống nguyên vẹn sau rã là 76,1%, tỷ lệ phôi phân chia tiếp sau nuôi qua đêm là 81,3%.

Như vậy, với cả hai phương pháp trữ lạnh, việc lựa chọn trữ thêm phôi xấu và trung bình không làm tăng tỷ lệ phôi sống, phôi phân chia tiếp, thậm chí làm tăng tỷ lệ phôi thoái hóa hoàn toàn so với các nghiên cứu khác chỉ trữ các phôi tốt.

* So sánh giữa 2 nhóm phôi:

- 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. Như Salumets A (2003) thấy tỷ lệ sống của phôi ngày 2 là 61,7% cao hơn có ý nghĩa so với nhóm ngày 3 (43,1%) [56]. 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 trữ lạnh 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, so sánh ngẫu nhiên tỷ lệ sống của phôi ngày 3 (84,3%), và tỷ lệ sống nguyên vẹn (74,5%) sau thủy tinh hóa cao hơn có ý nghĩa thống kê so với đông chậm (52,5%), (28,6%) [106].

Tác giả Zhu HY-2015, hồi cứu đánh giá phôi ngày 3 sau đông chậm có tỷ lệ phôi sống (91,3%), tỷ lệ phôi nguyên vẹn (68,7%), tỷ lệ phôi chất lượng tốt sau rã đông thấp hơn thủy tinh hóa lần lượt (97,4%, 92,3%) [107].

Tác giả Kaartinen N -2016, hồi cứu đông phôi giai đoạn phân chia, so sánh tỷ lệ phôi sống sau thủy tinh hóa (83,4%) cao hơn đông chậm (61,4%) có ý nghĩa thống kê [108]. Nhiều tác giả khác cũng cho kết quả tương tự: Balaban B – 2008, Levron J- 2014, Rezazadeh Valojerdi M- 2009, Van Landuyt L- 2013, Liu SY- 2013, Sifer C - 2012. [109,110,111,112, 113, 114].

Cũng theo tác giả Giovanna Fasano (2014) tiến hành thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng, so sánh trữ lạnh phôi chất lượng tốt, giai đoạn phân chia, ở 568 bệnh nhân (tuổi trung bình $33,4 \pm 5,2$), bằng phương pháp thủy tinh hóa, trên hệ thống kín, với 2 môi trường khác nhau (IVINE chứa DMSO và Vitrolife không chứa DMSO) với phương pháp đông lạnh chậm. KẾT QUẢ: Tổng cộng có 1055 phôi được rã đông, 836 (79,2%) phôi sống và 676 được chuyển (64,1%). Tỷ lệ sống sau rã của thủy tinh hóa (Irvine: 89,4%; Vitrolife: 87,6%) cao hơn đáng kể so với đông lạnh chậm (63,8%) ($p < 0,001$). Không có sự khác biệt về tỷ lệ sống sau rã được quan sát giữa hai phương pháp thủy tinh hóa. Tỷ lệ sống nguyên vẹn sau rã, của phôi

trong cả hai phương pháp thủy tinh hóa cao hơn đáng kể so với phôi đông lạnh chậm ($p < 0,001$). Tỷ lệ phôi phân chia tiếp cao hơn đáng kể với các phương pháp thủy tinh hóa (Irvine: $p < 0,001$; Vitrolife: $p < 0,05$) so với đông lạnh chậm. Khi sử dụng Irvine so với Vitrolife, tỷ lệ phôi phân chia tiếp cao hơn đáng kể đã được quan sát ($p < 0,05$) [105].

Kết quả nghiên cứu này tương tự tác giả Van Landuyt L (2013): phân tích hồi quy logistic cho thấy: với phôi tốt ngày 3, dù ảnh hưởng của mất phôi bào do quá trình trữ lạnh, sau khi nuôi qua đêm, trong môi trường nuôi cấy invitro, phôi thủy tinh hóa có tỷ lệ sống cao hơn (94,3%), tỷ lệ phôi sống nguyên vẹn (77,5%), phân chia tiếp tốt hơn phôi đông chậm (64,3%; 39,2%). ($P < 0,001$). Khả năng phân chia tiếp giảm theo mức độ thiệt hại tế bào ($p < 0,001$). Nếu phôi tiếp tục phân chia sau rã đông, sẽ không có ảnh hưởng của số lượng tế bào bị mất hoặc phương pháp trữ lạnh đối với khả năng làm tổ. Tỷ lệ làm tổ của phôi với 0, 1 hoặc 2 phôi bào bị hư hỏng lần lượt là 21% ($n = 114$), 21% ($n = 28$) và 20% ($n = 12$) sau khi đông lạnh chậm và 20% ($n = 50$), 21% ($n = 5$) và 27% ($n = 4$) sau khi thủy tinh hóa [112].

Mặc dù tác giả không chứng minh được rằng: phôi thủy tinh hóa khả thi hơn phôi đông lạnh chậm về kết quả mang thai, nhưng cũng công nhận rằng: thủy tinh hóa mang lại tỷ lệ sống cao hơn, phát triển qua đêm tốt hơn. Điều này làm tăng số lượng chu kỳ chuyển đông lạnh có nguồn gốc từ một chu kỳ kích thích buồng trứng duy nhất và có thể dẫn đến kết quả có thai cộng dồn tốt hơn.

Tóm lại, tất cả các nghiên cứu trên cùng với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, đều nhận thấy: đông phôi thủy tinh hóa cho tỷ lệ phôi sống, tỷ lệ phôi sống nguyên vẹn, tỷ lệ phôi phân chia tiếp cao hơn đông chậm có ý nghĩa thống kê.

4.3. Bàn luận về một số yếu tố liên quan và tiên lượng của 2 phương pháp đông chậm và thủy tinh hóa.

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

4.3.1.1. Tuổi.

Trong nghiên cứu này chúng tôi chọn 220 BN chuyển phôi đông chậm (162 BN chuyển phôi ngày 2, 58 BN chuyển phôi ngày 3), 324 BN chuyển phôi thủy tinh hóa (162 BN chuyển phôi ngày 2, 162 BN chuyển phôi ngày 3). 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. Một số ít trường hợp khác, do hoàn cảnh cá nhân hoặc thời gian vô sinh kéo dài, độ tuổi thực hiện chuyển phôi đông lạnh là ≥ 40 tuổi. Phần lớn các trường hợp này đã xin trứng. BN lớn tuổi nhất thực hiện chuyển phôi đông lạnh, ở cả 2 phương pháp là 57 tuổi, đều xin trứng.

Do độ tuổi được tính vào thời điểm chuyển phôi trữ và quyết định nhận vào nghiên cứu các trường hợp bệnh nhân lớn tuổi chuyển phôi đông lạnh, có xin trứng – xin phôi, 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 [51]. 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.

Hiệu quả dự đoán của độ dày nội mạc tử cung trên thụ thể tử cung đã được thảo luận trong nhiều năm với các kết luận trái ngược nhau. Trong các

nghiên cứu về chu kỳ IVF tươi, nhiều nhà nghiên cứu đã báo cáo có mối tương quan dương giữa độ dày nội mạc tử cung và kết cục IVF [48], [50], [60], [61], [66]. Trong khi đó, các nghiên cứu khác không thể thiết lập mối liên hệ đáng kể giữa độ dày nội mạc tử cung và kết cục lâm sàng sau khi điều trị IVF [56], [67], [68]. Tuy nhiên, nội mạc tử cung mỏng thường được coi là có liên quan với tỷ lệ làm tổ thấp hơn, tỷ lệ thai lâm sàng hoặc tỷ lệ sinh sống thấp, mặc dù không có điểm cắt đồng thuận tồn tại. Một số nghiên cứu kết luận rằng độ dày nội mạc tử cung dưới giá trị tối thiểu 6-8 mm cho thấy giá trị tiên đoán âm tính đối với các kết cục IVF [48], [49], [60], [62], [66]. Tuy nhiên, một thai kỳ thành công vẫn có thể đạt được mặc dù nội mạc tử cung mỏng [69]. Trong các nghiên cứu về chu kỳ FET, cũng không có sự đồng thuận về việc liệu độ dày nội mạc tử cung có thể dự đoán kết cục FET hay không. Một số nghiên cứu cho thấy độ dày nội mạc tử cung là một yếu tố dự báo tích cực về kết quả lâm sàng [52 - 55] trong khi những người khác cho thấy không có tác dụng [51], [57], [58]. Nhưng độ dày nội mạc tử cung 8 mm đã được sử dụng rộng rãi làm điểm cắt chuẩn bị nội mạc tử cung trong chu kỳ FET.

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. Thực tế, trong nghiên cứu này, độ dày NMTC mỏng nhất tiến hành chuyển phôi (đông chậm là 4mm, thủy tinh hóa là 5,7mm), độ dày NMTC dày nhất (đông chậm là 14mm, thủy tinh hóa là 17mm).

Từ đó, chúng tôi đã tìm thấy một mối tương quan đáng kể giữa độ dày nội mạc tử cung và kết quả thai lâm sàng, thông qua xây dựng đường cong ROC của độ dày NMTC cho việc đánh giá giá trị tiên đoán của nó đối với kết cục lâm sàng (biểu đồ 3.2).

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%, tại điểm cắt này đường cong đối chiều [Biểu đồ 3.2].

Tại điểm cắt = 14,15mm, độ đặc hiệu là 100%. Nghĩa là không có ai có thai mà độ dày NMTC > 14mm [Bảng 3.20].

Điểm cắt được tìm ra trong nghiên cứu này của chúng tôi trùng khớp với khá nhiều nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới như: Junwei Yang (2018) [115] tìm thấy điểm cắt là 8,25 mm (độ nhạy 73,0% và độ đặc hiệu là 32,8%), tuy nhiên diện tích dưới đường cong ROC độ dày nội mạc tử cung là 0,534 (KTC 95%, 0,504–0,565) nên rất ít giá trị dự báo. Zhang T (2018) tìm ra điểm cắt là 8,75mm [116].

Khi đánh giá tỷ suất chênh về kết quả có thai giữa các nhóm độ dày NMTC nhận thấy: Nếu niêm mạc tử cung 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 niêm mạc tử cung ≤ 8 mm hoặc > 14 mm, sẽ làm giảm khả năng có thai xuống còn 36,3% và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), (bảng 3.21).

Khi phân tích hồi quy đa biến, chúng tôi thấy rằng độ dày NMTC vào ngày chuyển phôi ảnh hưởng đáng kể tới kết quả có thai và độc lập với yếu tố khác ($p=0.025$), (bảng 3.42).

Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi tương tự nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy tỷ lệ có thai giảm khi NMTC < 8 mm hoặc > 14 mm. Như Bu-Z (2016) hồi cứu trên 2997 bệnh nhân chuyển phôi đông lạnh nhận thấy: nhóm độ dày NMTC từ 8-13mm làm tăng tỷ lệ có thai lâm sàng lên 1,39 lần (CI 95%, 1,1-1,77, $p < 0,01$). Tác giả cũng kết luận rằng: đối với bệnh nhân chuyển phôi đông lạnh, độ dày NMTC vào ngày chuyển phôi ảnh hưởng đáng kể tới kết quả có thai và độc lập với yếu tố khác [117].

Kết quả trung bình độ dày NMTC ở 2 nhóm chuyển phôi đông chậm và thủy tinh hóa từ 9-10mm. (Bảng 3.18). Kết quả thu được sau khi dùng estradiol và progesteron ngoại sinh (liều estradiol thay đổi từ 6-8mg/ ngày, thời gian kéo dài trung bình 10,9 ngày (tối thiểu 8 ngày, tối đa 15 ngày, liều progesteron 400mg/ngày $\times 2$ ngày). So sánh với các nghiên cứu khác sử dụng GnRHa ức chế tuyến yên trước khi dùng estradiol và progesteron hay kích

thích nhẹ buồng trứng bằng FSH, như nghiên cứu của Peeraer K (2015) dùng HMG liều 37,5-75 ui/ ngày, thời gian dùng trung bình 13,7 ngày (CI 95% 13,2-14,2) cũng mới đạt được độ dày NMTC là 8,9mm [117]. Hoặc như nghiên cứu của Phan Thị Thanh Lan (2007): ở nhóm có sử dụng GnRHa ức chế tuyến yên trước khi dùng estradiol và progesteron, vào ngày chỉ định dùng progesteron độ dày NMTC là $8,97 \pm 0,89$. Nhóm chỉ sử dụng estradiol và progesteron như trên, độ dày NMTC là $9,28 \pm 2,23$. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê [72].

Như vậy, phác đồ dùng nội tiết ngoại sinh với liều như trên là khá tối ưu cho chuẩn bị NMTC trước chuyển phôi đông lạnh. Phác đồ này đơn giản trong theo dõi điều trị, ít tác dụng phụ, hiệu quả đạt được rất tốt, đồng thời tiết kiệm hơn về chi phí.

4.3.2. Bàn luận về một số yếu tố ảnh hưởng đến kết quả có thai.

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).

- Dựa vào đường cong ROC, điểm cắt có giá trị trong chẩn đoán là tại điểm cắt đó đường cong đổi chiều, điểm cắt 3 có độ nhạy là 73,3%, độ đặc hiệu 51,3%, giá trị chẩn đoán dương tính 26,6%, chỉ số J cao nhất = 24,6%.

- Dựa vào bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi chuyển nhận thấy: số phôi chuyển càng cao thì độ nhạy càng giảm, độ đặc hiệu và giá trị tiên đoán dương tính càng cao. Điều này có nghĩa rằng càng chuyển nhiều phôi thì tỷ lệ có thai càng cao (bảng 3.22). Cũng lưu ý rằng: càng chuyển nhiều phôi trong 1 chu kỳ thì nguy cơ đa thai càng cao.

- Khi phân tích hồi quy đa biến (bảng 3.41), chúng tôi thấy rằng số lượng phôi chuyển ảnh hưởng đáng kể tới kết quả có thai và độc lập với yếu tố khác ($p=0.045$).

Nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra giá trị tiên đoán dương tính của chuyển 1 phôi là 21,5%, chuyển 5 phôi là 36,4%, chuyển 6 phôi là 50%. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Vũ Minh Phương – (2015) ghi nhận nhóm chuyển 5 phôi đông lạnh có tỷ lệ thai lâm sàng cao nhất: 30,6%; thấp nhất ở nhóm chuyển 1 phôi: 12,5%. Tác giả cũng phân tích mối liên quan giữa số lượng phôi chuyển và tỷ lệ thai lâm sàng, nhận thấy số phôi chuyển tăng thì tỷ lệ thai lâm sàng tăng. Sự gia tăng tỷ lệ thai lâm sàng rõ rệt khi chuyển trên 3 phôi so với chuyển ≤ 2 với $p < 0,05$. khi chuyển nhiều hơn 3 phôi (4 hay 5 phôi) thì sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ [119].

