

Nghiên cứu hiệu quả chuyển phôi nang từ phôi rã đông giai đoạn phân cắt

Nguyễn Thị Thái Thanh¹, Nguyễn Văn Trung¹, Đặng Thị Hồng Nhan¹, Lê Minh Tâm^{1,2}

¹ Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế

² Bộ môn Phụ sản, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

doi:10.46755/vjog.2021.1.1182

Tác giả liên hệ (Corresponding author): Nguyễn Thị Thái Thanh; email: nttthanh.huecrei@huemed-univ.edu.vn

Nhận bài (received): 08/06/2021 - Chấp nhận đăng (accepted): 15/07/2021

Tóm tắt

Mục tiêu: Chuyển phôi nang hiện là chiến lược được lựa chọn trong điều trị hỗ trợ sinh sản nhằm cải thiện kết quả có thai so với chuyển phôi phân cắt và giảm tỷ lệ đa thai. Nghiên cứu này nhằm đánh giá chất lượng phôi và kết quả có thai của các chu kỳ chuyển phôi nang từ phôi rã đông ở giai đoạn phân cắt.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang, thực hiện tại Trung tâm Nội tiết sinh sản và vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế, trong thời gian từ tháng 1/2018 đến tháng 6/2020. Các phôi đông lạnh ở giai đoạn phôi phân cắt (phôi ngày 2) được rã đông và nuôi cấy đến ngày 5 trước khi chuyển phôi. Các thông số về chất lượng phôi trước đông lạnh, sau khi rã đông, trước khi chuyển phôi, kết quả có thai bao gồm kết quả β -hCG dương tính, thai lâm sàng, tỷ lệ làm tổ được ghi nhận.

Kết quả: Nghiên cứu thu nhận 52 chu kỳ chuyển phôi nang nuôi cấy từ phôi phân cắt được rã đông gồm 216 phôi đã trữ và rã đông. Có 57,94% phôi phân cắt sau rã đông phát triển thành phôi nang. Mặc dù số phôi chuyển và số phôi chuyển loại A trung bình thấp ($1,98 \pm 0,64$ và $0,85 \pm 0,78$) nhưng tỷ lệ có thai lâm sàng và tỷ lệ làm tổ tốt (46,15% và 27,18%).

Kết luận: Nuôi cấy kéo dài phôi phân cắt sau rã đông đến phôi nang có hiệu quả tốt với các bệnh nhân đã thất bại chuyển phôi phân cắt trước đây.

Từ khóa: Chuyển phôi nang, phôi phân cắt, vô sinh, thụ tinh trong ống nghiệm.

The effectiveness of prolonged vitrified-warmed cleavage embryos to blastocyst transfer cycles

Nguyen Thi Thai Thanh¹, Nguyen Van Trung¹, Dang Thi Hong Nhan¹, Le Minh Tam^{1,2}

¹ Center for Reproductive Endocrinology and Infertility, Hue University of Medicine and Pharmacy, Vietnam

² Obstetrics and Gynecology Department, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Abstract

Objectives: Blastocyst transfer seems to be a preferred strategy in assisted reproductive technology to improve pregnancy outcomes rather than cleavage embryo transfer. This study aimed to evaluate the effectiveness of blastocyst transfer by extending the culture of vitrified-warmed cleavage embryos.

Materials and methods: This cross-sectional study was performed at the Center for Reproductive Endocrinology and Infertility, Hue University of Medicine and Pharmacy hospital, from January 2018 to June 2020. Vitrified-warmed day 2 embryos were transferred after extended culture to the blastocyst stage. The quality of vitrified-warmed embryos and pregnancy outcomes were analyzed.

Results: This study recruited 52 frozen embryo transfer cycles with prolonged culture to the blastocyst stage of 216 thawed cleavage-stage embryos. Although the number of transferred embryos and grade A embryos were low (1.98 ± 0.64 and 0.85 ± 0.78 , respectively), pregnancy outcomes with respect to clinical pregnancy rate and implantation rate gained well (46.15 and 27.18%, respectively).

