

TRƯỜNG HỢP CÓ THAI ĐẦU TIÊN TỪ PHÔI TRỮ LẠNH BẰNG KỸ THUẬT THỦY TINH HÓA SỬ DỤNG HỆ THỐNG ĐÓNG CRYOPETTE

Nguyễn Hữu Duy¹ Nguyễn Ngọc Quỳnh^{1,3} Huỳnh Gia Bảo^{2,3} Đặng Quang Vinh^{1,4}

Tóm tắt

Đông lạnh noãn/phôi cho bệnh nhân trong một chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm đã trở thành một phần không thể thiếu ở các trung tâm IVF trên thế giới. Hiện nay trên thế giới có hai phương pháp đông lạnh đang được sử dụng là đông lạnh chậm và đông lạnh cực nhanh (phương pháp thủy tinh hóa). Tuy nhiên, sử dụng phương pháp thủy tinh hóa thay cho phương pháp đông lạnh chậm đang là xu hướng chủ yếu hiện nay do có nhiều ưu điểm hơn. Trong phương pháp thủy tinh hóa, các dụng cụ chứa noãn/phôi được chia làm hai nhóm: có tiếp xúc trực tiếp với ni-tơ lỏng (hệ thống hở) và không tiếp xúc trực tiếp với ni-tơ lỏng (hệ thống đóng). Hiệu quả đông lạnh của hai hệ thống là tương đương nhau. Tuy nhiên, do tính an toàn và hiệu quả, hệ thống đóng đang dần được sử dụng phổ biến trong các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm trên thế giới. Mục đích của bài báo này nhằm báo cáo trường hợp có thai đầu tiên tại Việt Nam từ phôi trữ lạnh bằng kỹ thuật thủy tinh hóa sử dụng hệ thống đóng Cryopette (Origio – Đan Mạch).

Từ khóa: đông lạnh chậm, thủy tinh hóa, hệ thống hở, hệ thống đóng, cryopette

Abstract

THE FIRST CASE OF PREGNANCY FROM CRYOPRESERVATION OF HUMAN EMBRYOS BY VITRIFICATION USING CRYOPETTE (CLOSED SYSTEM)

Oocytes/embryos cryopreservation for patients in an IVF cycle has become an essential part of IVF laboratories around the world. Nowadays, two basic techniques have been employed for the cryopreservation of oocytes/embryos: controlled slow-rate freezing and vitrification. However, the use of vitrification instead of controlled slow-rate freezing is currently the main trend due to more advantages. The carrier systems that have been developed for the vitrification procedure are divided into two groups: direct contact with liquid nitrogen (open system) and indirect contact with liquid nitrogen (closed system). The cryopreservation's effectiveness of the two system is equivalent. Nevertheless, because of the safety and effectiveness, closed system is gradually applied widely in many IVF centers in the world. The purpose of this paper is to report the first case of pregnancy in Vietnam from embryos cryopreserved by vitrification technique using closed system Cryopette (Origio – Denmark).

Keywords: slow-rate freezing, vitrification, open system, closed system, Cryopette

Đặt vấn đề

Đông lạnh noãn, hợp tử và phôi người đã trở

thành một phần không thể thiếu ở các trung tâm IVF trên thế giới.⁽¹⁾ Kỹ thuật đông lạnh giúp chuyển một số lượng hạn chế các phôi trở lại buồng tử cung, và lưu trữ số phôi còn lại để sử dụng trong tương lai, do đó tối đa hóa hiệu quả tích lũy của một chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm (TTON).⁽²⁾ Ngoài ra, đông lạnh giúp linh động trong việc tạm hoãn chuyển phôi trong chu kỳ hiện thời, từ đó giúp ngăn ngừa nguy cơ quá kích buồng trứng ở những bệnh nhân có nguy cơ cao.⁽³⁾ Trên thế giới có hai phương pháp đông lạnh đang được sử dụng là đông lạnh chậm và đông lạnh cực nhanh (phương pháp thủy tinh hóa). Xu hướng hiện nay trên thế giới là sử dụng phương pháp thủy tinh hóa thay cho phương pháp hạ nhiệt độ chậm nhằm tối ưu hóa hiệu quả đông lạnh cho bệnh nhân.^(2, 5)