. Nghiên cứu của William SB Yeung (2007) cũng cho kết luận tương tự: tỷ lệ thai lâm sàng và thai tiến triển có sự khác biệt thống kê giữa nhóm chuyển 1 phôi so với chuyển ≥ 2 phôi, tỷ lệ thai lâm sàng 21% ở nhóm chuyển 1 phôi, 37% ở nhóm chuyển 2 phôi và 39% ở nhóm chuyển 3 phôi [120].

. Vahratian A và cs (2000) nhận xét ở phụ nữ từ 20 – 29 tuổi chuyển 3 phôi sẽ tăng tỷ lệ trẻ sinh sống so với các chu kỳ chuyển 1 hoặc 2 phôi, sự gia tăng này kéo theo tăng nguy cơ đa thai [121].

- Zdravka và cs (2013) cũng nhận thấy sự cải thiện tỷ lệ trẻ sinh sống sau chuyển phôi đông lạnh khi so sánh chuyển 2 phôi và chuyển 1 phôi với OR 1,45, CI 1,08 – 1,94 [96].

- Tác giả Nguyễn Xuân Huy cũng kết luận: số phôi chuyển có ảnh hưởng đến tỷ lệ có thai lâm sàng với ($p < 0,05$) [122].

- 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 đa thai cao nhất có thể gặp khi chuyển 3 phôi là tam thai vẫn chấp nhận được.

Field Code Changed

4.3.2.2. Mối liên quan giữa chất lượng phôi ở từng giai đoạn với kết quả có thai.

Để tìm hiểu khả năng tiên lượng về kết quả có thai dựa vào chất lượng phôi, chúng tôi tiến hành xét mối liên quan giữa chất lượng phôi ở từng giai đoạn với kết quả có thai.

4.3.2.2.1. Mối liên quan giữa chất lượng phôi trước đông và kết quả có thai

Khi quyết định trữ phôi câu hỏi đặt ra là: nên trữ tất cả các phôi sống hay chọn trữ phôi theo chất lượng để khi rã ra thu được số phôi sống nhiều nhất và quan trọng hơn là các phôi sống đó có khả năng phát triển tiếp và cho kết quả có thai cao nhất, đồng thời tiết kiệm chi phí nhất? Kết quả là:

* *Với phôi tốt*: ở phương pháp thủy tinh hóa, dù là phôi ngày 3 (có 6-8 tế bào), hay phôi ngày 2 (có 4 tế bào), khả năng bảo toàn phôi tốt, nhờ đó làm tăng khả năng có thai tăng từ 2,743 đến 3,71 lần, có ý nghĩa thống kê. (bảng 3.23).

Ở phương pháp đông chậm, nếu trước đông là phôi tốt ngày 2 sẽ làm tăng khả năng có thai 5,719 lần, có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, nếu là phôi ngày 3, không làm tăng khả năng có thai, ($p=0,217$), (bảng 3.23). Phải chăng quá trình hạ nhiệt chậm gây hủy hoại tế bào nhiều hơn quá trình thủy tinh hóa, đặc biệt với các phôi càng có nhiều phôi bào thì khả năng bị ảnh hưởng càng nhiều hơn.

* *Với phôi trung bình*: theo bảng 3.24, ở 2 phương pháp, với cả nhóm phôi ngày 2 và ngày 3, nếu trước đông bệnh nhân có phôi độ 2 (trung bình) sẽ làm tăng khả năng có thai nhưng không có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$.

Tham khảo các nghiên cứu về kết quả có thai sau trữ và chuyển phôi trung bình (độ 2) thấy rằng tỷ lệ có thai cũng rất thấp. Như tác giả Josephine Lemmen nhận thấy: trường hợp có 2 tế bào vào ngày 2 (phôi trung bình) thì tỷ lệ có thai 7,2%; trường hợp có 4 tế bào vào ngày 2 (phôi tốt) tỷ lệ có thai 16,9% [123].

* *Với phôi xấu*: theo kết quả nghiên cứu ở bảng 3.25: ở cả 2 phương pháp, nếu trước đông bệnh nhân có phôi độ 1 (xấu) sẽ làm giảm khả năng có

thai nhưng không có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$. Thậm chí, nhóm phôi ngày 3, ở phương pháp thủy tinh hóa còn làm giảm khả năng có thai, có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

Có thể thấy, với phôi xấu, khi trải qua quá trình trữ và rã đông, khả năng sống, bảo toàn chất lượng phôi và làm tổ rất thấp. Thậm chí, còn thoái hóa, tạo ra những sản phẩm độc hại cho môi trường nuôi cấy, môi trường làm tổ của các phôi còn lại. Kết cục chung cuộc làm giảm khả năng có thai.

Cũng từ kết quả này, đưa ra kiến nghị sau: Sau tạo phôi, nên phân loại phôi theo hình thái, đánh dấu từng nhóm phôi. Nên chẳng chỉ tiến hành trữ lạnh toàn bộ số phôi tốt. Với phôi chất lượng trung bình (độ 2) thì tư vấn cho bệnh nhân khả năng thành công hạn chế sau trữ lạnh, để đưa ra quyết định có trữ hay không nhằm giảm chi phí không cần thiết. Hoặc có thể theo dõi và nuôi cấy tiếp, nếu phôi có thể “tự sửa chữa” do các phôi bào toàn vẹn phát triển “bù trừ”. Những ngày sau đánh giá lại chất lượng, nếu đạt độ 3 thì xem xét đưa vào trữ lạnh. Với phôi xấu (độ 1) nên mạnh dạn loại bỏ, không trữ lạnh để tránh ảnh hưởng đến môi trường nuôi cấy, môi trường làm tổ của các phôi khác.

4.3.2.2.2. *Mối liên quan giữa chất lượng phôi sau rã và kết quả có thai.*

Khi rã phôi, câu hỏi đặt ra là: nên rã phôi đến khi có phôi sống hay rã đến khi tìm thấy phôi phải đạt chất lượng như thế nào, để có thể tiên lượng có thai? Kết quả là:

Ở phương pháp thủy tinh hóa, nếu sau rã có ≥ 1 phôi độ 3 sẽ tăng khả năng có thai có ý nghĩa thống kê, từ 4,331 lần (với phôi ngày 3) đến 10,281 lần (với phôi ngày 2). (bảng 3.26).

Ở phương pháp đông chậm: nếu sau rã có phôi độ 3, ở nhóm ngày 2 làm tăng khả năng có thai lên 5,733 lần, có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, ở nhóm phôi ngày 3, tăng nhưng không có ý nghĩa thống kê (bảng 3.26).

Ở cả 2 phương pháp đông, với phôi giai đoạn phân chia, nếu sau rã thu được phôi trung bình, sẽ làm giảm khả năng có thai. Đặc biệt, với phương pháp đông chậm, giảm có ý nghĩa thống kê (bảng 3.27).

Nếu sau rã phôi giai đoạn phân chia, thu được phôi xấu, với cả 2 phương pháp, sẽ không làm tăng khả năng có thai. Đặc biệt với nhóm phôi ngày 3, nếu sau rã thụ tinh hóa, sẽ làm giảm khả năng có thai 41,6%, có ý nghĩa thống kê (bảng 3.28).

- Tác giả Zdravka 2013 cũng nhận thấy hình thái phôi tốt được quan sát ở bất kỳ giai đoạn nuôi cấy nào đều cải thiện kết quả có thai ngay cả khi các đặc tính chất lượng tốt biến mất trước khi chuyển phôi [96].

- Nghiên cứu của Wenhao Shi (2013) cho thấy sự hủy hoại phôi bào sau quá trình trữ lạnh sẽ tác động xấu đến tỷ lệ có thai của chu kỳ chuyển phôi đông lạnh [124].

Tóm lại, sau rã đông, nếu chỉ có phôi trung bình (độ 2), và phôi xấu (độ 1) sẽ không làm tăng khả năng có thai. Thậm chí còn làm giảm khả năng có thai có ý nghĩa thống kê (đặc biệt với phương pháp đông chậm và nhóm phôi ngày 3). Chỉ có phôi tốt (độ 3) sau rã mới làm tăng khả năng có thai có ý nghĩa thống kê. Với hệ thống theo dõi phôi liên tục (time lapse) hiện nay, việc đánh dấu và theo dõi sự phát triển của từng phôi dễ dàng hơn, liên tục và chính xác hơn.

Từ kết quả nghiên cứu này, đưa ra kiến nghị: để tăng khả năng có thai/ 1 chu kỳ FET nên rã đông cho đến khi thu được phôi tốt.

4.3.2.2.3. Mối liên quan giữa chất lượng phôi trước chuyển và kết quả có thai.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, sau rã đông, có hỗ trợ thoát màng bằng laser, phôi tiếp tục được nuôi cấy và theo dõi thêm 1 ngày và đánh giá lại chất lượng trước chuyển 1h. Do vậy, giống như chuyển phôi tươi, chất lượng phôi trước chuyển có giá trị tiên lượng gần và chính xác nhất tới kết quả có thai. Ở cả 2 phương pháp: nếu trước chuyển có phôi tốt (độ 3) sẽ làm tăng khả năng có thai, có ý nghĩa thống kê, ($p < 0,05$). Trừ nhóm phôi ngày 3, ở phương pháp đông chậm, tăng không có ý nghĩa thống kê. (bảng 3.29); còn nếu trước chuyển có phôi trung bình (độ 2) hoặc phôi xấu (độ 1) sẽ không làm tăng khả năng có thai, (bảng 3.30), (bảng 3.31). Kết luận này cũng tương đồng với nhiều nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới như:

Neha Palo Chandel (2015) so sánh chuyển phôi thủy tinh hóa ngày 3 với chuyển phôi tươi: nếu trước chuyển có 2 phôi tốt (8 tế bào) sẽ cho kết quả có thai cao hơn có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, trong thiết kế nghiên cứu tác giả chọn chuyển phôi tươi cho những trường hợp phát triển ít hơn 6 nang trứng thành, tác giả này không cho biết chất lượng phôi tươi trước chuyển [125].

Tác giả Zdravka (2013) nghiên cứu kết quả chuyển phôi đông lạnh ngày 2. Theo nghiên cứu này: nếu có ít nhất 1 phôi tốt trước đông, khả năng có thai tăng 1,85 lần (CI95%: 1,10 –3,14), nếu sau rã có ít nhất 1 phôi tốt – tăng 1,93 lần (CI 95%: 1,20 –3,11), nếu trước chuyển có ít nhất 1 phôi tốt – tăng 3,41 lần (CI 95%: 2,12 –5,48)[96].

Như vậy, hình thái phôi tốt được quan sát ở bất kỳ giai đoạn nuôi cấy nào đều cải thiện kết quả có thai.

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

Điểm chuyển phôi là tổng điểm của 3 yếu tố trước chuyển gồm: số lượng phôi tốt + độ dày niêm mạc tử cung + kỹ thuật chuyển phôi, có ý nghĩa xem xét tác động tổng hòa, đồng thời của các yếu tố phôi học, sự tiếp nhận của bệnh nhân và tay nghề kỹ thuật tới kết quả có thai.

Việc đưa ra khái niệm dựa trên phân loại, chấm điểm kỹ thuật chuyển từ dễ đến khó, cũng như sai sót có thể xảy ra trong quá trình chuyển phôi, nhằm lượng hóa các yếu tố có tính chất định tính, kinh nghiệm, nhằm tìm ra mối liên quan giữa khâu kỹ thuật quan trọng cuối cùng là 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 nong cổ tử cung khi chuyển phôi.

Kết quả của chúng tôi đồng thuận với tác giả Nguyễn Xuân Huy, tác giả nhận thấy không có trường hợp chuyển phôi khó nào có thai lâm sàng, trong đó chuyển phôi dễ tỷ lệ có thai lâm sàng đạt 35,5% [121].

Kết quả nghiên cứu của Hán Mạnh Cường (2010) tại cùng trung tâm nhận thấy: không có trường hợp nào có thai khi chuyển phôi có máu, trong khi chuyển phôi sạch tỷ lệ có thai đạt 22% chiếm 100% số bệnh nhân có thai. Sự khác biệt tỷ lệ có thai lâm sàng liên quan tới kỹ thuật chuyển phôi giữa các nhóm khác nhau có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ [91].

Nghiên cứu của Candido Tomas và cs (2002) cũng cho kết quả tương tự: tỷ lệ có thai của nhóm chuyển phôi dễ và chuyển phôi vừa là 30,3%; tỷ lệ có thai của nhóm chuyển phôi khó là 21,1% ($p = 0,0002$) [75].

Nghiên cứu của Hassan N Sallam (2004) [126] về các chỉ tiết trong động tác chuyển phôi khẳng định chuyển phôi khó và chuyển phôi không nhẹ nhàng có dính máu ở đầu catheter làm giảm rõ rệt tỷ lệ có thai và tỷ lệ làm tổ. Với bàng quang đầy, những bệnh nhân có góc giữa trục thân và trục cổ tử cung trên siêu âm $> 120^\circ$ có tỷ lệ có thai thấp hơn nhóm mà hai trục nằm trên một đường thẳng. Nhóm bệnh nhân được thử catheter trước khi tiến hành điều trị có tỷ lệ có thai cao hơn nhóm không thử catheter. Những bệnh nhân được chuyển phôi dưới siêu âm và đặt phôi ở giữa tử cung, cách đáy tử cung 2cm có tỷ lệ thành công cao hơn nhóm không thực hiện kỹ thuật này.

Nghiên cứu của Wenhao Shi (2013) cũng ghi nhận tỷ lệ thai lâm sàng khi catheter không có máu và có máu lần lượt là 55,2% và 42%. Sự hiện diện của máu trong catheter làm giảm tỷ lệ thai lâm sàng có ý nghĩa thống kê với $OR = 0,549$; $CI 95\%: 0,455 - 0,662$ [124].

Field Code Changed

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

Sau khi nhận ra rằng: chỉ có phôi tốt mới quyết định tới kết quả có thai, chúng tôi tiến hành nghiên cứu giá trị của số lượng phôi tốt ở từng giai đoạn kỹ thuật trong tiên lượng kết quả có thai. Từ kết quả ở các biểu đồ 3.4; biểu đồ 3.5; biểu đồ 3.6 và các bảng 3.33; bảng 3.34; bảng 3.35, chúng tôi tổng hợp ra các bảng kết quả về giá trị của số lượng phôi tốt của từng giai đoạn kỹ thuật trong tiên lượng kết quả có thai và có thai cộng dồn như sau:

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

Bảng 4.1. Giá trị của số lượng phôi tốt trước đông trong tiên lượng kết quả có thai

Kết quả tiên lượng	Số phôi tốt trước đông			
	Đông chậm		Thủy tinh hóa	
	Nhóm ngày 2	Nhóm ngày 3	Nhóm ngày 2	Nhóm ngày 3
Có thai	≥ 2	Không có giá trị tiên lượng	≥ 1	≥ 2
Có thai cộng dồn 100%	≥ 15		≥ 17	≥ 11

Vậy có thể đưa ra kết luận: với phôi ngày 2- đông chậm, trước đông cần có từ 2 phôi tốt trở lên mới có giá trị trong tiên lượng có thai. Nếu trước đông có từ 15 phôi tốt trở lên thì khả năng có thai cộng dồn là 100%.