Conclusions: This study showed better pregnancy outcomes in cryopreserved embryos transfer cycles which had prolonged culture to blastocyst in patients with vitrified cleavage embryo failure.

Keywords: Blastocyst; vitrified embryo transfer; cleavage stage embryo; infertility; in vitro fertilization.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chuyển phôi trữ lạnh (CPT) ngày càng đóng vai trò quan trọng trong kỹ thuật hỗ trợ sinh sản. Sự phát triển về lý thuyết và thực hành của kỹ thuật kích thích buồng trứng trong những năm gần đây đã giúp tăng số lượng noãn thu nhận được, từ đó tạo ra nhiều phôi hơn trong một chu kỳ điều trị. Bảo quản lạnh là phương pháp tốt nhằm lưu trữ các phôi dư để tiến hành các chu kỳ chuyển phôi đông lạnh tiếp theo, làm tăng tỷ lệ có thai cộng dồn [1]. Việc chuyển phôi đông lạnh dường như phù hợp cho các bệnh nhân có bệnh lý nội mạc tử cung, hội chứng quá kích buồng trứng, khả năng tiếp nhận nội mạc tử cung không đầy đủ hoặc phản ứng quá mức của buồng trứng [2, 3]. Bên cạnh đó, kỹ thuật chuyển phôi đông lạnh cũng là kỹ thuật quan trọng và cơ bản để kỹ thuật chẩn đoán di truyền phôi tiền làm tổ hình thành và phát triển [1], [3].

Nhiều nghiên cứu trước đây đã so sánh hiệu quả giữa chuyển phôi giai đoạn phân cắt và phôi nang và kết luận rằng chuyển phôi nang có kết quả có thai tốt hơn [1], [3–5]. Về lý thuyết, hình thái của phôi ảnh hưởng không chỉ đến tỷ lệ sống sót sau khi rã đông và còn là tỷ lệ làm tổ sau chuyển phôi [3]. Các tiêu chuẩn đánh giá hình thái để chọn lọc phôi ở giai đoạn phôi phân cắt ít liên quan với chất lượng di truyền của phôi bởi vì bộ gen của phôi chỉ được hoạt hóa khi phôi đến giai đoạn phôi nang [6]. Do đó, việc lựa chọn phôi ở giai đoạn phân cắt dường như không chính xác bằng giai đoạn phôi nang.

Người ta nhận thấy thủy tinh hóa ngày càng được chấp nhận rộng rãi như là một phương pháp bảo quản lạnh hiệu quả cho trứng và phôi người trong thụ tinh trong ống nghiệm (*in vitro* fertilization - IVF) [3], [7]. Thủy tinh hóa phôi nang là một lựa chọn tốt hơn trong chương trình bảo quản phôi [8], [9]. Tuy nhiên, một vài nghiên cứu khác lại báo cáo rằng chuyển phôi nang đông lạnh duy trì tỷ lệ có thai tương đương với phôi ở giai đoạn phân cắt [10], [11]. Chỉ có một số ít nghiên cứu về nuôi cấy kéo dài phôi giai đoạn phân cắt đến giai đoạn phôi nang sau rã đông và các nghiên cứu này đều cho kết quả tốt hơn từ chuyển phôi nang sau nuôi cấy kéo dài [11], [12]. Điều này cho thấy nuôi cấy kéo dài có thể chọn lọc được các phôi có tiềm năng hơn với ít bất thường nhiễm sắc thể phôi hơn ở giai đoạn phân cắt [3], [13].