Thủy tinh hóa là kỹ thuật đông lạnh cực nhanh, được dựa trên sự tiếp xúc trực tiếp giữa môi trường thủy tinh hóa có chứa noãn/phôi với ni-tơ lỏng.⁽¹⁾ Trong quá trình thủy tinh hóa, tế bào và môi trường bao quanh đông đặc trực tiếp thành trạng thái như thủy tinh mà không hình thành các tinh thể nước đá. Phương pháp thủy tinh hóa sử dụng nồng độ các chất bảo quản cao và tốc độ hạ nhiệt nhanh (15.000 - 30.000°C/phút), giúp loại bỏ sự hình thành tinh thể nước đá cả ở bên ngoài và bên trong tế bào khi phôi được nhúng trực tiếp vào ni-tơ lỏng.⁽¹⁾ Phương pháp thủy tinh hóa có nhiều ưu điểm so với đông lạnh chậm do không đòi hỏi trang thiết bị đắt tiền, sử dụng ít ni-tơ lỏng, và không tốn nhiều thời gian.⁽²⁾ Một phần quan trọng trong phương pháp thủy tinh hóa là tốc độ làm lạnh. Tốc độ này thường khác nhau phụ thuộc vào kiểu dụng cụ chứa noãn/phôi.⁽⁵⁾ Hiện nay, các dụng cụ chứa noãn/phôi trong kỹ thuật thủy tinh hóa có thể chia làm hai nhóm: có tiếp xúc trực tiếp với ni-tơ lỏng (hệ thống hở) và không tiếp xúc trực tiếp với ni-tơ lỏng (hệ thống đóng).⁽⁵⁾ Hiệu quả đông lạnh của hai hệ thống là tương đương nhau.⁽⁴⁾ Tuy nhiên, hệ thống hở có hạn chế là có nguy cơ lây nhiễm giữa các mẫu trữ với nhau thông qua ni-tơ lỏng đã nhiễm khuẩn do đặc điểm của các dụng cụ chứa trong hệ thống này là

¹IVF Vạn Hạnh, ²IVFAS, ³A.R.T. Consulting, ⁴Khoa Y, ĐHQG Tp HCM

yêu cầu có sự tiếp xúc trực tiếp của noãn/phôi với ni-tơ lỏng. Sử dụng hệ thống đóng giúp cô lập hoàn toàn môi trường chứa trứng/phôi với ni-tơ lỏng trong suốt quá trình thủy tinh hóa và lưu giữ mẫu.⁽⁴⁾ Do vậy, sử dụng hệ thống đóng trong thủy tinh hóa đang là xu hướng hiện nay trên thế giới do tính an toàn và hiệu quả của nó so với hệ thống hở.^(4, 5) Tại Việt Nam, em bé đầu tiên từ phôi trữ lạnh bằng phương pháp hạ nhiệt độ chậm được chúng tôi báo cáo vào tháng 3/2002.⁽⁶⁾ Đến năm 2006, chúng tôi bắt đầu triển khai kỹ thuật thủy tinh hóa trong trữ lạnh – rã đông. Hiện tại ở Việt Nam, đông lạnh phôi bằng phương pháp thủy tinh hóa đã được áp dụng thường quy ở hầu hết các trung tâm IVF.

CryoTip (Irvine Scientific) và Cryopette (Origio) là các dụng cụ trữ lạnh thường được sử dụng trong hệ thống đóng hiện nay ở các trung tâm IVF trên thế giới. Hiện nay tại Việt Nam, bước đầu đã có một số trung tâm IVF áp dụng hệ thống đóng trong thủy tinh hóa noãn/phôi. Mục đích của bài báo này nhằm báo cáo trường hợp có thai đầu tiên tại Việt Nam từ phôi sau trữ lạnh – rã đông bằng kỹ thuật thủy tinh hóa sử dụng hệ thống đóng Cryopette (Origio – Đan Mạch).