* Với phôi ngày 3- đông chậm.

Số lượng phôi tốt trước đông không có giá trị trong tiên lượng kết quả có thai vì: diện tích dưới đường cong: 0,34. ($p = 0,174$) (biểu đồ 3.6).

Kết quả này có thể do trong quá trình trữ và rã đông chậm, các phôi bị phá hủy rất nhiều, kể cả với phôi tốt, đặc biệt với phôi có số lượng phôi bào lớn lại càng bị phá hủy nhiều hơn, nên không còn giữ được số lượng, chất

lượng như trước đông, khả năng phát triển tiếp sau rã đông chậm là rất kém nên không có giá trị trong tiên lượng kết quả có thai.

* Với phôi ngày 2- thủy tinh hóa, trước đông chỉ cần có từ 1 phôi tốt trở lên đã có giá trị trong tiên lượng có thai. Nếu trước đông có từ 17 phôi tốt trở lên thì khả năng có thai cộng dồn là 100%.

* Với phôi ngày 3, thủy tinh hóa, trước đông cần có từ 2 phôi tốt (độ 3) trở lên mới có giá trị trong tiên lượng có thai. Nếu trước đông có từ 11 phôi tốt trở lên thì khả năng có thai cộng dồn là 100%.

* Như vậy, cùng phương pháp thủy tinh hóa, so sánh nhóm phôi ngày 2 và ngày 3 nhận thấy:

- Để tiên lượng có thai, số lượng phôi tốt trước đông của nhóm phôi ngày 3, cần nhiều hơn nhóm phôi ngày 2, 1 phôi tốt (độ 3).

- Để tiên đoán khả năng có thai cộng dồn là 100%, số lượng phôi tốt trước đông của nhóm phôi ngày 3, cần ít hơn nhóm phôi ngày 2, 6 phôi tốt.

* 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.

- Để tiên lượng có thai, số lượng phôi tốt trước đông của phương pháp đông chậm cần nhiều hơn phương pháp thủy tinh hóa, 1 phôi tốt.

- Để tiên đoán khả năng có thai cộng dồn là 100%, số lượng phôi tốt trước đông của phương pháp đông chậm cần ít hơn phương pháp thủy tinh hóa, 2 phôi tốt.

* Kết quả này đưa đến khuyến nghị: với phôi ngày 2, nếu chỉ còn dư 1 phôi tốt thì nên chọn đông theo phương pháp thủy tinh hóa sẽ tăng khả năng bảo toàn phôi và tăng khả năng có thai.

- Với phôi tốt ngày 3: chỉ nên đông theo phương pháp thủy tinh hóa.

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

Bảng 4.2. Giá trị của số lượng phôi tốt sau rã trong tiên lượng kết quả có thai

Kết quả tiên lượng	Số phôi tốt sau rã			
	Đông chậm		Thủy tinh hóa	
	Nhóm ngày 2	Nhóm ngày 3	Nhóm ngày 2	Nhóm ngày 3
Có thai	≥ 1	Không có giá trị tiên lượng	≥ 1	≥ 2
Có thai cộng dồn 100%	≥ 9			

Kết luận: với phôi ngày 2 - đông chậm, sau rã chỉ cần có từ 1 phôi tốt trở lên đã có giá trị trong tiên lượng có thai. Nếu sau rã có từ 9 phôi tốt trở lên thì khả năng có thai cộng dồn là 100%.

Câu hỏi đặt ra: nếu có nhiều hơn 1 phôi tốt, thì 1 chu kỳ nên rã bao nhiêu phôi để cho kết quả có thai cao nhất, mà tránh đa thai và tiết kiệm phôi nhất? Theo kết quả bảng 3.36: tại điểm cắt 3, giá trị chẩn đoán dương 42,1% cao hơn đáng kể điểm cắt 2 (35%), thấp hơn không đáng kể điểm cắt 4 (43,3%), điểm cắt 5 (48,3%) (bảng 3.36).

Kết quả này đưa đến khuyến nghị: với phôi ngày 2, đông chậm, trong 1 chu kỳ, nếu sau rã đạt được 3 phôi tốt thì không nên rã tiếp phôi khác, sẽ cho kết quả có thai khá tốt, khả năng đa thai có thể gặp là tam thai vẫn chấp nhận được.

* Với phôi ngày 3 – đông chậm.

Số lượng phôi tốt sau rã không có giá trị trong tiên lượng kết quả có thai vì: diện tích dưới đường cong: 0,42. - $p < 0,492$ (Biểu đồ 3.10).

* Với phôi ngày 2, thủy tinh hóa, sau rã chỉ cần có từ 1 phôi tốt trở lên đã có giá trị trong tiên lượng có thai.

Câu hỏi đặt ra: nếu có nhiều hơn 1 phôi tốt, thì 1 chu kỳ nên rã bao nhiêu phôi để cho kết quả có thai cao nhất, mà tránh đa thai và tiết kiệm phôi nhất? Theo kết quả bảng 3.37: tại điểm cắt 3, giá trị chẩn đoán dương 66,7%, cao hơn điểm cắt 2 (54,8%), thấp hơn điểm cắt 4 (75,1%) (Bảng 3.37).

Kết quả này đưa đến khuyến nghị: với phôi ngày 2, thủy tinh hóa, trong 1 chu kỳ, nếu sau rã đạt được 3 phôi tốt thì không nên rã tiếp phôi khác, sẽ cho kết quả có thai khá cao, khả năng đa thai có thể gặp là tam thai vẫn chấp nhận được.

* Với phôi ngày 3- thủy tinh hóa, sau rã cần có từ 2 phôi tốt trở lên để có giá trị trong tiên lượng có thai.

Câu hỏi đặt ra: nếu có nhiều hơn 1 phôi tốt, thì 1 chu kỳ nên rã bao nhiêu phôi để cho kết quả có thai cao nhất, mà tránh đa thai và tiết kiệm phôi nhất? Theo kết quả bảng 3.38: tại điểm cắt 3, giá trị chẩn đoán dương 70%, cao hơn điểm cắt 2 (47,5%) (Bảng 3.38).

Kết quả này đưa đến khuyến nghị: với phôi ngày 2, thủy tinh hóa, trong 1 chu kỳ, nếu sau rã đạt được 3 phôi tốt thì không nên rã tiếp phôi khác, sẽ cho kết quả có thai rất cao, khả năng đa thai có thể gặp là tam thai vẫn chấp nhận được.

• Như vậy, cùng phương pháp thủy tinh hóa, sau rã, so sánh nhóm phôi ngày 2 và ngày 3 nhận thấy:

- Để tiên lượng có thai, nhóm phôi ngày 3, cần nhiều hơn nhóm phôi ngày 2, 1 phôi tốt.

- 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.

- Để tiên lượng có thai, số lượng phôi tốt sau rã của 2 phương pháp là như nhau, đều cần 1 phôi tốt.

- Với phôi ngày 2, tại các điểm cắt từ 1 đến 4 phôi tốt – sau rã: giá trị chẩn đoán dương tính của phương pháp thủy tinh hóa cao hơn phương pháp đông chậm (bảng 3.36, bảng 3.37).

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.

Bảng 4.3. Giá trị của số lượng phôi tốt trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai

Kết quả tiên lượng	Số phôi tốt trước chuyển			
	Đông chậm		Thụ tinh hóa	
	Nhóm ngày 2	Nhóm ngày 3	Nhóm ngày 2	Nhóm ngày 3
Có thai	≥ 1	Không có giá trị tiên lượng	≥ 1	≥ 2
Có thai cộng dồn 100%	≥ 5		≥ 5	

*Với phôi ngày 2- đông chậm, trước chuyển chỉ cần có từ 1 phôi tốt trở lên đã có giá trị trong tiên lượng có thai. Nếu trước chuyển có từ 5 phôi tốt trở lên thì khả năng có thai cộng dồn là 100%.

Câu hỏi đặt ra: nếu có nhiều hơn 1 phôi tốt, thì 1 chu kỳ nên chuyển bao nhiêu phôi để cho kết quả có thai cao nhất, mà tránh đa thai và tiết kiệm phôi nhất? Theo kết quả bảng 3.39: tại điểm cắt 3, giá trị chẩn đoán dương 61,5%, cao hơn điểm cắt 1 (30,7%), điểm cắt 2 (38,9%), thấp hơn điểm cắt 4 (75%), điểm cắt 5 (100%) (bảng 3.39).

Kết quả này đưa đến khuyến nghị: với phôi ngày 2, đông chậm, trong 1 chu kỳ, nếu trước chuyển đạt được 3 phôi tốt thì nên chuyển cả 3 phôi, sẽ cho kết quả có thai rất cao 61,5%, khả năng đa thai có thể gặp là tam thai vẫn chấp nhận được.

* Với phôi ngày 3 – đông chậm).

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.

*** Ở phương pháp thủy tinh hóa.**

* Với phôi ngày 2- thủy tinh hóa, trước chuyển chỉ cần có từ 1 phôi tốt trở lên đã có giá trị trong tiên lượng có thai. Nếu trước chuyển có từ 5 phôi tốt trở lên thì khả năng có thai cộng dồn là 100%.

Câu hỏi đặt ra: nếu có nhiều hơn 1 phôi tốt, thì 1 chu kỳ nên chuyển bao nhiêu phôi để cho kết quả có thai cao nhất, mà tránh đa thai và tiết kiệm phôi nhất? Theo kết quả bảng 3.40: tại điểm cắt 3, giá trị chẩn đoán dương 54,2%, cao hơn điểm cắt 1 (41,1%), điểm cắt 2 (41,3%), thấp hơn điểm cắt 4 (68,75%), điểm cắt 5 (100%) (bảng 3.40).

Kết quả này đưa đến khuyến nghị: với phôi ngày 2, đông chậm, trong 1 chu kỳ, nếu trước chuyển đạt được 3 phôi tốt thì nên chuyển cả 3 phôi, sẽ cho kết quả có thai cao (54,2%), khả năng đa thai có thể gặp là tam thai vẫn chấp nhận được.

* Với phôi ngày 3- thủy tinh hóa, trước chuyển cần có từ 2 phôi tốt trở lên mới có giá trị trong tiên lượng có thai.

Câu hỏi đặt ra: nếu có nhiều hơn 1 phôi tốt, thì 1 chu kỳ nên chuyển bao nhiêu phôi để cho kết quả có thai cao nhất, mà tránh đa thai và tiết kiệm phôi nhất? Theo kết quả bảng 3.41: tại điểm cắt 3, giá trị chẩn đoán dương 45,8%, cao hơn điểm cắt 1 (32,7%), điểm cắt 2 (40,7%), thấp hơn điểm cắt 4 (50%), điểm cắt 5 (100%) (Bảng 3.41).

Kết quả này đưa đến khuyến nghị: với phôi ngày 2, thủy tinh hóa, trong 1 chu kỳ, nếu trước chuyển đạt được 3 phôi tốt thì nên chuyển cả 3 phôi, sẽ cho kết quả có thai khá cao (45,8%), khả năng đa thai có thể gặp là tam thai vẫn chấp nhận được.

- Như vậy, cùng phương pháp thủy tinh hóa, trước chuyển, so sánh nhóm phôi ngày 2 và ngày 3 nhận thấy:

- Để tiên lượng có thai, nhóm phôi ngày 3, cần nhiều hơn nhóm phôi ngày 2, 1 phôi tốt.

- Nếu trước chuyển cùn có 3 phôi tốt, giá trị tiên đoán dương tính của nhóm phôi ngày 2 (54,2%) cao hơn nhóm phôi ngày 3 (45,8%).

* 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.

- Để tiên lượng có thai, số lượng phôi tốt trước chuyển của 2 phương pháp là như nhau, đều cần 1 phôi tốt.

4.3.2.5. Hồi quy đa biến và mức độ ảnh hưởng của các yếu tố đến kết quả có thai ở phương pháp thủy tinh hóa.

Kết quả có thai của một chu kỳ thụ tinh ống nghiệm và chuyển phôi trữ lạnh phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố. Trong khuôn khổ nghiên cứu này, chúng tôi tổng hợp và phân tích đa biến 6 yếu tố, để đánh giá mức độ tác động tổng hợp của các yếu tố tới tỷ lệ có thai và tỷ lệ sinh sống. (Bảng 3.42). Kết quả là: hệ số hồi quy (B) của 5 yếu tố mang dấu dương, thể hiện điểm chuyển phôi, số lượng phôi tốt ở các giai đoạn kỹ thuật, số lượng phôi chuyển càng cao càng làm tăng khả năng có thai. Trong đó, mức độ ảnh hưởng của điểm chuyển phôi là cao nhất, do hệ số hồi quy cao nhất ($B=0,339$), tiếp đến là số phôi tốt trước chuyển, số phôi tốt sau rã, số lượng phôi chuyển. Yếu tố số phôi tốt trước đông tác động thấp nhất ($B=0,089$).

Điểm chuyển phôi có hệ số hồi quy cao nhất là tất nhiên do điểm chuyển phôi là tổng điểm của 3 yếu tố quan trọng nhất trước chuyển gồm: số lượng phôi tốt + độ dày NMTC + kỹ thuật chuyển phôi, có ý nghĩa tiên lượng gần, chính xác nhất cho kết quả có thai.

Số lượng phôi tốt ở các giai đoạn kỹ thuật đều là yếu tố tiên lượng độc lập tới kết quả có thai. Trong đó, số phôi tốt trước chuyển có ý nghĩa quan trọng nhất. Tuy nhiên, số phôi tốt trước đông, là điều kiện tiên quyết, chi phối sự có

mặt của phôi tốt sau rã và phôi tốt trước chuyển. Kết quả này tương tự nghiên cứu của các tác giả khác khi phân tích hồi quy đa biến như: Wenhao Shi (2013) cũng nhận thấy trong số các yếu tố cải thiện kết cục của chuyển phôi trữ lạnh thì số phôi chuyển có chất lượng tốt có ý nghĩa quan trọng nhất so với độ dày NMTC hay kỹ thuật chuyển phôi (catheter có máu hay không)[124]. M. Ashra (2011) thấy sự có mặt của 1 phôi tốt trước chuyển có hệ số hồi quy cao thứ 2, sau số phôi thu được, cao hơn số trứng thu nhận, trong phân tích hồi quy đa biến các yếu tố ảnh hưởng kết quả chuyển phôi trữ lạnh [127].

Độ dày NMTC sau chuẩn bị bằng nội tiết ngoại sinh có hệ số hồi quy đứng thứ 3, cao hơn số lượng phôi chuyển. Như vậy, nếu có phôi tốt, độ dày NMTC nằm trong nhóm thuận lợi (>8-14mm) thì xem xét không nên tăng số lượng phôi chuyển. Do tăng số lượng phôi chuyển luôn kèm theo nguy cơ đa thai.