Đối với những bệnh nhân bị thất bại ở các chu kỳ chuyển phôi giai đoạn phân cắt trước đây, có thể thực hiện các chu kỳ CPT với phôi giai đoạn phân cắt nuôi cấy lên giai đoạn phôi nang. Mặc dù số lượng phôi nang đạt được có thể thấp hơn số lượng nuôi cấy ban đầu nhưng các phôi nang sau nuôi cấy có thể thỏa mãn các yêu cầu của việc chẩn đoán chính xác hơn cho giai đoạn phát triển sau của phôi. Xuất phát từ mục tiêu trên, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm đánh giá chất lượng phôi và kết quả có thai của các chu kỳ chuyển phôi nang từ phôi rã đông ở giai đoạn phân cắt.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu mô tả cắt ngang các trường hợp vô sinh điều trị thụ tinh trong ống nghiệm tại Trung tâm Nội tiết

Sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y – Dược Huế. Tiêu chuẩn lựa chọn gồm các cặp vợ chồng vô sinh có chu kỳ thực hiện tiêm tinh trùng vào bào tương trứng (intracytoplasmic sperm injection - ICSI) và chu kỳ CPT từ 2018 đến 2020, có phôi trữ lạnh là phôi ở giai đoạn phân cắt và đã thất bại ở chu kỳ chuyển phôi phân cắt trước đó. Tiêu chuẩn loại trừ bao gồm người vợ lớn tuổi (trên 45 tuổi), người vợ có đáp ứng buồng trứng kém (số trứng thu nhận ít hơn 4), xin trứng, xin tinh trùng và độ dày nội mạc tử cung dưới 7mm tại thời điểm chuyển phôi đông lạnh.

Kích thích buồng trứng và thu nhận trứng

Người vợ được kích thích buồng trứng bằng phác đồ GnRH đối vận và FSH tái tổ hợp (rFSH - follitropin alfa). Sau 35-36 giờ gây trưởng thành nang noãn bằng tiêm 10,000 IU hCG (human chorionic gonadotropin) (Pregnyl®, Merck Sharp & Dohme Limited, Hertfordshire, UK), noãn được thu nhận dưới sự hướng dẫn của siêu âm đường âm đạo.

Tiêm tinh trùng vào bào tương trứng và nuôi cấy phôi

Quy trình tiêm tinh trùng vào bào tương trứng ICSI được thực hiện thường quy cho tất cả các bệnh nhân. Phức hợp tế bào hạt - noãn được thu nhận và rửa bằng G-MOSP PLUS (Vitrolife®, Västra Frölunda, Thụy Điển), sau đó được nuôi cấy bằng môi trường G-IVF PLUS (Vitrolife®, Västra Frölunda, Thụy Điển) ở 37°C trong tủ nuôi cấy có 6,0% CO₂ trong 2 h. Trứng sau khi tách bằng 80 IU Hyase (Vitrolife®, Västra Frölunda, Thụy Điển) được ủ trong môi trường G-IVF PLUS trong 1 giờ trước khi ICSI ở điều kiện 6,0% CO₂ và 5,0% O₂.

Tinh trùng được xử lý trước khi ICSI bằng phương pháp ly tâm thang nồng độ, sử dụng Sil-select Plus™ (với lớp 45% và 90%, Fertipro®, Beernem, Bỉ). Tinh trùng sau khi lọc được rửa lại 2 lần bằng SpermRinse (Vitrolife®, Västra Frölunda, Thụy Điển).

Các trứng trưởng thành đã ICSI được nuôi cấy giọt đơn trong môi trường G-TL™ (Vitrolife®, Västra Frölunda, Thụy Điển) có phủ dầu Ovoil (Vitrolife®, Västra Frölunda, Thụy Điển) ở 37°C trong tủ nuôi cấy có 6,0% CO₂ và 5,0% O₂. Các phôi được nuôi trong tủ nuôi cấy Benchtop (IVFtech, Birkerød®, Đan Mạch). Tiêu chuẩn đánh giá phôi dựa theo Đồng thuận Istanbul [14]. Các phôi tốt và trung bình được lựa chọn để đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa.

Thủy tinh hóa và làm ấm phôi

Phôi giai đoạn phân cắt (phôi ngày 2) được thủy tinh hóa bằng môi trường thủy tinh hóa thương mại (VT601, Kitazato®, Tokyo, Nhật Bản) trên dụng cụ trữ phôi cryotop của Kitazato (Kitazato®, Tokyo, Nhật Bản) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các phôi đã đông lạnh được làm ấm bằng bộ kit làm ấm Kitazato (VT602, Kitazato®, Tokyo, Nhật Bản) theo protocol chuẩn của nhà sản xuất. Các phôi sau khi rã đông được nuôi cấy trong môi trường G-TL với điều kiện 6,0% CO₂ và 5,0% O₂ ở 37°C.

