

Nghiên cứu thực nghiệm đông lạnh noãn bằng phương pháp thủy tinh hóa

Lê Thanh Huyền*; **Quản Hoàng Lâm***;
Nguyễn Thanh Tùng* và **CS**

TÓM TẮT

Nghiên cứu trên 226 noãn chuột nhất trường thành, trong đó 110 noãn được đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa, 116 noãn còn lại sử dụng làm lô đối chứng nhằm đánh giá biến đổi hình thái và khả năng phát triển của noãn chuột sau rã đông (tỷ lệ sống, khả năng thụ tinh, khả năng phát triển phôi) bằng phương pháp thủy tinh hoá. **Kết quả:** hình thái noãn chuột sau rã đông không thay đổi so với trước khi đông lạnh, tỷ lệ sống của noãn chuột sau rã đông cao (98,18%), tỷ lệ thụ tinh của noãn sau rã đông (47,22%) thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm noãn đối chứng không đông lạnh (62,93%) ($p < 0,05$). Tỷ lệ phân cắt của hợp tử tạo được từ noãn sau rã đông đạt 94,12%, không khác biệt so với nhóm phôi tạo được từ noãn không đông lạnh ($p > 0,05$).

* Từ khóa: Noãn chuột; Hình thái noãn; Đông lạnh thủy tinh hóa; Tỷ lệ sống; Tỷ lệ thụ tinh.

Experimental study of oocyte cryopreservation by vitrification

SUMMARY

*The study was carried out on 226 oocytes of mature mouse. Among them, 110 oocytes were vitrified, others were used as control to evaluate morphological changes and the developmental competence of mouse oocyte after vitrified (i.e. survival rate, fertilization ability, embryo developmental competence) by using vitrification method. **Result(s):** Vitrified oocyte does not change in terms of morphology, observed survival rate was 98.18%, fertilization rate of vitrified oocyte (47.22%), which was statistically lower than control samples (62.93%) ($p < 0.05$). There was no difference in cleavage rate for vitrified and fresh oocytes (94.12 % vs. 97.26%, respectively) ($p > 0.05$).*

* *Key words: Mouse oocyte; Morphology of oocyte; Vitrification; Survival rate; Fertilization rate.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, cùng với sự phát triển của kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm, đông lạnh noãn trở thành một lĩnh vực nghiên cứu mang tính thời sự và ngày càng được quan tâm.

Đông lạnh noãn cho phép phụ nữ trì hoãn kế hoạch sinh đẻ, thành lập ngân hàng noãn của người cho, duy trì khả năng sinh sản của những phụ nữ phải xạ trị hay hóa trị, đặc biệt mang lại nhiều cơ hội hơn cho bệnh nhân (BN) khi trong ngày chọc hút

* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: PGS. TS. Hoàng Văn Lông
noãn, người chồng không thể lấy được tinh trùng [1, 5]. Trong những phương pháp sử

dụng để đông lạnh noãn, thủy tinh hóa là phương pháp có rất nhiều ưu điểm, mang

lại hiệu quả cao [3, 6]. Để phát triển kỹ thuật đông lạnh noãn tại Trung tâm Công nghệ Phôi, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhằm đánh giá hiệu quả của phương pháp đông lạnh noãn bằng thủy tinh hóa trên đối tượng động vật thực nghiệm nhằm: *Đánh giá biến đổi hình thái noãn chuột trước đông và sau rã đông, xác định tỷ lệ sống và khả năng thụ tinh của noãn chuột sau rã đông bằng phương pháp thủy tinh hóa.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

226 noãn của 20 chuột nhất cái, 7 - 10 tuần tuổi, được gây động dục nhân tạo bằng tiêm FSH liều 10 IU/chuột vào ổ bụng. Tiêm hormon hCG 48 giờ sau để gây phóng noãn. 14 giờ sau tiêm hCG, tiến hành lấy noãn. Chia noãn chuột thu được làm 2 nhóm: nhóm 1: 110 noãn đông lạnh trong 2 tháng, sau đó rã đông; nhóm 2: 116 noãn không đông lạnh làm đối chứng.

* *Tiêu chuẩn lựa chọn*: noãn trưởng thành ở giai đoạn Metaphase 2 (MII), có hình thái bình thường.