4.3.3. Bàn luận về kết quả thai nghén và tiên lượng sức khỏe của trẻ sinh ra từ phôi đông chậm và phôi thủy tinh hóa .

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 trước đông/chu kỳ FET của hai nhóm là như nhau (bảng 3.8).

Đặc biệt, với nhóm chuyển phôi ngày 2, dù trung bình số phôi rã đông/chu kỳ FET, hay trung bình số phôi chuyển/chu kỳ FET là tương đương hay cao hơn nhóm chuyển phôi ngày 3 cũng không làm tỷ lệ có thai và tỷ lệ đẻ con sống cao hơn, khi trung bình số phôi tốt trước đông, trước chuyển/chu kỳ FET của 2 nhóm là như nhau (bảng 3.4, bảng 3.8, bảng 3.10).

Điều này càng khẳng định, tỷ lệ có thai, tỷ lệ đẻ con sống sau chuyển phôi giai đoạn phân chia trữ lạnh, phụ thuộc vào số lượng phôi tốt trước đông mà không phụ thuộc vào tuổi phôi.

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 (bảng 3.45).

Nhiều tác giả khác cũng đưa ra kết quả tương tự: như Debrock S – 2015, nghiên cứu so sánh ngẫu nhiên trữ lạnh phôi ngày 3, tỷ lệ sinh sống sau thủy tinh hóa (16,1%), cao hơn có ý nghĩa thống kê so với đông chậm (5%) [106]. Rienzi L- 2017 phân tích tổng hợp và tổng quan hệ thống, cho kết quả tỷ lệ thai lâm sàng và tỷ lệ sinh sống của thủy tinh hóa cao hơn đông chậm với RR 1,89 và 2,28 [128]. Lin T-K (2010) so sánh 57 bệnh nhân có phôi thủy tinh hóa với 45 bệnh nhân có phôi đông lạnh chậm. Tỷ lệ phôi sống của thủy tinh hóa cao hơn đáng kể so với đông lạnh chậm [287/298 (96,3%) so với 294/446 (65,9%); $p < 0,05$]. Tỷ lệ làm tổ và tỷ lệ thai lâm sàng cũng cao hơn đáng kể khi sử dụng quy trình thủy tinh hóa so với quy trình đông lạnh chậm (lần lượt là 24,3% so với 7,1% và 35,6% so với 15,6%, $p < 0,05$) [129].

- Kết quả nghiên cứu này khác với Giovanna Fasano (2014) tiến hành thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng, so sánh trữ lạnh phôi chất lượng tốt, giai đoạn phân chia, ở 568 bệnh nhân (tuổi trung bình $33,4 \pm 5,2$), bằng phương pháp thủy tinh hóa, trên hệ thống kín, với 2 môi trường khác nhau (IVINE chứa DMSO và Vitrolife không chứa DMSO) với phương pháp đông lạnh chậm. Số lượng phôi trung bình được chuyển (Irvine $1,2 \pm 0,4$; Nhóm Vitrolife $1,2 \pm 0,5$; nhóm đông lạnh chậm $1,1 \pm 0,4$) tương tự nhau giữa ba nhóm. Tỷ lệ làm tổ (IR) trên số phôi rã và số phôi chuyển tương ứng là 15,8% (41/259) và 12,4% (41/330) đối với Irvine, 17,0% (40/235) và 12,1% (40/330) đối với Vitrolife, 21,4% (39/182) và 9,9% (39/395) cho đông lạnh chậm ($p > 0,05$). Tỷ lệ sinh sống (LB) trên số phôi rã và số phôi chuyển cũng không khác biệt giữa 3 phương pháp trữ lạnh, ($p > 0,05$). Sự khác biệt này là do cách tính tỷ lệ làm tổ và tỷ lệ sinh sống khác chúng tôi (tính tỷ lệ sinh sống bằng phần trăm số bệnh nhân đẻ con sống trên tổng số bệnh nhân

tiến hành rã đông). Tác giả này cũng kết luận rằng: Ngay cả khi không có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ làm tổ và tỷ lệ sinh sống giữa ba phương pháp trữ lạnh, thông qua tỷ lệ phôi sống và chất lượng phôi cao hơn sau rã đông, thủy tinh hóa có thể cải thiện kết quả lâm sàng của IVF bằng cách tối đa hóa hiệu quả tích lũy của chu kỳ [105].

- Kết quả nghiên cứu này khác với nghiên cứu mô tả hồi cứu của Zhu HY – 2015 cho biết: tỷ lệ mang thai và tỷ lệ làm tổ của 2 phương pháp đông chậm và thủy tinh hóa là tương đương (35% so với 40,8% và 34,6% so với 35,9%). Tỷ lệ làm tổ trên mỗi lần chuyển phôi của đông chậm cao hơn đáng kể so với thủy tinh hóa (38,8% so với 34,6%) với $p < 0,05$. Không có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ sảy thai, sinh sống và cân nặng khi sinh giữa 2 phương pháp đông, mặc cho tỷ lệ phôi sống, tỷ lệ phôi nguyên vẹn, tỷ lệ phôi chất lượng tốt của đông chậm thấp hơn thủy tinh hóa. Tác giả này kiến nghị vẫn nên xem xét đông chậm phôi ngày 3 [107].

- Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng khác với tác giả Kaartinen N -2016, khi họ mô tả hồi cứu 663 phôi đông chậm và 683 phôi thủy tinh hóa, không thấy có sự khác biệt về tỷ lệ thai lâm sàng (23,6%), tỷ lệ sinh sống (19,5), trọng lượng khi sinh (3588g) của thủy tinh hóa so với đông chậm (27,9% ;19,1% và 3670g). Trái lại, tỷ lệ sảy thai (15,7%) ở nhóm thủy tinh hóa lại thấp hơn so với đông chậm (29,0%) [108].

- Lưu ý rằng: Zhu HY và Kaartinen N nghiên cứu mô tả hồi cứu, do vậy độ tin cậy và sức mạnh của nghiên cứu là không cao.

- Biết rằng: lý do phổ biến nhất cho sảy thai sớm, thai ngừng tiến triển là bất thường nhiễm sắc thể (Bettio D- 2008, Kim JW-2010, Martínez MC)[130], [131],[132]. Tuy nhiên, cần nghiên cứu chính xác mức độ bất thường nhiễm sắc thể thông qua theo dõi dọc lâu dài từng cá thể với những biểu hiện kiểu hình khác nhau, mới có thể cho số liệu chính xác về tác động gây bất thường của từng phương pháp trữ lạnh.

4.3.3.2. Phát triển thể chất và tâm vận động ở trẻ sinh ra từ phôi đông chậm và phôi thủy tinh hóa.

Sự phát triển của con người trong giai đoạn từ 0 đến 5 tuổi quyết định rất lớn đến cả đời người. Sự phát triển của giai đoạn này phụ thuộc vào các yếu tố sau:

- Yếu tố nội tiết: các hormone tham gia quá trình điều hòa phát triển cơ thể.
- Yếu tố di truyền gồm: giống nòi, chủng tộc, các yếu tố gen và bất thường bẩm sinh.
- Yếu tố môi trường xã hội như: dinh dưỡng, gia đình, bệnh tật.

Vì thế, trên cơ sở theo dõi dọc từ giai đoạn hình thành phôi, bào thai, sơ sinh, đến tuổi mầm non sẽ có ý nghĩa đánh giá tiên lượng lâu dài cho sự phát triển của những trẻ sinh ra từ phôi 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; bảng 3.47). Tuy nhiên, tỷ lệ trẻ không có dị tật, bất thường bẩm sinh ở nhóm đông chậm là 100%, ở nhóm thủy tinh hóa là 94,2%. Thấy 5,8% trẻ sinh ra từ phôi thủy tinh hóa có bất thường, dị tật bẩm sinh (bảng 3.48).

- Tác giả Wang X (2012) thực hiện một nghiên cứu mô tả theo dõi dọc 3 năm, so sánh tỷ lệ thành công của phôi ngày 3 thủy tinh hoá với phôi ngày 3 đông chậm và phôi tươi. Tổng cộng có 962 chu kỳ chuyển phôi tươi (843 bệnh nhân), 151 chu kỳ chuyển phôi đông chậm (106 bệnh nhân) và 300 chu kỳ chuyển phôi thủy tinh hóa (229 bệnh nhân). Nhóm phôi trữ lạnh có sẵn, tác giả bắt đầu theo dõi từ khi rã đông. Nhóm phôi tươi được tác giả bắt đầu theo dõi từ khi kích thích buồng trứng. Mốc thời gian theo dõi kéo dài đến sau khi đẻ con sống 2 tháng. Kết quả: Tỷ lệ phôi sống và tỷ lệ phôi sống nguyên vẹn

của nhóm thủy tinh hóa cao hơn đáng kể so với nhóm đông lạnh chậm (88,5% so với 74,5% và 86,6% so với 64,0%). Tỷ lệ làm tổ, tỷ lệ thai lâm sàng và tỷ lệ sinh sống của nhóm thủy tinh hóa tương tự như nhóm tươi và cao hơn đáng kể so với nhóm đông lạnh chậm. Không có sự khác biệt đáng kể về tuổi thai trung bình, cân nặng khi sinh, thai chết lưu, dị tật bẩm sinh và tỷ lệ mắc bệnh sơ sinh (suy hô hấp, nhiễm trùng, xuất huyết não) giữa ba nhóm[133]. Kết luận của tác giả này tương tự với kết quả của chúng tôi, đó là: tỷ lệ phôi sống, tỷ lệ phôi sống nguyên vẹn, tỷ lệ có thai, tỷ lệ sinh sống của thủy tinh hóa cao hơn đông chậm; tuổi thai trung bình, cân nặng khi sinh tương tự ở 2 phương pháp trữ lạnh. Nhưng khác với chúng tôi, tác giả kết luận: tỷ lệ thai lưu, dị tật bẩm sinh và tỷ lệ mắc bệnh sơ sinh khác biệt không đáng kể giữa phôi thủy tinh hóa và phôi đông chậm. Sự khác biệt ở chỗ, chúng tôi xem xét tỷ lệ thai ngừng phát triển (gồm thai sinh hóa, thai sảy, thai lưu), sẽ cho ra kết quả đánh giá toàn diện hơn là chỉ so sánh tỷ lệ thai lưu đơn thuần. Hơn nữa, chúng tôi theo dõi dọc kéo dài hơn (đến khi trẻ 4 tuổi), do vậy một số bệnh lý cùng với sự phát triển của con người, sau một khoảng thời gian dài, mới xuất hiện hoặc biểu hiện rõ ràng hơn, cho ra kết luận toàn diện, chính xác hơn.

- Tác giả Kaartinen N -2016, hồi cứu 73 trẻ sinh ra từ phôi đông chậm và 90 trẻ sinh ra từ phôi thủy tinh hóa, không thấy có sự khác biệt đáng kể về trọng lượng khi sinh giữa 2 kỹ thuật trữ lạnh, mặc dù dường như có xu hướng cân nặng khi sinh trung bình thấp hơn một chút sau khi thủy tinh hóa (3588g) so với đông chậm (3670g) [108].

- Tác giả Liu SY (2013) nghiên cứu hồi cứu kết quả sản khoa, sơ sinh từ 7 đến 30 ngày tuổi, của trẻ sinh ra sau chuyển phôi ngày 3 thủy tinh hóa (n=2671) so với đông lạnh chậm (n=4681) và chuyển phôi tươi (n=9194), qua bảng câu hỏi gửi cho phụ huynh thấy: cân nặng trung bình khi sinh của nhóm thủy tinh hóa (2587,4g) cao hơn nhóm đông chậm (2538,8g) và nhóm chuyển phôi tươi (2494,4g) với $p < 0,05$. Tuy nhiên, tác giả cũng công nhận hạn chế của nghiên cứu là không báo cáo được số liệu về dị tật bẩm sinh [113].

Khi tìm kiếm các nghiên cứu có bằng chứng thuyết phục về sự an toàn cho những trẻ sinh ra từ thủy tinh hóa thay vì đông chậm là rất ít. Đặc biệt, không tìm thấy các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng đánh giá, so sánh sức khỏe lâu dài của trẻ sinh ra từ hai phương pháp trữ lạnh trên (có thể, do vấn đề đạo đức y học khi thực hiện các thử nghiệm y sinh trên người). Vì vậy, chúng tôi phải tìm kiếm các nghiên cứu đánh giá sức khỏe, dị tật sau sinh của từng phương pháp, so sánh với chuyển phôi tươi và trẻ sinh ra tự nhiên, để có cái nhìn khách quan và toàn diện hơn.

- Các nghiên cứu trẻ sinh ra sau chuyển phôi đông chậm:

- S Pelkonen- 2015, theo dõi 3 năm sức khỏe, thể chất của 1825 trẻ em đơn thai được sinh ra sau chuyển phôi ngày 3, đông lạnh chậm, so với 2933 trẻ chuyển phôi tươi và 31137 trẻ sinh ra sau thụ thai tự nhiên. Kết quả, sức khỏe chu sinh trẻ sinh ra sau chuyển phôi đông lạnh tương tự hoặc thậm chí tốt hơn trẻ chuyển phôi tươi. Tỷ lệ mắc bệnh, tử vong khá giống nhau giữa nhóm trẻ chuyển phôi đông lạnh và trẻ chuyển phôi tươi. Các kết quả sức khỏe ngắn hạn của trẻ em sinh ra bằng các phương pháp hỗ trợ sinh sản đã được chứng minh kém hơn một chút so với trẻ sinh ra từ thụ thai tự nhiên [134].

- Tác giả Ulla- Britt Wennerholm - 2013 nhận thấy: so với trẻ sinh ra sau chuyển phôi tươi, trẻ sinh ra sau chuyển phôi đông chậm ngày 2, có tỷ lệ nhẹ cân và sinh non thấp hơn. Nhưng so với trẻ sinh ra sau thụ thai tự nhiên thấy kết quả chu sinh thấp hơn [135].

- Các nghiên cứu trẻ sinh ra từ phôi thủy tinh hóa:

- Tác giả F. Belva – 2016, đánh giá sức khỏe sơ sinh bao gồm dị tật bẩm sinh đến khi 3 tháng của 1072 trẻ sinh ra sau chuyển phôi thủy tinh hóa (ngày 3 và ngày 5), thấy tỷ lệ dị tật của trẻ sinh ra từ phôi trữ lạnh là 3,4% (CI 95%, 2,4 – 4,8), so sánh với trẻ sinh ra từ phôi tươi 3,9% (CI 95%, 3,1- 5,0), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê [136].