Báo cáo trường hợp

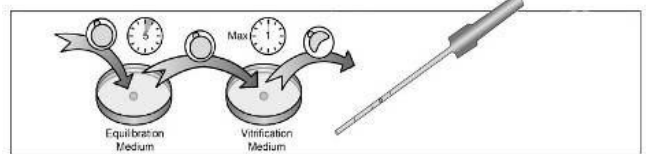
Bệnh nhân nữ tên V.L.P., 33 tuổi, lập gia đình năm 2009, PARA 0010, được chẩn đoán vô sinh nguyên phát do người chồng có tinh trùng dị dạng. Hai vợ chồng được giải thích làm thụ tinh trong ống nghiệm bằng phương pháp ICSI.

Tháng 10/2010, bệnh nhân được kích thích buồng trứng bằng phác đồ dài phối hợp giữa đồng vận GnRH α (Suprefact) 0,5mg/ngày và FSH tái tổ hợp (Puregon 300IU/ngày). Đến ngày thứ 8 bệnh nhân được giảm liều Puregon còn 200 IU/ngày. Vào ngày thứ 12 sau kích thích buồng trứng, bệnh nhân được cho tiêm bắp 1 ống hCG (Pregnyl 5000IU). Bệnh nhân được chọc hút trứng qua ngã âm đạo dưới hướng dẫn của siêu âm đầu dò âm đạo 35 giờ sau khi tiêm hCG. Kết quả thu được 25 noãn. Người chồng cũng được lấy tinh trùng vào cùng ngày.

Trong số 25 noãn chọc hút được, sau khi được nuôi cấy và xử lý bằng các biện pháp hóa học (men hyaluronidase) và cơ học (pipet với đường kính nhỏ 100-150 μ m) để tách khối tế bào quanh noãn, có 24 noãn trưởng thành và 1 noãn non (GV). Chúng tôi thực hiện ICSI trên 24 noãn đã trưởng thành. Có 18 noãn thụ tinh và phát triển thành phôi, trong đó có 12 phôi tốt, 5 phôi trung bình và 1 phôi xấu. Do có

nguy cơ quá kích buồng trứng, bệnh nhân không được chuyển phôi tươi trong chu kỳ này, toàn bộ số phôi được tiến hành đông lạnh vào ngày chuyển phôi (phôi ngày 2). Bệnh nhân được hẹn quay lại vào ngày đầu tiên của chu kỳ kinh tiếp theo để chuẩn bị chuyển phôi trữ.

Toàn bộ 18 phôi được đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa sử dụng hệ thống đóng Cryopette (Origio – Đan Mạch). Mỗi Cryopette chứa được tối đa là 2 phôi. Bộ trữ phôi (Medicult Vitrification Cooling, Đan Mạch) bao gồm 2x2 tube, mỗi tube chứa 1,0 ml hai loại môi trường khác nhau. Môi trường thứ nhất là môi trường cân bằng (equilibration medium – EM), môi trường thứ hai là môi trường thủy tinh hóa (vitrification medium – VM). Phôi sau khi cho vào môi trường EM 5 phút sẽ được chuyển sang môi trường VM. Lúc này, sử dụng Cryopette (đã ghi đầy đủ thông tin bệnh nhân) để hút phôi vào bằng cách bóp mạnh bầu trên của cryopette và thả lỏng từ từ để hút môi trường vào đến vạch đen thứ nhất, sau đó hút tiếp phôi và môi trường vào cryopette cho đến khi bầu trên được thả ra như ban đầu. Kiểm tra dưới kính hiển vi soi nổi xem phôi đã được hút vào trên vạch đen thứ nhất của Cryopette chưa. Nếu đã được hút vô rồi, phải đảm bảo phôi nằm phía trên vạch đen thứ nhất. Tiếp theo, tiến hành hàn cryopette bằng cách đưa điểm hàn (vạch đen thứ nhất ở đầu cryopette) vào ngay chính giữa tại điểm hàn thẳng góc 90° so với máy hàn, nhấn nhẹ và giữ máy hàn cho đến khi nghe 1 tiếng bíp nhỏ khoảng 3 giây thì lấy cryopette ra. Kiểm tra dưới kính hiển vi xem mỗi hàn có kín hay không. Sau đó nhúng ngay Cryopette vô visotube được gắn vào một cane nhôm ngập trong bể chứa ni-tơ lỏng và đem đi trữ lạnh. Toàn bộ quy trình từ lúc chuyển phôi sang môi trường VM cho đến khi nhúng Cryopette có chứa phôi bên trong vào ni-tơ lỏng tối đa 1 phút (tốt nhất là 50 giây).