* *Tiêu chuẩn loại trừ*: noãn chưa trưởng thành (GV, MI), noãn sau trưởng thành (post-mature), các noãn có hình thái bất thường (có không bào, thể vùi, có hóc... trong bào tương) hoặc các noãn thoái hóa.

* *Vật liệu, hóa chất*:

Sử dụng bộ môi trường đông lạnh và rã đông noãn/phôi của hãng Kitazato (Nhật

Bản).

2. Phương pháp nghiên cứu.

* *Đông lạnh và rã đông noãn*: áp dụng quy trình đông lạnh thủy tinh hóa theo phương pháp Cryotop của Masashige Kuwayama (2005) [3].

Trước khi đông lạnh, tất cả noãn được xử lý bằng enzyme hyaluronidase (Hyase, Vitrolife) để loại bỏ hết các tế bào nang bao xung quanh. Dùng môi trường cân bằng ES (môi trường có chứa các chất bảo quản lạnh) cân bằng noãn trong 15 phút, ở nhiệt độ phòng (25 - 27°C). Sau khi cân bằng, chuyển noãn sang môi trường thủy tinh hóa VS với tổng thời gian 90 giây. Cuối cùng, đặt noãn lên phần đầu của dụng cụ chứa noãn (Cryotop) và nhúng trực tiếp vào ni tơ lỏng. Để rã đông, nhúng Cryotop từ trong ni tơ lỏng vào môi trường rã đông TS ở 37°C. Sau 1 phút, chuyển noãn sang môi trường hòa tan và để 3 phút ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, rửa noãn 2 lần trong môi trường rửa WS với tổng thời gian 6 phút trước khi chuyển sang môi trường nuôi cấy IVF.

Sau khi rã đông, nuôi cấy noãn trong môi trường IVF trong 2 giờ trước khi tiến hành kỹ thuật IVF.

* *Xác định noãn sống*: sau khi rã đông, noãn sống có màng trong suốt, màng tế bào nguyên vẹn, bào tương sáng màu, về hình thái không thấy có thay đổi so với trước khi đông lạnh (Chen SU, 2001 [2]).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Tổng số 110 noãn chuột được đông lạnh, sau khi rã đông và nuôi cấy 2 giờ, 108 noãn còn sống (98,18%).



Ảnh 1: Noãn bào 2 chuột nhất trước đông lạnh.

Ảnh 2: Noãn bào 2 chuột nhất sau khi rã đông còn sống.

Bảng 1: So sánh độ dày màng trong suốt và đường kính noãn chuột trước đông lạnh và sau rã đông ($X \pm SD$, $n = 108$).

CHỈ TIÊU	TRƯỚC ĐÔNG	SAU RÃ ĐÔNG	p
Độ dày màng trong suốt trung bình (μm)	7,70 \pm 0,74	7,72 \pm 0,80	> 0,05
Đường kính noãn trung bình (μm)	74,17 \pm 2,75	74,32 \pm 2,87	> 0,05

Chụp ảnh noãn trước khi đông lạnh và sau rã đông, trên cơ sở ảnh chụp, đo độ dày màng trong suốt ở 3 vị trí ngẫu nhiên và tính giá trị trung bình, đo đường kính bào tương của 108 noãn sống sau rã đông. Sau khi đo, dùng t-test ghép cặp để so sánh đường kính bào tương noãn, độ dày màng trong suốt trước

đông lạnh và sau rã đông. Kết quả cho thấy: đường kính bào tương noãn và độ dày màng trong suốt của noãn chuột trước đông lạnh và sau rã đông thay đổi không có ý nghĩa thống kê. Hình thái noãn hầu như không biến đổi sau khi đông lạnh.

Bảng 2: Tỷ lệ thụ tinh của noãn chuột sau rã đông và noãn chuột không đông lạnh.