Quy trình thường quy là làm ấm một cryotop trong mỗi chu kỳ chuyển phôi đông lạnh. Tuy nhiên, về mặt lý thuyết, chỉ hơn một nửa phôi phân cắt có thể phát triển thành phôi nang [14], do đó chúng tôi sẽ tiến hành tu

vấn bệnh nhân đã thất bại làm tổ nhiều lần và còn hơn 2 cryotop chứa phôi phân cắt để rã đông 2 cryotop, nhằm đảm bảo hầu hết bệnh nhân có thể chuyển được phôi nang chất lượng tốt. Các chu kỳ CPT được thực hiện khi độ dày nội mạc tử cung đạt tối thiểu 7 mm.

Nuôi cấy phôi sau làm ấm và chuyển phôi

Các phôi phân cắt đông lạnh được nuôi cấy thêm 3 ngày sau khi rã đông để phát triển thành phôi nang trước chuyển phôi. Các phôi sống sót là các phôi bao gồm hơn 50% phôi bào sống và không bị tổn thương màng zona sau khi làm ấm. Phôi không có tổn thương phôi bào nào thì được gọi phôi toàn vẹn [15], và chỉ những phôi sau rã đông phát triển được thành phôi nang mới được chuyển, những phôi khác thì bị loại bỏ. Nếu có hơn 2 phôi nang sau nuôi cấy thì số lượng phôi chuyển tối đa là 2 và những phôi còn lại sẽ được đông lạnh lại. Tỷ lệ phôi hữu dụng được tính bằng tỷ lệ phôi được chuyển và trữ lại (nếu có) trên tổng số phôi toàn vẹn sau rã đông. Tỷ lệ này có ý nghĩa trong việc xác định tỷ lệ tạo phôi nang sau nuôi cấy từ phôi phân cắt rã đông.

Các phôi chuyển được ngâm trong Embryogluce (Vitrolife, Thụy Điển) từ 15 đến 30 phút trước khi chuyển

vào tử cung dưới hướng dẫn của siêu âm nhờ catheter chuyển phôi Kitazato (Kitazato, Tokyo, Nhật Bản).

Kết quả lâm sàng

Kết quả có thai bao gồm xét nghiệm beta-hCG, tỷ lệ có thai lâm sàng và tỷ lệ làm tổ. 11 ngày sau chuyển phôi, beta-hCG được đo và được tính là dương tính khi đạt ≥ 50 mIU/mL. Có thai lâm sàng được đánh giá bằng sự có mặt của túi thai và tìm thai sau 4 tuần chuyển phôi. Tỷ lệ làm tổ được tính bằng số túi thai trên số phôi chuyển sau 6 tuần.

Phân tích thống kê

Nghiên cứu sử dụng phần mềm Statistical Package for Social Sciences version 20.0 (SPSS, Chicago, USA) và MedCal version 12 (MedCal Software, Ostend, Bỉ) để phân tích dữ liệu. Các kết quả được xác định là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ

Nghiên cứu đã thu nhận 52 chu kỳ chuyển phôi nang nuôi cấy từ phôi phân cắt rã đông gồm 216 phôi trữ ở giai đoạn phân cắt. Các đặc điểm chung của bệnh nhân được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm chung của bệnh nhân

Đặc điểm chung	Nhóm nghiên cứu (52 chu kỳ)
Tuổi vợ tại thời điểm ICSI	32,27 ± 4,67
Tuổi vợ tại thời điểm CPT	34,19 ± 4,6
Thời gian vô sinh (năm)	4,77 ± 2,78
<3	10 (19,23%)
≥3	42 (80,77%)
Loại vô sinh	
Nguyên phát	33 (63,46%)
Thứ phát	19 (36,54%)
Nguyên nhân vô sinh do	
Chồng	9 (17,31%)
HC buồng trứng đa nang	35 (67,31%)
Vòi tử cung	8 (15,38%)
Số chu kỳ đã chuyển phôi trước đó	
1 chu kỳ	14 (26,92%)
2 chu kỳ	26 (50%)
3 chu kỳ	10 (19,23%)
4 chu kỳ	2 (3,85%)
Độ dày nội mạc tử cung (mm)	9,28 ± 1,22

Các biến liên tục được biểu thị bằng trung bình (TB) ± SD (standard deviation).