- Tác giả Osamu Kato -2012, sử dụng bảng phỏng vấn cha mẹ trẻ để khảo sát hồi cứu kết quả sơ sinh và dị tật bẩm sinh của 6623 trẻ sinh ra sau chuyển phôi thủy tinh hóa (giai đoạn phân chia và giai đoạn phôi nang; môi trường KITARATO; dụng cụ trữ là cryotop), thấy tuổi thai và tỷ lệ sinh non (6,9%) tương đương với nhóm chuyển phôi tươi. Cân nặng trung bình khi sinh, tỷ lệ tử vong chu sinh và tỷ lệ dị tật (2,4%) ở nhóm trữ lạnh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với cân nặng trung bình khi sinh, tỷ lệ tử vong chu sinh, tỷ lệ dị tật (1,9%) của trẻ sinh ra từ phôi tươi. (OR 1,41; CI 95% 0,96 – 2,1) [137].

- Tác giả Shi W (2012), phân tích hồi cứu, so sánh kết quả chu sinh sau chuyển phôi ngày 3 thủy tinh hóa với chuyển phôi tươi ngày 3 thấy: Tổng cộng có 2.543 phôi được rã đông, và 2.375 phôi sống và được chuyển vào buồng tử cung. Tỷ lệ làm tổ, tỷ lệ có thai, tỷ lệ sảy thai và tỷ lệ sinh sống lần lượt là 26,91%, 47,22%, 6,07% và 38,58%. Trong đơn thai, trọng lượng trung bình khi sinh là 3.337,44 g và điểm Apgar trung bình lần lượt là 8,91, 9,85 và 9,89 tại 1, 5 và 10 phút. Trong đa thai, trọng lượng trung bình khi sinh là 2.556,45 g và điểm Apgar trung bình lần lượt là 8,90, 9,34 và 9,47 tại 1, 5 và 10 phút. So với chuyển phôi tươi, trọng lượng sơ sinh trung bình trong nhóm đông lạnh cao hơn ở cả đơn thai và đa thai. Tất cả các kết quả khác là: tỷ lệ biến chứng sơ sinh (suy hô hấp, nhiễm trùng, vàng da, tử vong sơ sinh), tỷ lệ dị tật tương tự giữa chuyển phôi thủy tinh hóa và phôi tươi [138].

- Các nghiên cứu trẻ sinh ra từ phôi trữ lạnh nói chung:

- Tác giả Antonina Sazonova- 2012 so sánh trẻ sinh ra từ phôi đông lạnh có tỷ lệ đẻ non cực sớm (< 24 tuần) cao hơn trẻ sinh ra từ thụ thai tự nhiên. Trẻ sinh ra từ phôi đông lạnh có tỷ lệ tử vong chu sinh cao hơn trẻ đẻ ra từ phôi tươi. Tuy nhiên, trẻ sinh ra từ phôi đông lạnh có tỷ lệ nhẹ cân thấp hơn trẻ sinh ra từ chuyển phôi tươi [139].

- Tác giả Junwei Zhang – 2018, [115] so sánh 2059 trẻ sinh ra sau chuyển phôi tươi lần đầu và 2053 trẻ sinh ra sau chuyển phôi trữ lạnh: thấy

không có sự khác biệt về cân nặng trung bình khi sinh ($3468,7 \pm 475,3$ so với $3386,7 \pm 448,1$; $p < 0,001$); tỷ lệ dị tật bẩm sinh (gồm trisomi 13/18/21, tim bẩm sinh) không khác nhau giữa 2 nhóm (1,2% so với 0,9%; $p = 0,288$). Tác giả này thực hiện hồi cứu, không nêu rõ phương pháp trữ lạnh và chỉ đánh giá ngay sau sinh.

- Tác giả Belva F – 2008, [140] mô tả hồi cứu đánh giá từ khi phôi thai đến khi 2 tháng tuổi của 937 trẻ sinh ra từ phôi trữ lạnh (547 trẻ hỗ trợ ICSI và 390 trẻ hỗ trợ IVF) so sánh với kết quả dữ liệu chuyển phôi tươi. Nghiên cứu này bao gồm trẻ sinh ra từ tất cả các phương pháp trữ lạnh, tuổi phôi trữ từ 1 đến 6 ngày, tình trạng thực hiện ICSI thu được từ xuất tinh, mào tinh, tinh hoàn (tươi hoặc đông lạnh) đều được lựa chọn.

Kết quả trước sinh và sơ sinh là không có sự khác biệt về tỷ lệ có thai, tỷ lệ thai ngừng tiến triển, tỷ lệ đẻ non, cân nặng trung bình khi sinh.

Tỷ lệ sinh con sống của nhóm trữ lạnh (ICSI 70,2%; IVF 72,8%) cao hơn đáng kể so với chuyển phôi tươi (ICSI 52,8%; IVF 52,7%) với [ICSI: OR 2,11; CI 95% 1,73 – 2,57; IVF: OR 2,41; CI 95% 1,91 – 3,05].

Tỷ lệ dị tật lớn của nhóm trữ lạnh (gồm cả IVF và ICSI) là 5% cao hơn có ý nghĩa thống kê so với chuyển phôi tươi là 3,6% (OR 1,42; CI 95% 1,03 - 1,96).

Tổng tỷ lệ dị tật lớn nhỏ, bao gồm cả dị tật phải chỉ định chấm dứt thai kỳ ở nhóm trữ lạnh/ICSI tăng đáng kể về mặt thống kê 8,4% so với 4,1% ở nhóm trữ lạnh/IVF (OR 2,15; CI 95% 1,2-3,85).

Như vậy, theo kết quả nghiên cứu của tác giả này, kỹ thuật ICSI và trữ lạnh làm tăng tỷ lệ dị tật có ý nghĩa thống kê so với kỹ thuật IVF và chuyển phôi tươi. Lưu ý rằng tác giả đã loại khỏi nghiên cứu những chu kỳ được chẩn đoán di truyền tiền làm tổ hoặc có thai ở các trường hợp hỗ trợ hỗn hợp cả IVF và ICSI. Tác giả cũng kiến nghị nên theo dõi dài hạn hơn để xác định có hay không hậu quả muộn với những trẻ sinh ra từ phôi trữ lạnh.

- Tác giả Maheshwari A (2018) thực hiện tổng quan hệ thống và phân tích tổng hợp tích lũy (xu hướng theo thời gian) của các biến chứng sản khoa và chu sinh trong thai kỳ đơn thai sau khi chuyển phôi đông lạnh và phôi tươi được tạo ra thông qua thụ tinh trong ống nghiệm, từ nguồn dữ liệu từ Medline, EMBASE. Hai mươi sáu nghiên cứu đáp ứng các tiêu chí được thu nhận. Trẻ sơ sinh đơn thai được thụ thai từ phôi đông lạnh có nguy cơ sinh non (RR: 0,90; 95% CI 0,84-0,97) cân nặng khi sinh thấp (RR: 0,72; 95% CI 0,67-0,77) và cân nặng nhỏ hơn tuổi thai (RR: 0,61; 95% CI 0,56-0,67) thấp hơn so với những người được thụ thai từ chuyển phôi tươi, nhưng phải đối mặt với nguy cơ tăng (RR) rối loạn tăng huyết áp của thai kỳ (1,29; 95% CI 1,07-1,56) cân nặng lớn hơn tuổi thai (1,54; 95% CI 1,48- 1,61) và cân nặng khi sinh cao (1,85; KTC 95% 1,46-2,33). Không có sự khác biệt về nguy cơ dị tật bẩm sinh và tử vong chu sinh giữa hai nhóm. Tác giả cũng khuyến cáo, cần thận trọng khi thực hiện chính sách đóng băng tự động tất cả các phôi trong IVF[141].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, 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 thủy tinh hóa, ghi nhận 3 trẻ có dị tật bẩm sinh, (trong đó 1 trường hợp tứ chứng Fallot, nhi tử vong lúc 18 ngày tuổi; 1 trường hợp chậm phát triển trí tuệ, tâm vận động; 1 trường hợp suy giảm thị lực bẩm sinh), chiếm tỷ lệ 3/52 (5,8%).

Trường hợp tứ chứng Fallot có tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể: theo nghiên cứu của Gurleen Sharland – 2018 là 21% [142], Zhao Y – 2016 và Bùi Hải Nam - 2019 là 29,4% [143], [144]. Tuy vậy, trường hợp này là 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 chậm phát triển trí tuệ, tâm vận động, quan sát thấy ở trẻ sinh non tháng 32 tuần, sau chuyển phôi ngày 3 thủy tinh hóa, cũng cần phải nghiên cứu rất sâu về cơ chế bệnh sinh. Mặc dù, trong những năm gần đây,

nhiều công trình nghiên cứu đã được thực hiện nhận thấy: hầu hết các hội chứng vi mất đoạn nhỏ nhiễm sắc thể đều gây ra chậm phát triển trí tuệ (Dai W - 2018 [145]).

Trường hợp trẻ suy giảm thị lực bẩm sinh, sinh đủ tháng - 40 tuần, cân nặng khi sinh 3300g. Do vậy, có thể loại trừ bệnh võng mạc ở trẻ đẻ thiếu tháng, nhẹ cân, có tiền sử thở oxy cao áp kéo dài, dẫn tới sự phát triển bất thường của mạch máu võng mạc, dẫn tới các tật khúc xạ. Trường hợp này có bố cũng mắc tật khúc xạ mắt, dù nhẹ hơn (loạn cận 2,5- 3 diop). 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, việc 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 cho thấy ưu việt của phương pháp trữ lạnh thủy 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. Cần phải nghiên cứu sâu hơn, với cỡ mẫu lớn, đa trung tâm 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, cũng như tìm kiếm thêm những phương pháp trữ lạnh hiệu quả hơn nữa.

4.4. Bàn về những hạn chế của nghiên cứu.

- Nghiên cứu của chúng tôi có một số điểm yếu: số lượng trẻ bị mất dấu nhiều do thu kết quả từ phỏng vấn cha mẹ trẻ qua điện thoại. Các dữ liệu về cân nặng, chiều cao được thực hiện bởi các nhân viên y tế ở các cơ sở khác nhau, với các thiết bị khác nhau. Do đó, không có được sự nhất quán, sai số đo lường có thể có. Các tiêu chí đánh giá tâm vận động được thu thập thông qua bảng câu hỏi, có hướng dẫn của nghiên cứu viên, để cha mẹ trẻ tự đánh giá và trả lời. Vì vậy, không thể tránh được những đánh giá chủ quan, cảm tính, thiếu kiến thức y học.

- Trong những nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi mong muốn có nhiều hơn về điều kiện vật chất, cũng như kết hợp được các chuyên gia về sản khoa và nhi khoa với cha mẹ trẻ, để có thể tạo một tập hồ sơ điện tử, quản lý lâu dài, đánh giá trực tiếp, chính xác sức khỏe, thể chất, tâm vận động của những trẻ sinh ra từ phôi trữ đông nói riêng và các trẻ sinh ra từ kỹ thuật hỗ trợ sinh sản nói chung. Từ đó có được những chứng cứ khoa học tin cậy, phong phú và dài hơi hơn.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu trên 544 bệnh nhân, đánh giá kết quả sau chuyển phôi trữ ngày 2 và ngày 3, của 2 phương pháp đông chậm và thủy tinh hóa, rút ra kết luận sau:

1. Đặc điểm phôi sau rã đông của 2 phương pháp đông phôi chậm và phôi thủy 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, tỷ lệ phôi sống nguyên vẹn, tỷ lệ phôi phân chia tiếp của phương pháp thủy tinh hóa có xu hướng cao hơn phương pháp đông chậm.

* 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 phôi 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 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. Số lượng phôi tốt càng tăng thì giá trị tiên lượng có thai càng tăng.

- Giá trị tiên lượng có thai của:

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

+ Độ dày niêm mạc tử cung là $\geq 8,05\text{mm}$ 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 tiên 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 tiên lượng về sức khỏe của trẻ sinh ra từ phôi đông chậm và phôi 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 có sự khác biệt giữa 2 phương pháp đông 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.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA NGHIÊN CỨU

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 chuyển phôi.
3. Theo dõi lâu dài sau khi trẻ ra đời cho 2 phương pháp trữ lạnh: đông chậm và thủy tinh hóa.

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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Van Voorhis, B.J., Syrop, C.H., Allen, B.D. *et al.* (1995). “The efficacy and cost effectiveness of embryo cryopreservation compared with other assisted reproductive techniques”. *Fertil. Steril*, 64, 647–650.
2. Kansal Karla S, Molinaro TA, Sammel MD(2008). “Viable pregnancies following versus frozen embryo transfer: is there a difference in the rate of serum human chorionic gonadotropin (hCG) rise”; *Reprod Endocrinol Infertil*; 90(Suppl): 2985.
3. Baker Kaviani, 2 M.R. Safari - Motlagh, M.N. Padasht- Dehkaei, et al. (2008). “Cryopreservation of Lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss] Germplasm by Encapsulation – dehydration”. *International journal of Botany*, 4 (4): 491- 493. 2008.
4. Pelkonen S1, Koivunen R, Gissler M, Nuojua-Huttunen S et al (2010). “Perinatal outcome of children born after frozen and fresh embryo transfer: the Finnish cohort study 1995-2006”. *Hum Reprod*. 2010 Apr;25(4):914-23. doi: 10.1093/humrep/dep477. Epub 2010 Feb 2.
5. Whittingham G. (1974). “The viability of frozen thawed mouse blastocysts”, *Article in J Reprod Fertil*, 37(1):159-62 · April 1974.
6. Frabbi R, Porcu E, Marsella T. (2001). “Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival”. *Hum Reprod*, 16:411-416.
7. Rall WF, Fahy GM. (1985). “Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification”. *Nature*. 1985 Feb 14-20;313(6003):573-5.
8. Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, et al (2002). “Potential Importance of vitrification in reproductive medicine”, *Biol Repord*, 67:1671-1680.

9. Shaw JM, Jones GM(2003). "Terminology assopreseration procedures for oocytes and embryos". *Hum Reprod*, Update 9:583-605.
10. Vajta G and Nagy ZP (2006), "Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory: Review on vitrification". *Reprod BioMed Online* 12:779-796.
11. Yahin S and Arav A (2007). "Measurement of essential physical properties of vitrification solutions". *Theiogenolog*; 67(1):81-89.
12. J. Barkay, M.D., H. Zuckerman, M.D., And M. Heiman (1974). "A New. Practical Method Of Freezing And Storing Human Sperm And A Preliminary Report On Its Use",*Hum Repod Vol. 25, No.5, May 1974*.
13. Yogev L. Kleiman SE. Shabtai E et al (2010). "Long- term cryostorage of sperm in a human aperm bank does not damage progressive motility concentration". *Hum Repod* 25(5): 1097-1103.
14. Haimov- Kochman R, Lossos F, Nefesh I et al (2009). "The value of repeat testicular sperm retrivial in azoospermic men". *Fertil Steril* 91: 1401-3.
15. D'Angelo A, Amso NN (2007). "Embryo freezing for preventing ovarial hyperstimulation syndrome". *Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 3. Art. No: CD002806. DOI:10.1002/14651858. CD002806. pub2*.
16. Ozmen B and Safaa A (2010). "Techniques for Ovarian Tissue, Whole Ovary, Oocyte and Embryo Cryopresevation". *J Reprod Infertil*, 11:3-15.
17. Cobo A. Meseguer M, Remohy J et al (2010). "Use of cryo- banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective randomized, controlled, clinical trial". *Hum Reprod*, 25: 2239-2246.
18. Tselutin K, Seigneurin F and Blesbois E (1999). "Comparison of Cryoprotectants and methods of cryopresevation of Fowl Spermatozoa". *Poultry Science*, 78:586-590.