LOẠI NOÃN	THỤ TINH		KHÔNG THỤ TINH	
	n	(%)	n	(%)
Noãn tươi ($n = 116$)	73	62,93	43	37,07
Noãn sau rã đông ($n = 108$)	51	47,22	57	52,78
p	< 0,05			

Kỹ thuật IVF thực hiện với 108 noãn còn sống sau rã đông và 116 noãn chuột không đông lạnh làm đối chứng. Các noãn được xác định có thụ tinh, khi quan sát thấy 2 tiền nhân rõ trong bào tương và 2 thể cực ở xoang quanh noãn. Kết quả cho thấy, 51 noãn (47,22%) có thụ tinh ở nhóm noãn đông lạnh-rã đông, ở nhóm đối chứng, tỷ lệ này đạt 62,93%. Tỷ lệ thụ tinh của lô đối chứng cao hơn so với lô thí nghiệm, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Nghiên cứu của Lane M. và Gardner DK. (2001) cho thấy: sau khi dùng tia laser để mở một lỗ nhỏ 5 μm trên màng trong suốt của noãn chuột đông lạnh-rã đông, kết quả là tỷ lệ thụ tinh IVF của nhóm thủy tinh hóa tương tự như nhóm chứng (69,7% và 73,4%), cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm đông lạnh chậm (69,7% và 39,7%) [4]. Như vậy, kết quả của chúng tôi và nhiều tác giả khác cho thấy: phương pháp thủy tinh hóa có thể bảo quản noãn chuột ở tình trạng rất tốt, tỷ lệ sống sau rã đông cao. Tác động của làm lạnh ảnh hưởng đến màng trong suốt gián tiếp thông qua giải phóng sớm thể vỏ và giảm có ý nghĩa tỷ lệ thụ tinh của nhóm đông lạnh so với nhóm chứng. Tuy vậy, việc áp dụng kỹ thuật hỗ trợ làm tiêu một phần màng zona, sau này là kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương

noãn (ICSI) có thể giải quyết vấn đề này.

Bảng 3: Tỷ lệ phân cắt của hợp tử từ noãn tươi và noãn sau rã đông của chuột nhắt sau 24 giờ.

LOẠI HỢP TỬ	PHÂN CẮT		KHÔNG PHÂN CẮT	
	n	(%)	n	(%)
Từ noãn tươi (n = 73)	71	97,26	2	2,74
Từ noãn sau rã đông (n = 51)	48	94,12	3	5,88
p	> 0,05			

Tỷ lệ phân cắt của hợp tử sau cấy 24 giờ ở lô thí nghiệm và lô đối chứng tương tự nhau ($p > 0,05$). Ở lô thí nghiệm, 3 hợp tử (5,88%) không phân cắt sau 24 giờ. Ở lô đối chứng, 2/73 hợp tử (2,74%) không trải qua phân cắt sau 1 ngày nuôi cấy.

Như vậy, đông lạnh noãn bằng phương pháp thủy tinh hóa có thể gây ảnh hưởng đến khả năng thụ tinh bằng phương pháp IVF của noãn đông lạnh-rã đông, nhưng không gây ảnh hưởng đến khả năng phát triển của phôi được tạo thành.

KẾT LUẬN

- Nghiên cứu đông lạnh noãn bằng phương pháp thủy tinh hóa trên thực nghiệm cho thấy hình thái noãn chuột sau rã đông không thay đổi so với trước khi đông lạnh, tỷ lệ sống của noãn sau rã đông cao (98,18%).

- Đông lạnh noãn chuột bằng phương pháp thủy tinh hóa có thể gây ảnh hưởng đến khả năng thụ tinh của noãn bằng phương pháp IVF thông thường, nhưng không gây ảnh hưởng đến khả năng phát triển của phôi tạo được.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Quang Vinh và CS. Trữ lạnh phôi và trứng trong hỗ trợ sinh sản. Vô sinh và hỗ trợ sinh sản. Hosrem. 2007.
2. Chen SU, Lien YR, Cheng YY., Chen HF, Ho HN, Yang YS. Vitrification of mouse oocytes closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. Hum Reprod. 2001, 16, pp.2350-2356.
3. Kuwayana M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of

human oocytes. Reproductive BioMedicine Online. 2005, 11 (3), pp.300-308.

4. Lane M, Gardner DK. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. Mol Reprod Dev. 2001, 58, pp.342-347.

5. Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. Fertil Steril. 2006, 86, pp.70-80.

6. Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R. et al. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. Human Reproduction. 2010, 25 (1), pp.66-73.