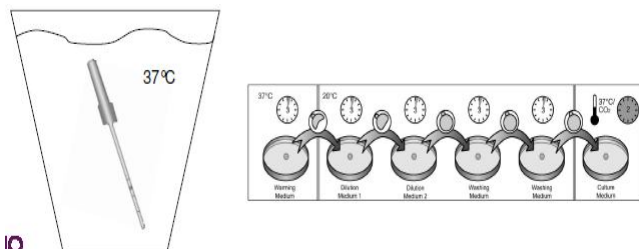
Sơ đồ quy trình đông lạnh phôi bằng Cryopette

Rã đông phôi được tiến hành vào ngày chuyển phôi trữ. Bộ rã phôi (Medicult Vitrification Warming, Đan Mạch) bao gồm 5 tube, mỗi tube chứa 2,0ml năm loại môi trường khác nhau. Môi trường đầu là môi trường rã (thawing medium – TM) (cho 0,5ml vào hộp Nunc 1); thứ hai là môi trường hòa tan 1 (diluent medium 1 – DM-1), thứ ba

là môi trường hòa tan 2 (diluent medium 2– DM-2), và cuối cùng là hai tube môi trường rửa (washing medium – WM) (cho 0,5ml/giếng mỗi loại môi trường DM-1, DM-2 và WM vào 4 giếng của hộp Nunc 2).

Quá trình rã đông được tiến hành ở nhiệt độ phòng (28°C). Cane nhôm có gắn visotube đang chứa cryopette của bệnh nhân được lấy ra từ thùng trữ phôi và cho vào giá bên trong Cryobath. Chuẩn bị sẵn cốc nước đã được làm ấm ở 37°C và nhúng Cryopette vào trong 5 giây. Cẩn thận lau khô đầu Cryopette bằng khăn lau tiệt trùng. Đặt đầu cryopette lên bề mặt nhỏ và cắt ở phần trên điểm hàn (tại vạch đen thứ nhất). Bóp bầu trên Cryopette từ từ để đẩy hết bọt khí ra trước, tiếp đến là môi trường có chứa phôi vào trong môi trường WM của hộp Nunc 1 (tối đa 3 phút). Sau đó chuyển phôi lần lượt vào các giếng từ 1 đến 4 của hộp Nunc 2 (3 phút/giếng). Sau khi rửa trong giếng 4 của hộp Nunc 2, phôi sẽ được chuyển vào môi trường nuôi cấy, để ở 37°C, 6% CO₂ ít nhất 2 giờ trước khi thực hiện hỗ trợ thoát màng và chuyển phôi. Có tổng cộng 4 phôi được rã đông với 100% phôi bào còn nguyên vẹn, trong đó có 2 phôi ở giai đoạn 4 tế bào và 2 phôi ở giai đoạn 6 tế bào, với tỉ lệ phân mảnh từ 5 – 10%. Sau khoảng 1 giờ nuôi trong tủ cấy (37°C, 6% CO₂) ở nồng độ oxy sinh lý, 4 phôi này được thực hiện kỹ thuật hỗ trợ phôi thoát màng (phương pháp làm mỏng màng ZP sử dụng tia laser). Sau đó, phôi tiếp tục được nuôi trong tủ cấy (37°C, 6% CO₂) ở nồng độ oxy sinh lý khoảng 1 giờ trước khi chuyển phôi. Chuyển phôi vào buồng tử cung được tiến hành qua ngã âm đạo với catheter Tulip (Gynetics – Bỉ).

Kết quả thử thai 2 tuần sau chuyển phôi cho kết quả dương tính với nồng độ β -hCG huyết thanh là 745 mIU/ml. Siêu âm 3 tuần sau đó cho thấy hình ảnh 1 túi thai với đầy đủ phôi tim thai trong lòng tử cung. Hiện tại (10/2011), bệnh nhân đã sinh được một bé trai, cân nặng 3,5kg, đã được 8 tuần tuổi và đang phát triển bình thường.