19. Smith GD and Fioravanti J (2007). "Oocyte and Embryo Cryopreservation. In: Gardner DK, ed. *In Vitro Fertilization: A practical approach*". *New York: Informa Healthcare*; 3331-364.
20. Trounson A and Morh L (1983). "Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo". *Nature* 305:707-9.
21. Nagy Zp, Vajta G, Chang C and Kort H (2009). "The human embryo: Vitrification. In: Gardner D, Weissman A, Howles C and Shoham Z, eds. *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and clinical perspective*". *London: Informa healthcare*; 289-304.
22. Borini A, Coticchio G (2009). "The human oocyte: controlled rate cooling, In: Gardner D, Weissman A, Howles C and Shoham Z, eds". *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and clinical perspective. London Informa Healthcare*: 255-266.
23. Kansai M et al. (1990). "A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solutions, without appreciable loss of viability". *J Reprod Fertil*; 89(1).
24. Ada Cean IA, Ilie Daniela, Nicole Păcală (2013). "The Cryotoxic Effect of Cryoprotective Agents on in vitro Fertilization Rates of Mammalian Oocytes". *Animal Science and Biotechnologies*; 46(2).
25. Sola-Penna M and Meyer-Fernandes JR (1998). "Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars?" *Arch Biochem Biophys*; 360(1): 10- 14.
26. Tsutomu Uchida ST, Masafumi Nagayama, Kazutoshi Gohara (2012). "Freezing Properties of Disaccharide Solutions: Inhibition of Hexagonal Ice Crystal Growth and Formation of Cubic Ice in Crystallization and Materials Science of Modern Artificial and Natural Crystals". *DE Borisenko, Editor. InTech*.

27. Goral- Gandhi et al (2015): “Appendix A: Cryotech Vitrification Thaw” Protocol in cryopreservation of Mammalian Gametes and Embryos”, pp 281-295. *Part of the Methods in Molecular Biology book series (MIMB, volume 1568).*
28. J Ali. (1993).“The importance of pre-freeze equilibration of glycerol in cryopreservation of human spermatozoa and the biochemical conversion of glycerol”. *Article in International journal of fertility and menopausal studies 38(3):180-6 · May 1993.*
29. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S and Kato O. (2005). “Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes”. *Reprod BioMed Online, 11:300-308.*
30. Vajta G. (1998).“Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos”, *First published: 07 December 1998, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)10982795\(199809\)51:1<53:AID-MRD6>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)10982795(199809)51:1<53:AID-MRD6>3.0.CO;2-V).*
31. Kuwayama M. (2007). “Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method”. *Theriogenology; 67, 73-80.*
32. Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. (2008). “Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development”. *Cryobiology, 57:137-141.*
33. Kuwayama M. (2012).“The Cryotec method manual book for oocyte and embryo”. *Japan: Cryotech Lab; 2012. p. 1.*
34. Panagiotidis Y, Vanderzwalmen P, Prapas Y, Kasapi E, Goudakou M, Papatheodorou A, Passadaki T, Petousis S, Nikolettos N, Veletza S, Prapas N, Maroulis G. (2013). “Open versus closed vitrification of blastocysts from an oocyte-donation programme: a prospective randomized study”. *Reprod Biomed Online; 26,470-476.*

35. Loutradis K, Kolibianakis E, Venetis C, Papanikolaou E, Pados G, Bontis I and Tarlatzis B (2008). "Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing:a systematic review and meta-analysis". *Fertil Steril*, 90:186-93.
36. Cobo A, Meseguer M, Remohy J. et al (2010). "Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective randomized, controlled, clinical trial". *Hum Reprod*, 25: 2239-2246.
37. Rudick B, Opper N, Paulson R, Bendikson K and Chung K (2010). "The status of oocyte cryopreservation in the United States". *Fertil Steril* (in press).
38. Keskinetepe J, Agca Y, Bayrak A and Sher G (2009). "Effective human and mouse blastocyst vitrification system: introducing cryopette". *Fertil Steril*, 92, Suppl. S24.
39. J.X Wang, Y.Y.Yap and C.D.Matthews (2001), "Frozen – thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception", *Hum Reprod*, 2001; 16(11), pp 2316-2318.
40. P-O Karlstrom, T. Bergh, A-S Forsberg, U Sandkvist and M Wiklaud (1997), "Pronostic factors for the success rate of embryo fzeering", *Hum Reprod*; 12(6), pp 1266-1267.
41. Maryam Eftekhar, M.D., Elham Rahmani, M.D. et al (2014). "Evaluation of clinical factors influencing pregnancy rate in frozen embryo transfer". *Iran J Reprod Med*. Jul; 12(7): 513–518.
42. Check JH, Katsoff B, Brasile D, Choe JK, Amui J. (2008). "Pregnancy outcome following in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) in women of more advanced reproductive age with elevated serum follicle stimulating hormone (FSH) levels". *Clin Exp Obstet Gynecol*. 35:13–15.

Field Code Changed

Field Code Changed

43. Kuwayama M, Vajta G, Kato O and Leibo S (2005b). "Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination". *Reprod BioMed Online* 11:608-14.
44. Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, CoslovskyN (2010). "Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification". *Fertil Steril* (in press).
45. Paulson R.J, Thornton M.H, Francis M.M, Salvador H.S (1997), "Successful pregnancy in a 63 year – old woman", *Fertility Sterility*, 67(5), 949 –951.
46. NoyesN et al.(1999). "In vitro fertilization outcome relative to embryo transfer difficulty: a novel approach to the forbidding cervix". *Fertil Steril*. 1999 Aug;72(2):261-5.
47. Hu Y, Maxson, W.S , Hoffman, D.I. Etal (1999), "A comparison of post – thaw result between cryopreserved embryos derived from ICSI and those from conventional IVF", *Fertil and steril*, 72, 1045 – 1048.
48. Machtinger, Dor J, Levron J, Mashiach S, et al (2002), " The effect of prolonged cryopreservation on embryo survival." . *Gynecol Endocrinol*, 16,293–298.
49. Fogarty NM, Maxwell WM, Eppleston J and Evans G (2000). "The viability of transferred sheep embryos after long-term cryopreservation", *Reprod Fertil Dev* 12,31–37.
50. A. Revel, A. Safran, N. Laufer, B.E. Reubinov and A. Simon Israel (2004), "Twin delivery following 12 years of human embryo cryopreservation Case report. University of New South Wales (UNSW)" *Embryology website*, Dr. Mark Hill (2005).

51. Nguyễn Thị Minh, Trần Văn Hanh, Lê Thị Phương Lan, Nguyễn Thị Liên Hương, (2006), “Liên quan giữa chất lượng phôi trước đông và sau rã đông”, *Hội nghị vô sinh và hỗ trợ sinh sản* 11-12/9/2006, tr 76.
52. Schroder AK et al. (2003). “Counselling on cryopreservation of pronucleated oocytes”. *Reprod Biomed Online*. Jan-Feb; 6(1): 69-74.
53. Ferraretti AP; Gianaroli; Magli C, Fortini D; Selman HA; Felicani E. (1999). “Elective cryopreservation of all pronucleate embryos in women at risk of ovarian hyperstimulation syndrome: efficiency and safety”. *Hum Reprod*. Jun;14(6): 1457-60.
54. Senn A et al. (2000). “Prospective randomized study of two cryopreservation policies avoiding embryo selection: the pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage”. *Fertil Steril*. Nov; 74(5):946-52.
55. A.Demoulinet al. (1991). “Pregnancy rates after transfer of embryos obtained from different stimulation protocols and frozen at either pronucleate or multicellular stages”. *Hum Reprod*. Vol.6, No.6, pp 799-804.
56. Salumets A., Tuuri T., Makinen S. (2003). “Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen- thawed embryo transfer”, *Hum Reprod*. 2003 Sep; 18 (9):1890- 1895.
57. Veeck LL et al. (1993). “Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes”. *Fertil Steril*. Jun; 59(6): 1202-7.
58. Amarin ZO (2004). “A flexible protocol for cryopreservation of pronuclear and cleavage stage embryos created of pronuclear and cleavage stage embryos created by conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection”. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 117:189-193.

59. Horne, G., Critchlow, J. D., Newman, M. C., et al. (1997).” A prospective evaluation of cryopreservation strategies in a two-embryo transfer programme”. *Hum Reprod.*, 12,542–547.
60. Edgar DH, Bourne H, McBrain JC (2000). “The developmental potential of cryopreserved human embryo”. *Mol Cel Endocrinol* 169:69-72.
61. Mandelbaum J, Plachot M, Junca AM et al. (1994). “Human embryo cryopreservation in an IVF program. Limits, facts, prospects In : Mori T, Aono T, Tomminaga T , Hiroi M eds. *Frontiers in endocrinology*”. *Ares Serono Symposia* 505 -12.
62. Christophe Sifer M.D., Afifa Sellami M.D., Christophe Poncelet M.D.(2006),”Day 3 compared with day 2 cryopreservation does not affect embryo survival but improves the out come of frozen-thaw embryo transfers”. *Fertility and Sterility. Volume 86, Issue 5, November 2006, Pages 1537-1540*].
63. Carroll J, Depypere H, Matthews CD(1990).”Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes”. *J Reprod Fertil* 1990;90:547-553.
64. Check JH¹, Hoover L, Nazari A, O’Shaughnessy A, Summers D (1996). “The effect of assisted hatching on pregnancy rates after frozen embryo transfer”, *Fertil Steril.* 1996 Feb;65(2):254-7.
65. Martins WP, Rocha IA, Ferriani RA, Nastri CO (2011). “Assisted hatching of human embryos: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials”, *Hum Reprod Update.* 2011 Jul-Aug;17(4):438-53.

66. Kostas Pantos. et al. (2001). "Cryopreservation of Embryos, Blastocysts, and Pregnancy Rates of Blastocysts Derived from Frozen-Thawed Embryos and Frozen-Thawed Blastocysts". *J of Assisted Reproduction and Genetics. Vol.18:pp 579-572.*
67. Liebermann J; Tucker MJ. (2006). "Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application". *Fertil Steril. Jul; 86(1): 20-6.*
68. P-O Karlstrom, T. Bergh, A-S Forsberg, U Sandkvist and M Wiklund (1997), "Pronostic factors for the success rate of embryo freezing", *Hum Reprod; 12(6), pp 1266-1267.*
69. Lê Thị Phương Lan. (2004). "Nhận xét 50 trường hợp chuyển phôi đông lạnh đầu tiên tại Trung Tâm HTSS Bệnh viện Phụ Sản Trung Ương", *Báo cáo khoa học 2004.*
70. Đặng Quang Vinh và cs.(2005). "Trữ lạnh phôi và trữ lạnh trứng ngời trong hỗ trợ sinh sản". *Sức khỏe và sinh sản.*
71. John F.Payne et al. (2005). "Relationship between pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) and standard day 2 or 3 embryo morphology with regard to assisted reproductive technique outcomes". *Fertil Steril, vol.84, Issue 4, Oct 2005, pp 900-909.*
72. Phan Thị Thanh Lan. "So sánh kết quả giữa hai nhóm bệnh nhân: có sử dụng và không sử dụng GnRHa trước chuyển phôi đông lạnh". *Luận văn thạc sỹ y học, Đại học Y Hà nội – 2008.*
73. Mansour R et al (1994). "Dummy embryo transfer using methylene blue dye", *Hum Reprod. vol 9, pp 1257-1259.*
74. Cem Fiçicioglu et al. (2005). "The difficulties encountered with embryo transfer and the role of catheter choice in clinical pregnancy success rates in an IVF cycle".

75. Candido Tomas et al. (2002). "The degree of difficulty of embryo transfer is an independent factor for predicting pregnancy". *Hum Reprod.* 2002 Oct;17(10): 2632-5.
76. Tur-Kaspa I et al. (1998). "Difficult or repeated sequential embryo transfers do not adversely affect in-vitro fertilization pregnancy rates or outcome". *Hum Reprod.* 1998 Sep;13(9):2452-5.
77. Mazdak Momeni, Mohammad H Rahbar,¹ and Ertug Kovanci. (2011). "A meta-analysis of the relationship between endometrial thickness and outcome of *in vitro* fertilization cycles". *Hum Reprod Sci. Sep-Dec; 4(3): 130–137.*
78. Liu FZ et al Han XF, Niu ZY, (2005). "Effect of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen". *Inter J Poul Sci 4:197-201.*
79. El-Toukhy T., Coomarasamy A., Khairy M., et al. (2008). "The relationship between endometrial thickness and outcome of medicated frozen embryo replacement cycles". *Fertil Steril.* 89:832–839.
80. Singh N, Bahadur A, Mittal S, et al. "Predictive value of endometrial thickness, pattern and sub-endometrial blood flows on the day of hCG by 2D doppler in in-vitro fertilization cycles: a prospective clinical study from a tertiary care unit". *J Hum Reprod Sci.* 2011;4:29–33. doi: 10.4103/0974-1208.82357.
81. Chen Shee-Uan, Yih-Ron Lien, Hsin-Fu Chen, et al (2005). "Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI". *Human Reproduction Vol.20, No.7 pp. 1975–1980, 2005*
82. Check J.H., Dietterich C., Graziano V., et al (2004). "Effect of maximal endometrial thickness on outcome after frozen embryo transfer". *Fertil Steril.* 81:1399–400.

83. C Pope, Cook EKD, Army M, et al (2004); “ Influence of embryo transfer depth on in vitro fertilization and embryo transfer outcomes”. *Fertil Steril*81,51–58.
84. J Family, Elham Azimi Nekoo, et al. “Artificial Endometrial Preparation for Frozen-Thawed Embryo Transfer with or without Pretreatment with Depot Gonadotropin Releasing Hormone Agonist in Women with Regular Menses”, *J Family Reprod Health* 2015 Mar; 9(1): 1–4.
85. Simon A., Hurwitz A., Zentner B.S., et al. (1998). “Transfer of frozen–thawed embryos in artificial prepared cycles with and without prior gonadotrophin-releasing hormone agonist suppression: a prospective randomized study”. *Hum Reprod*, 13, 2712–2717.
86. Glujovsky D¹, Pesce R, Fiszbajn G, et al. “Endometrial preparation for women undergoing embryo transfer with frozen embryos or embryos derived from donor oocytes”. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Jan 20;(1).
87. Ghobara T¹, Vandekerckhove P. (2008). “Cycle regimens for frozen-thawed embryo transfer”, *Cochrane Database Syst Rev*., 2008 Jan 23;(1).
88. Nguyễn Thị Liên Hương (2014). "Nghiên cứu kỹ thuật hỗ trợ phôi thoát màng bằng tia laser trong một số chỉ định trên bệnh nhân thụ tinh trong ống nghiệm", *Tạp chí nghiên cứu Y học*, số 2, 5-9.
89. Martins WP, Rocha IA, Ferriani RA, et al (2011). “Assisted hatching of human embryos: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials”, *Hum Reprod Update*. 2011 Jul-Aug;17(4):438-53.