Kết quả cho thấy thời điểm chuyển phôi nghiên cứu khoảng 2 năm sau thời điểm tiến hành ICSI là do nhiều bệnh nhân đã có thất bại ở các chu kỳ chuyển phôi trước. Vô sinh nguyên phát chiếm tỷ lệ lớn (63,46%) và chủ yếu vô sinh do nguyên nhân hội chứng buồng trứng đa nang (67,31%). Có 14 trường hợp đã thất bại 1 chu kỳ chuyển phôi phân cắt, 26 trường hợp đã thất bại 2 chu kỳ, 10 trường hợp thất bại 3 chu kỳ và có 2 trường hợp thất bại đến 4 chu kỳ trước đó.

Bảng 2. Chất lượng của phôi đông lạnh – rã đông

Đặc điểm phôi	Nhóm nghiên cứu 52 chu kỳ 216 phôi	
	n (%)	(TB ± SD)
Số phôi đông lạnh	216 (100)	4,15 ± 1,35*
Số cryotop rã đông	80 (100)	1,54±0,5*
Số phôi đông lạnh loại A	147 (68,06)	2,83±1,47*
Số phôi toàn vẹn sau rã đông	214 (99,07)	4,11±1,48*
Số phôi hữu dụng	124 (57,94)	2,38±1,01
Số phôi chuyển	103 (47,69)	1,98±0,64*
Số phôi chuyển loại A	44 (20,37)	0,85±0,78*

Bảng 2 chỉ ra số phôi đông lạnh trung bình trên mỗi chu kỳ của nhóm nghiên cứu lớn 4,15 ± 1,35. Điểm lưu ý ở đây là việc giảm số lượng phôi tốt (phôi A) chuyển sau nuôi cấy kéo dài từ phôi phân cắt rã đông lên phôi nang. Việc phát triển thành phôi nang thất bại trong quá trình nuôi cấy từ ngày 2 lên ngày 5 đã làm giảm số phôi chuyển, nhưng tỷ lệ phôi hữu dụng đạt khá cao với 103 phôi được chuyển và 21 phôi dư được trữ lại. Tỷ lệ phôi phân cắt phát triển thành phôi nang sau khi nuôi cấy kéo dài cao đạt 57,94% (124/214).

Bảng 3. Kết quả có thai của các chu kỳ chuyển phôi

Kết quả có thai	D2-5 CPT 52 chu kỳ
Tỷ lệ hCG dương tính (%)	59,62 (31/52)
Tỷ lệ thai lâm sàng (%)	46,15 (24/52)
Tỷ lệ làm tổ (%)	27,18 (28/103)

Mặc dù số phôi chuyển và phôi loại A chuyển trung bình thấp (lần lượt là 1,98±0,64 và 0,85±0,78) nhưng chuyển phôi nang sau nuôi cấy lại có kết quả có thai tốt ở cả tỷ lệ hCG dương tính, tỷ lệ thai lâm sàng và tỷ lệ làm tổ (lần lượt là 59,62%, 46,15% và 27,18%).

4. BÀN LUẬN

Xuất phát từ những bệnh nhân đã thất bại ở những chu kỳ chuyển phôi phân cắt trữ lạnh trước đó và có nguyện vọng có kết quả tốt hơn nhờ chuyển phôi nang thông qua tiếp tục nuôi cấy phôi phân cắt sau rã đông, nghiên cứu của chúng tôi thực hiện với mục tiêu đánh giá tính hiệu quả của quy trình nuôi cấy kéo dài này. Số liệu của chúng tôi cho thấy kết quả có thai cao ở nhóm chuyển phôi nang sau nuôi cấy.