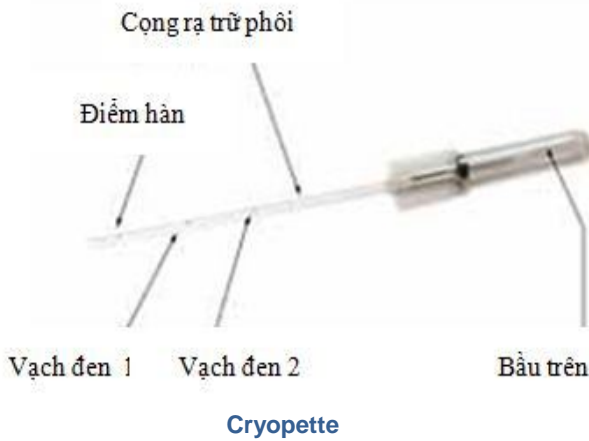


Sơ đồ quy trình rã đông phôi bằng Cryopette

Bàn luận

Trữ lạnh phôi là một kỹ thuật không thể thiếu của một trung tâm TTTON. Trữ lạnh phôi giúp tăng hiệu quả của một chu kỳ kích thích buồng trứng, tăng tính an toàn của kỹ thuật điều trị. Sự ra đời của thủy tinh hóa trong trữ lạnh được xem là một bước đột phá trong kỹ thuật y sinh học, khi giúp cải thiện khả năng sống của phôi sau rã đông, từ đó, cải thiện đáng kể tỉ lệ có thai. Tuy nhiên, để đạt hiệu quả cao, tốc độ hạ nhiệt đóng vai trò rất quan trọng trong phương pháp thủy tinh hóa, đòi hỏi phải đạt tốc độ hạ nhiệt nhanh (15.000 - 30.000°C/phút) nhằm loại bỏ sự hình thành tinh thể nước đá cả ở bên ngoài và bên trong tế bào khi phôi được nhúng trực tiếp vào ni-tơ lỏng.⁽¹⁾ Để đạt được tốc độ này, đa số các dụng cụ chứa phôi đều ở dạng “hở”, nghĩa là phôi phải tiếp xúc trực tiếp với ni-tơ lỏng. Đây là một trong những lo ngại có thể dẫn đến nguy cơ lây nhiễm chéo giữa các mẫu. Dụng cụ trữ phôi Cryopette được thiết kế tối ưu cho tốc độ hạ nhiệt nhanh với tốc độ làm lạnh là -23.700°C/phút và tốc độ làm ấm là 34.480°C/phút.⁽⁵⁾ Bên cạnh việc được thiết kế tối ưu cho phương pháp đông lạnh thủy tinh hóa, Cryopette có ưu thế hơn so với các dụng cụ của hệ thống hở khi cho phép cô lập hoàn toàn môi trường chứa trứng/phôi với ni-tơ lỏng trong suốt quá trình thủy tinh hóa và lưu giữ mẫu, giúp giảm thiểu nguy cơ lây nhiễm giữa các mẫu trữ thông qua môi trường ni-tơ lỏng.⁽⁴⁾ Với những ưu điểm trên cùng với việc sử dụng đơn giản của Cryopette (chỉ cần bóp bầu trên của Cryopette để hút phôi vào hoặc đẩy phôi ra) đã giúp Cryopette có thể là một thay thế hiệu quả cho các phương pháp “hở” trước đây, nhằm làm tăng tính an toàn của kỹ thuật thủy tinh hóa.

Với gần 1000 em bé ra đời từ TTTON tại trung tâm chúng tôi hơn 3 năm qua, chúng tôi đã xây dựng được một quy trình nuôi cấy phôi cũng như là trữ - rã phôi khá ổn định. Điều này đã tạo điều kiện thuận lợi cho chúng tôi mạnh dạn tiếp nhận các kỹ thuật mới trong hỗ trợ sinh sản trên thế giới, cụ thể trong trường hợp này là hệ thống đông Cryopette (Origio) sử dụng trong đông lạnh phôi bằng phương pháp thủy tinh hóa, một hệ thống an toàn và ổn định hơn so với hệ thống hở trước đây, và bước đầu đã được kết quả khả quan như đã trình bày bên trên. Thành công này cũng giúp chúng ta có thêm một sự lựa chọn mới là sử dụng hệ thống đóng bên cạnh hệ thống hở đã được sử dụng thường quy trước đây trong việc đông lạnh noãn/phôi, góp phần làm tăng cơ hội có con cho các cặp vợ chồng hiếm muộn.