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

90. [World Health Organization \(1993\). Sample size calculation in healthstudy. WHO, Geneva, Swetzeland.](#)
91. [Hán Mạnh Cường \(2010\), "Đánh giá hiệu quả của phương pháp hỗ trợ phôi thoát màng trong chuyển phôi đông lạnh tại bệnh viện phụ sản Trung Ương", Luận văn Thạc sỹ y học.](#)
92. Zegers-Hochschild F et al. (2009), "International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology", *Grossary of ART Terminology. Vol.92, No.5.*
93. WHO "Child Growth Standards, WHO library cataloguing-in-Publication Data", *ISBN 924. 154693X- NLM Classification VS 103-2007.*
94. Nguyễn Thị Xuyên chủ biên (2014). "Hướng dẫn phát hiện sớm, can thiệp sớm trẻ em khuyết tật"; *Tài liệu dành cho cán bộ y tế; Bộ Y tế Việt Nam 2014; trang 38-58.*
95. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011). "The Istanbul consensus workshop on embryo asseemet:Preceedings of an expertmeeting". *Hum Reprod, 26 (6): 1270 – 1283.*
96. Zdrovka Veleva, Orava M, Nuojuua-Huttunen S, et al .(2013). "Factors affecting the outcome of frozen-thawed embryo transfer". *Hum Reprod. 2013 Sep;28(9):2425-31.*
97. Mojtaba.R.V et al (2009) "Vitrification versus slow- freezing gives excellentsurvival, post- warming embryo morphology and pregnancy outcomes for humancleaved embryos ". *Journal Assist Reprod Genet Jun; 26(6), 347- 354.*

Formatted: Font: 14 pt, Not Bold, Font color: Auto

Formatted: Font: 14 pt, Not Bold, Font color: Auto, Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

98. Rama Raju et al (2008). "Vitrification of human 8- cell embryo, a modified protocol for better pregnancy rate". *Reprod, Biomed online*; 11; 434- 437.
99. Li. Y (2007). "Comparison of vitrification and slow- freezing of human day 3 cleavage stage embryos: post- vitrification development and pregnancy outcome". *Zhonghua fu chan ke za zhi*; volume 42, issue 11.
100. Balaban B et al (2008). "A randomized controlled study of human days embryocryopreservation by slow - freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation". *Human Reprod*; 23(9);1976-1982.
101. Chi F et al- 2013 "Vitrification of day 3 cleavage – stage embryos yields better clinical outcome in comparison with vitrification of day 2 cleavage – stage embryo" *Zygote*. 2013.Aug 22: 1-8.
102. Nguyễn Thị Thu Lan- 2011 "Trữ lạnh phôi ngày 2 bằng phương pháp thủy tinh hoá" *Vô sinh và hỗ trợ sinh sản, Hosrem* 08/05/2011.
103. Rama Raju et al – 2009 "Neonatal outcome after vitrified day 3 embryo transfers: a preliminary study" *Fertil Steril* 2009; 92: 143-8.
104. Nina Desai et al- 2010 "Clinical pregnancy and live births after transfer of embryos vitrified day 3". *Reproductive Bio Medicine online* (2010) 20, 808-813.
105. Giovanna Fasano et al – 2014 "A randomized controlled trial comparing two vitrification methods versus slow-freezing for cryopreservation of human cleavage stage embryos" *J Assist Reprod Genet. Fer* 2014; 31(2): 241-247.

106. DebrockS (2015), “Vitrification of cleavage stage day 3 embryos results in higher live birth rates than conventional slow freezing: A RCT” *Human Reproduction* 30(8) · June 2015.
107. Zhu HY, Ya-Mei Xue, Ling-Yun Yang, et al (2015), “Slow freezing should not be totally substituted by vitrification when applied to day 3 embryo cryopreservation: an analysis of 5613 frozen cycles”. *J Assist Reprod Genet* . 2015 Sep; 32(9): 1371–1377.
108. Kaartinen N, Kananen K, Huhtala H, et al (2016), “The freezing method of cleavage stage embryos has no impact on the weight of the newborns”. *J Assist Reprod Genet* . 2016 Mar; 33 (3): 393-399.
109. Balaban B, Urman B, Ata B, et al (2008), “ A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation”. *Hum Reprod*. 2008;9:1976–82.
110. Levron J, Leibovitz O, Brengauz M , et al(2014).“Cryopreservation of day 2-3 embryos by vitrification yields better outcome than slow freezing”. *Gynecol Endocrinol*. 2014;30(3):202–4.
111. Rezazadeh Valojerdi M, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, et al (.2009), “ Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos”. *J Assist Reprod Genet*. 2009;26(6):347–54.
112. Van Landuyt L, Van de Velde H, De Vos A, et al (2013). “Influence of cell loss after vitrification or slow-freezing on further in vitro development and implantation of human day 3 embryos”. *Hum Reprod*. 2013;28(11):2943–9.

113. Liu SY, Teng B, Fu J, et al (2013). “Obstetric and neonatal outcomes after transfer of vitrified early cleavage embryos”. *Hum Reprod.* 2013;28(8):2093–100.
114. Sifer C¹, Sermondade N, Dupont C, et al (2012), “Outcome of embryo vitrification compared to slow freezing process at early cleavage stages. Report of the first French birth”. *Gynecol Obstet Fertil.* 2012 Mar;40(3):158-61.
115. Junwei Zhang, Mingze Du, Zhe Li, et al (2018): “Fresh versus frozen embryo transfer for full-term singleton birth: a retrospective cohort study”. *J Ovarian Res.* 2018; 11: 59.
116. Zhang T, Li Z, Ren X, “Endometrial thickness as a predictor of the reproductive outcomes in fresh and frozen embryo transfer cycles: A retrospective cohort study of 1512 IVF cycles with morphologically good-quality blastocyst”. *Medicine (Baltimore).* 2018 Jan;97(4):e9689.
117. Bu Z, Wang K, Dai W, Sun Y. “Endometrial thickness significantly affects clinical pregnancy and live birth rates in frozen-thawed embryo transfer cycles”. *Gynecol Endocrinol.* 2016 Jul;32(7):524-8
118. Peeraer K, “Frozen-thawed embryo transfer in a natural or mildly hormonally stimulated cycle in women with regular ovulatory cycles: a RCT”. *Hum Reprod.* 2015 Nov;30(11):2552-62.
119. Vũ Minh Phương (2015). “Nhận xét kết quả chuyển phôi đông lạnh của kỹ thuật trữ lạnh phôi ngày 2 và phôi ngày 3 tại bệnh viện phụ sản Trung Ương”. *Luận văn thạc sỹ y học, Đại học Y Hà nội, tr 82-87.*
120. WilliamSB Yeung, TM Cheung, Ernest HYNg, EstellaYLLau, PC Ho. (2007), "Frozen-thawed embryo transfer cycles", *Hong Kong Med J.* 15(6), tr. 420.

121. Vahratian A1, Reynolds MA, Jeng G. (2003 Jul), "Live-birth rates and multiple-birth risk of assisted reproductive technology pregnancies conceived using thawed embryos", *Hum Reprod.* 18(7), tr. 1442-8.
122. Nguyễn Xuân Huy (2004), "*Nghiên cứu kết quả thụ tinh trong ống nghiệm tại Bệnh viện phụ sản Trung Ương năm 2003*", Luận văn tốt nghiệp bác sỹ chuyên khoa 2, trường đại học y Hà Nội, tr. 3-52.
123. Josephine Lemmen, PhD Clinical Embryologist, Fertility Clinic, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark. "Criteria to select oocytes and embryos for cryopreservation", *IVF worldwide*. Com Weissman.
124. Wenhao Shi, Wanqiu Zhao, Xue Xia, et al (2013), "Factors related to clinical pregnancy after vitrified-warmed embryo transfer: a retrospective and multivariate logistic regression analysis of 2313 transfer cycles", *Human Reproduction*. Vol.28(No.7), tr. 1768– 1775.
125. Neha Palo Chandel (2015), "Outcome Analysis of Day-3 Frozen Embryo Transfer v/s Fresh Embryo Transfer in Infertility: A Prospective Therapeutic Study in Indian Scenario", *Journal of Obstetrics and Gynecology of India* 66(5) · May 2015.
126. Hassan N Sallam (2004), "Embryo transfer - a critique of the factor involved in optimizing pregnancy success", *Advance infertility and reproduction medicine. IFFS*, tr. 111 - 117.
127. M. Ashra fi et al."The factors effecting the outcome of frozen-thawed embryo transfer".*Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 50 (2011) 159 e 164,
128. Rienzi L. (2017). "Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance".*Hum Reprod Update*. 2017 Mar 1;23(2):139-155.

129. Lin T-K, Su J-T, Lee F-K, et al (2010), “Cryotop vitrification as compared to conventional slow freezing for human embryos at the cleavage stage: survival and outcomes”. *Taiwan J Obst Gynecol*. 2010;49(3):272–8.
130. Bettio D, Venci A, Levi Setti PE. (2008). “Chromosomal abnormalities in miscarriages after different assisted reproduction procedures” *.Placenta*. 2008;29(Suppl B):126–12. doi: 10.1016/j.placenta.2008.08.015.[PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
131. Kim JW, Lee WS, Yoon TK, et al. (2010). “Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment”. *BMC Med Genet*. 2010;11:153.
132. Martínez MC, Méndez C, Ferro J, et al. (2010). “Cytogenetic analysis of early nonviable pregnancies after assisted reproduction treatment”. *Fertil Steril*. 2010;93(1):289–92.
133. Wang X, Zhang X, Qin Y, Hao D, Shi H. Outcomes of day 3 embryo transfer with vitrification using Cryoleaf: a 3-year follow-up study. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(9):883–9. doi: 10.1007/s10815-012-9814-y. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
134. SPelkonen, Gissler M², Koivurova S³, et al (2015): “Physical health of singleton children born after frozen embryo transfer using slow freezing: a 3-year follow-up study”. *Hum Reprod*. 2015 Oct;30(10):2411-8. doi: 10.1093/humrep/dev203. Epub 2015 Aug 20.
135. Ulla-Britt Wennerholm (2013). “Perinatal outcomes of children born after frozen thawed embryo transfer: a Nordic cohort study from the CoNart as group”. *Hum Reproduction*, Volume 28, Issue, 1 September 2013, Pages 2545-2553.

136. F Belva, Bonduelle M, Roelants M, et al (2016): “ Neonatal health including congenital malformation risk of 1072 children born after vitrified embryo transfer”. *Hum Reprod.* 2016;31(7):1610–1620.
137. Osamu Kato, Kawasaki N, Bodri D, et al (2012): “Neonatal outcome and birth defects in 6623 singletons born following minimal ovarian stimulation and vitrified versus fresh single embryo transfer”. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;161(1):46–50.
138. Shi W, Xue X, Zhang S, Zhao W, Liu S, Zhou H, et al. Perinatal and neonatal outcomes of 494 babies delivered from 972 vitrified embryo transfers. *Fertil Steril.* 2012;97(6):1338–42.
139. Antonina Sazonova; Karin (2012). “Obstetric outcome in singletons after invitro fertilization with cryopreser thawed embryos”. *Human Reproduction: Volume 27, Issue5, 1 May 2012, pages 1343-1350.*
140. Belva F¹, Henriët S, Van den Abbeel E, et al (2008). “Neonatal outcome of 937 children born after transfer of cryopreserved embryos obtained by ICSI and IVF and comparison with outcome data of fresh ICSI and IVF cycles”. *Human Reproduction* 2008 Oct;23(10):2227-38.
141. Maheshwari A, Pandey S, Amalraj Raja E et al (2018), “Is frozen embryo transfer better for mothers and babies? Can cumulative meta-analysis provide a definitive answer?” *Hum Reprod Update.* 2018 Jan 1;24(1):35-58.
142. Gurleen Sharland (2018), “Bệnh học tim thai giãn yếu (sổ tay thực hành)/ Đặng Ngọc Tuyên (Biên dịch)”, *Nhà xuất bản Y học.* 2018, tr 49-55.

143. Zhao Y, Abuhamad A, Fleenor J et al (2016), “Prenatal and Postnatal Survival of Fetal Tetralogy of Fallot: A Meta-analysis of Prenatal outcomes and associated genetic disorders”, *J Ultrasound Med*, 35(5), 905-915.
144. Bùi Hải Nam, Trần Danh Cường, Nguyễn Thị Hiệp Tuyết (2019), “Chẩn đoán trước sinh bất thường nhiễm sắc thể ở thai có tứ chứng Fallot”, *Tạp chí Phụ sản*, tập 16 (04), 06-2019, tr 06-10.
145. Dai W, Jiang Y, Gulinazi M et al (2015), “Application for prenatal diagnosis using both chromosomal karyotype analysis and BACs-on-Beads assay”, *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 35 (3), pp 357-360.

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1: TỔNG QUAN	3
1.1. Những thay đổi bên trong tế bào trong quá trình trữ lạnh.	3
1.2. Các biện pháp hạn chế tổn thương tế bào trong trữ lạnh.	6
1.2.1. Sử dụng chất bảo quản lạnh (CPA)	6
1.2.2. Kiểm soát tốc độ làm lạnh và rã đông	10
1.2.3. Trang thiết bị và dụng cụ	12
1.3. Các phương pháp trữ lạnh.	13
1.3.1. Hạ nhiệt độ chậm (Slow - freezing)	14
1.3.2. Thủy tinh hóa (vitrification).....	17
1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả chuyển phôi trữ lạnh.....	31
1.4.1. Các tác nhân ảnh hưởng đến hiệu quả quy trình trữ lạnh	31
1.4.2. Tuổi của người vợ.....	33
1.4.3. Nguyên nhân vô sinh	34
1.4.4. Kỹ thuật hỗ trợ.....	34
1.4.5. Thời gian bảo quản phôi.	34
1.4.6. Tuổi phôi trước đông.	34
1.4.7. Số phôi được chuyển vào buồng tử cung.....	38
1.4.8. Chất lượng phôi được chuyển vào buồng tử cung.	38
1.4.9. Ảnh hưởng của kỹ thuật chuyển phôi.	39
1.4.10. Ảnh hưởng của nội mạc tử cung (NMTC) tới kết quả chuyển phôi đông lạnh (FET)	40
1.4.11. Ảnh hưởng của kỹ thuật hỗ trợ phôi thoát màng.	43
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	45
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	45
2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn.....	45
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ.....	45

2.2. Địa điểm nghiên cứu	45
2.3. Thời gian nghiên cứu	45
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	45
2.5. Cỡ mẫu nghiên cứu	45
2.6. Phương pháp tiến hành và thu thập số liệu	46
2.7. Sơ đồ nghiên cứu.	48
2.8. Các chỉ tiêu và biến số nghiên cứu.	50
2.8.1. Phôi.	50
2.8.2. Một số yếu tố liên quan đến tỷ lệ có thai.....	50
2.8.3. Thai.	54
2.8.4. Diễn biến thai kỳ.....	54
2.8.5. Trí tuệ và tâm vận động từ khi sinh đến khi trẻ 4 tuổi	55
2.9. Kỹ thuật thu thập số liệu	56
2.10. Xử lý và phân tích số liệu.....	56
2.11. Một số sai sót và cách khắc phục.....	57
2.12. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu.....	57
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	58
3.1. Đặc điểm phôi trước và sau rã đông của 2 phương pháp.	58
3.1.1. Đặc điểm mẫu phôi nghiên cứu.....	58
3.1.2. Mối tương quan về số lượng phôi qua các bước kỹ thuật theo phân độ phôi.	60
3.1.3. Chất lượng phôi trước và sau rã đông.	65
3.2. Một số yếu tố liên quan và tiên lượng của 2 phương pháp.....	69
3.2.1. Đặc điểm của bệnh nhân nghiên cứu.....	69
3.2.2. Một số yếu tố liên quan đến kết quả có thai của hai phương pháp.71	
3.2.3. Kết quả và tiên lượng của 2 phương pháp.	102

Chương 4: BÀN LUẬN	108
4.1. Bàn luận về phương pháp nghiên cứu.	108
4.1.1. Đối tượng nghiên cứu và phương pháp nghiên cứu.	108
4.1.2. Cỡ mẫu nghiên cứu – Đặc điểm nghiên cứu.....	109
4.2. Bàn luận về đặc điểm phôi trước và sau rã đông của 2 phương pháp đông chậm và thủy tinh hóa.....	109
4.2.1. Đặc điểm mẫu phôi nghiên cứu.....	109
4.2.2. Mối tương quan về số lượng phôi qua các bước kỹ thuật.	109
4.2.3. Đánh giá chất lượng phôi sau rã và trước chuyển.....	112
4.3. Bàn luận về một số yếu tố liên quan và tiên lượng của 2 phương pháp đông chậm và thủy tinh hóa.....	119
4.3.1. Đặc điểm bệnh nhân và mối liên quan đến kết quả có thai.	119
4.3.2. Bàn luận về một số yếu tố ảnh hưởng đến kết quả có thai.	122
4.3.3. Bàn luận về kết quả thai nghén và tiên lượng sức khỏe của trẻ sinh ra từ phôi đông chậm và phôi thủy tinh hóa	136
4.4. Bàn về những hạn chế của nghiên cứu.	146
KẾT LUẬN.....	147
KHUYẾN NGHỊ.....	150
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA NGHIÊN CỨU	
CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1:	Một số dụng cụ được sử dụng phổ biến tại các trung tâm TTON trên thế giới.....	22
Bảng 2.1:	Thời điểm quan sát phôi, và giai đoạn phát triển tương ứng ở từng thời điểm.....	51
Bảng 2.2.	Đồng thuận đánh giá phôi ở giai đoạn phân chia.....	52
Bảng 2.3.	Đồng thuận đánh giá chất lượng phôi ngày 4	53
Bảng 3.1.	Đặc điểm mẫu phôi nghiên cứu.....	58
Bảng 3.2.	Số lượng phôi trước đông, sau rã, trước chuyển theo phân độ phôi. .	60
Bảng 3.3.	Mối tương quan giữa số lượng phôi tốt (độ 3) trước đông và số lượng phôi tốt (độ 3) sau rã của 2 phương pháp.	61
Bảng 3.4.	Mối tương quan giữa số lượng phôi trung bình (độ 2) trước đông và số lượng phôi trung bình (độ 2) sau rã của 2 phương pháp. ..	61
Bảng 3.5.	Mối tương quan giữa số lượng phôi xấu (độ 1) trước đông và số lượng phôi xấu (độ 1) sau rã của 2 phương pháp.....	62
Bảng 3.6.	Mối tương quan giữa số lượng phôi tốt (độ 3) sau rã và số lượng phôi tốt (độ 3) trước chuyển của 2 phương pháp.	62
Bảng 3.7.	Mối tương quan giữa số lượng phôi trung bình (độ 2) sau rã và số lượng phôi trung bình (độ 2) trước chuyển của 2 phương pháp. 63	
Bảng 3.8:	Mối tương quan giữa số lượng phôi xấu (độ 1) sau rã và số lượng phôi xấu (độ 1) trước chuyển của 2 phương pháp.....	63
Bảng 3.9:	Mối tương quan giữa số lượng phôi tốt (độ 3) trước đông và số lượng phôi tốt (độ 3) trước chuyển của 2 phương pháp.	64
Bảng 3.10:	Bảng giá trị ước lượng tính theo phương trình tương quan giữa số lượng phôi tốt trước đông và số lượng phôi tốt trước chuyển.	64
Bảng 3.11.	Trung bình số phôi trước đông/ chu kỳ FET theo phân độ phôi.	66
Bảng 3.12.	Trung bình số phôi sau rã/chu kỳ FET theo phân độ phôi.	67
Bảng 3.13.	Trung bình số phôi trước chuyển/chu kỳ FET theo phân độ phôi ...	68
Bảng 3.14.	Chất lượng phôi sau rã và trước chuyển tính theo tỷ lệ.	68

Bảng 3.15. Nhóm tuổi.....	69
Bảng 3.16. Điểm chuyển phôi.....	69
Bảng 3.17. Số phôi chuyển/ chu kỳ FET.....	70
Bảng 3.18. Một số đặc điểm của 2 nhóm BN đông phôi ngày 2 và BN đông phôi ngày 3 của 2 phương pháp.....	70
Bảng 3.19. Mối liên quan giữa tuổi vợ và kết quả có thai.....	71
Bảng 3.20. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của độ dày niêm mạc tử cung.....	73
Bảng 3.21. Tỷ suất chênh về kết quả có thai giữa các nhóm độ dày niêm mạc tử cung.....	74
Bảng 3.22. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi chuyển.....	75
Bảng 3.23. Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi tốt trước đông và kết quả có thai... ..	75
Bảng 3.24. Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi trung bình (độ 2) trước đông và kết quả có thai.....	76
Bảng 3.25. Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi xấu trước đông và kết quả có thai....	76
Bảng 3.26. Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi tốt sau rã và kết quả có thai.....	77
Bảng 3.27. Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi trung bình (độ 2) sau rã và kết quả có thai.....	78
Bảng 3.28. Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi xấu sau rã và kết quả có thai.....	78
Bảng 3.29: Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi tốt trước chuyển và kết quả có thai.....	79
Bảng 3.30. Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi trung bình (độ 2) trước chuyển và kết quả có thai.....	79
Bảng 3.31. Mối liên quan giữa có ≥ 1 phôi xấu trước chuyển và kết quả có thai.....	80
Bảng 3.32. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của điểm chuyển phôi.....	81
Bảng 3.33. Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 2 trước đông chậm.....	82

Bảng 3.34.	Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 2 trước đông thụ tinh hóa.....	86
Bảng 3.35.	Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 3 trước đông thụ tinh hóa.....	88
Bảng 3.36.	Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 2 sau rã đông chậm.....	90
Bảng 3.37.	Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 2 sau rã thụ tinh hóa	92
Bảng 3.38.	Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 3 sau rã thụ tinh hóa.	94
Bảng 3.39.	Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 2- đông chậm trước chuyển.	96
Bảng 3.40.	Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 2- thụ tinh hóa trước chuyển.....	98
Bảng 3.41.	Bảng giá trị tiên lượng kết quả có thai tại các điểm cắt của số lượng phôi tốt ngày 3- thụ tinh hóa trước chuyển.....	100
Bảng 3.42.	Phân tích hồi quy đa biến các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả có thai ở phương pháp thụ tinh hóa.	101
Bảng 3.43.	Kết quả có thai và diễn biến thai kỳ sau chuyển phôi đông chậm....	102
Bảng 3.44.	Kết quả có thai và diễn biến thai kỳ sau chuyển phôi thụ tinh hóa .	103
Bảng 3.45.	Tỷ lệ có thai và diễn tiến thai kỳ của 2 phương pháp.	104
Bảng 3.46.	Cân nặng trung bình thô của trẻ sơ sinh trai, gái tương ứng với tuổi thai 28-42 tuần.	105
Bảng 3.47.	Cân nặng, chiều cao trung bình thô của trẻ sơ trai, gái tương ứng từ 3 tháng đến 4 tuổi.	106
Bảng 3.48.	Phát triển trí tuệ, tâm vận động, bệnh lý ở trẻ sinh ra sau chuyển phôi trữ lạnh.....	107
Bảng 4.1.	Giá trị của số lượng phôi tốt trước đông trong tiên lượng kết quả có thai	129
Bảng 4.2.	Giá trị của số lượng phôi tốt sau rã trong tiên lượng kết quả có thai .	131
Bảng 4.3.	Giá trị của số lượng phôi tốt trước chuyển trong tiên lượng kết quả có thai	133

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1:	Diễn biến chất lượng phôi theo các thời điểm: trước đông, sau rã, trước chuyển.	65
Biểu đồ 3.2.	Mối liên quan giữa độ dày niêm mạc tử cung và kết quả có thai.	72
Biểu đồ 3.3.	Mối liên quan giữa số lượng phôi chuyển và kết quả có thai.	74
Biểu đồ 3.4.	Mối liên quan giữa điểm chuyển phôi và kết quả có thai.	80
Biểu đồ 3.5.	Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 2 trước đông chậm trong tiên lượng kết quả có thai.	82
Biểu đồ 3.6.	Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 3 trước đông chậm trong tiên lượng kết quả có thai.	84
Biểu đồ 3.7.	Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 2 trước đông thủy tinh hóa trong tiên lượng kết quả có thai.	85
Biểu đồ 3.8.	Đường biểu thị độ nhạy, độ đặc hiệu (ROC) của số lượng phôi tốt ngày 3 trước đông thủy tinh hóa trong tiên lượng kết quả có thai.	87
Biểu đồ 3.9.	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.	89
Biểu đồ 3.10.	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.	91
Biểu đồ 3.11.	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.	92
Biểu đồ 3.12.	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.	93
Biểu đồ 3.13.	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.	95

- Biểu đồ 3.14. 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. 97
- Biểu đồ 3.15. 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. 97
- Biểu đồ 3.16. 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. 99

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Phản ứng của phôi khi cho vào môi trường có chứa CPA	3
Hình 1.2.	Bình chứa ni tơ lỏng trữ phôi.....	12
Hình 1.3.	Máy Cryologic	13
Hình 1.4.	Máy Planner	13
Hình 1.5.	Sơ đồ hạ nhiệt độ trong hạ nhiệt độ chậm.....	17
Hình 1.6.	Cryoloop	24
Hình 1.7.	Cryotop	25
Hình 1.8.	Cryotec.....	26
Hình 1.9.	Cryotip	27
Hình 1.10.	HSV straw.....	27
Hình 1.11.	Rapid-I.....	28
Hình 2.1.	Sơ đồ nghiên cứu nhóm phôi đông chậm.....	48
Hình 2.2.	Sơ đồ nghiên cứu nhóm phôi thủy tinh hóa	49

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



PHAN THỊ THANH LAN

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

GS.TS. NGUYỄN VIỆT TIẾN

HÀ NỘI - 2020

LỜI CẢM ƠN

Với tấm lòng biết ơn sâu sắc, em xin gửi lời cảm ơn chân thành tới GS.TS. Nguyễn Viết Tiến, người thầy đã truyền đạt những kiến thức sâu rộng, cũng như tạo điều kiện tốt nhất, động viên em trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu để hoàn thành luận án. Thầy là tấm gương sáng để em suốt đời học tập và noi theo.

Em luôn luôn ghi nhớ và biết ơn các Thầy Cô trong Bộ môn Phụ sản, Bộ môn Nghiên cứu khoa học, Bộ môn Mô phôi, Bộ môn Nhi, các Thầy Cô trong Hội đồng chấm đề cương, các học phần, cũng như chuyên đề, tiểu luận tổng quan, Hội đồng chấm luận án cơ sở đã luôn chỉ bảo, cho em các ý kiến quý báu để hoàn chỉnh luận án.

Em xin chân thành cảm ơn Ban giám hiệu, Phòng đào tạo sau Đại học, các phòng ban chức năng của Trường Đại học Y Hà Nội đã tạo điều kiện thuận lợi cho em trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin gửi tới lãnh đạo và toàn thể đồng nghiệp trong Trung tâm Hỗ trợ sinh sản Quốc gia - Bệnh viện Phụ sản Trung ương, Bệnh viện Phụ sản Hải Phòng, lời cảm ơn chân thành vì đã luôn giúp đỡ về mọi mặt trong công việc, cũng như trong học tập để tôi có thể yên tâm học tập và nghiên cứu.

Tôi xin đặc biệt cảm ơn những bệnh nhân đã đồng ý tham gia nghiên cứu này. Những người đã rất tin tưởng, hợp tác, cung cấp những thông tin cá nhân, giúp tôi có được những dữ liệu quý báu để hoàn thành luận án này.

Tôi xin mãi ghi lòng tạc dạ những tình cảm và công ơn này.

Ngày tháng năm 2020

Phan Thị Thanh Lan

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Phan Thị Thanh Lan nghiên cứu sinh khóa 31 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Sản phụ khoa xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Nguyễn Việt Tiến.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày tháng năm 2020

Tác giả

Phan Thị Thanh Lan

CHỮ VIẾT TẮT

BG	: butylene glycol
BN	: Bệnh nhân
CPA	: Cryoprotective agents (Các chất bảo vệ đông lạnh)
Dex	: dextran.
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
EG	: ethylene glycol.
FET	: Frozen Embryo Transfer (Chuyển phôi đông lạnh)
Fic	: Ficoll
Gly	: Glycerol.
HPC	: hydroxypropyl cellulose
IVF	: Thụ tinh trong ống nghiệm
Me2SO	: dimethylsulfoxide
Met	: methanol
NMTC	: Niêm mạc tử cung
PEG	: polyethylene glycol
PG	: propylene glycol.
PR	: Pregnancy rate (tỷ lệ có thai)
PROH	: 1,2 – propanediol hay propylene glycol
PVP	: polyvilylpyrrolidone
SR	: Survival rate (tỷ lệ sống)
TB	: Tế bào