Khả năng sống của phôi sau rã đông cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến sự thành công của một chu kỳ chuyển phôi trữ lạnh. Trong quá trình đông lạnh, việc làm lạnh từ nhiệt độ trong cơ thể xuống nhiệt độ -196°C của ni-tơ lỏng sẽ gây ra những ảnh hưởng sâu sắc đến cấu trúc và chức năng của phôi được trữ lạnh, từ đó ảnh hưởng đến khả năng sống của phôi sau chu trình trữ lạnh-rã đông.⁽⁶⁾ Tỷ lệ sống của phôi được tính dựa trên tỉ số giữa số phôi bào còn sống sau rã đông và tổng số phôi bào trước đông lạnh. Con số này thông thường phải đạt từ 65% trở lên. Trong trường hợp được trình bày ở đây, tỉ lệ sống của phôi là 100%.

Bên cạnh đó, kinh nghiệm cũng như là kỹ năng thành thạo của các nhân viên trong labo cũng là một trong những yếu tố quan trọng quyết định kết quả thành công này. Một yếu tố khác cũng không kém phần quan trọng góp phần cho sự thành công này là sự phối hợp đồng bộ giữa đội ngũ các y bác sĩ labo và lâm sàng từ khâu chuẩn bị nội mạc tử cung, trữ- rã phôi, chuyển phôi và hỗ trợ giai đoạn hoàng thể sau đó.

Kết luận

Trường hợp có thai đầu tiên này tại Việt Nam từ phôi trữ lạnh- rã đông bằng kỹ thuật thủy tinh hóa sử dụng hệ thống đóng Cryopette giúp mở ra nhiều triển vọng mới cho ngành điều trị hiếm muộn vốn còn non trẻ của Việt Nam. Qua đó cũng cho thấy ngành IVF của Việt Nam đã nhanh chóng nắm bắt các kỹ thuật điều trị mới hiện đang được áp dụng rộng rãi trên thế giới mà trong trường hợp này là hệ thống đóng Cryopette trong trữ-rã phôi bằng phương pháp thủy tinh hóa.

Ngoài ra, việc áp dụng thành công kỹ thuật mới này góp phần làm tăng cơ hội có thai của các cặp vợ chồng điều trị hiếm muộn bằng các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản tại Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

1. Juergen Liebermann, Frank Nawroth, Vladimir Isachenko, Evgenia Isachenko, Gohar Rahimi, và Michael J. Tucker (2002). Potential Importance of Vitrification in Reproductive Medicine. *Biology of reproduction* 67: 1671-1680.
2. Kalliopi E. Loutradi, Efstratios M. Kolibianakis, Christos A. Venetis, Evangelos G. Papanikolaou, George Pados, Ioannis Bontis, và Basil C. Tarlatzis (2008). Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*_ Vol. 90, No.1, July.
3. Michelmann HW, Nayudu P (2006). Cryopreservation of human embryos. *Cell Tissue Bank*; 7: 135-41.
4. Masashige Kuwayama, Gábor Vajta, Shoko Ieda, Osamu Kato (2005). Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *RBMOnline* - Vol 11. No 5. 2005 608-614 *Reproductive BioMedicine Online*; www.rbmonline.com/Article/1925 on web 26 September.
5. M. Portmann, Z.P. Nagy, B. Behr (2010). Evaluation of blastocyst survival following vitrification / warming using two different closed carrier system. Poster session: Fertility Preservation, Monday June 28, 2010, 13:00-14:00.
6. Đặng Quang Vinh, Vương Thị Ngọc Lan, Đỗ Quang Minh, Phùng Huy Tuấn, Hồ Mạnh Tường (2002). Trường hợp thai lâm sàng đầu tiên từ phôi người đông lạnh. *Tạp chí Thông tin Y dược*, số 12/2002, tr. 13 - 21.
7. Mandelbaum and Menezo (2001). Cryopreservation of human embryos. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM and Shoham Z (eds) *Textbook of assisted reproductive techniques-Laboratory and Clinical perspectives*. Martin Dunitz, London: 243-56.