Chuyển phôi nang trong những năm gần đây được biết như là một sự lựa chọn tốt nhất trong các chu kỳ IVF. Với những thành tựu đã đạt được trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản, như việc thương mại hóa môi trường nuôi cấy, tối ưu hóa điều kiện phòng sạch và các cải tiến tủ nuôi cấy, sự phát triển phôi nang đã đạt được kết quả tốt nhất và chuyển phôi nang cho tỷ lệ làm tổ ở các chu kỳ chuyển

phôi tươi lẫn phôi trữ cao hơn trước. Kết quả của nghiên cứu này cao hơn kết quả chuyển phôi sau 2 giờ nuôi cấy và nuôi cấy qua đêm phôi phân cắt rã đông của nhóm chúng tôi thực hiện năm 2019 cả về tỷ lệ thai lâm sàng và tỷ lệ làm tổ (46,15% so với 33,3% và 24,1%, 27,18% so với 16,5% và 11%) [15]. Tuy nhiên, một số nghiên cứu trước đây báo cáo kết quả ngược lại với chúng tôi. Singh và cộng sự (2013) chỉ ra kết quả có thai không có sự khác biệt giữa chuyển phôi ngày 3 và phôi nang, ngoài ra, chuyển phôi phân cắt (ngày 3) còn tốt hơn và có hiệu quả về chi phí hơn ngày 5 [16].

Theo một số y văn hiện nay, chất lượng phôi được cho là có liên quan đến tỷ lệ làm tổ và giai đoạn phân cắt có bất lợi trong việc chọn lọc phôi [6]. Khi sử dụng kết hợp kỹ thuật FISH và CGH để tìm ra các bất thường nhiễm sắc thể, Dekel-Naftali và cộng sự (2013) chứng minh được rằng các phôi ở giai đoạn phân cắt có mức độ bất thường cao [17]. Các bất thường nhiễm sắc thể vẫn xuất hiện ở phôi ngày 3 có hình thái tốt, trong khi các phôi chất lượng thấp lại phát triển thành phôi nang [18]. Việc chọn lọc phôi để chuyển ở giai đoạn phôi phân cắt dường như có vấn đề bởi vì hình thái phôi phân cắt có mối tương quan thấp với bộ gen của phôi [4]. Mặc khác, lựa chọn phôi nang có thể chọn ra các phôi tốt hơn để chuyển, cho tỷ lệ làm tổ cao hơn. Một số nghiên cứu trước đây đã xác nhận rằng thể lệch bội ở phôi chất lượng tốt ngày 3 chiếm 59%, trong khi tỷ lệ này ở phôi nang chỉ 35%. Thể lệch bội hiện diện ở phôi nang với mức độ thấp có thể cải thiện kết quả có thai của các chu kỳ chuyển phôi nang tốt hơn so với chuyển phôi phân cắt [19]. Với các phôi phân cắt rã đông, các phôi có nuôi cấy lên phôi nang hỗ trợ việc lựa chọn phôi tốt hơn và cũng cho kết quả có thai cao hơn.

Chuyển phôi nang làm tăng tính đồng bộ của nội mạc tử cung cũng như tăng khả năng chọn lọc phôi tốt nhất để chuyển. Điều này giải thích tại sao tỷ lệ trẻ sinh sống tăng. Ngoài ra, lựa chọn phôi nang chất lượng tốt cũng trở thành khuyến khích hiện nay để chuyển phôi nang đơn, nhằm giảm nguy cơ đa thai, từ đó giảm các vấn đề về sản khoa và sơ sinh [4], [7], [10]. Nuôi cấy phôi nang còn tạo cơ hội cho kỹ thuật sàng lọc/chẩn đoán di truyền phôi, hỗ trợ chuyển đơn phôi phát triển. Khi so sánh với

chuyển phôi tươi, chuyển phôi nang trữ lạnh cũng có thể tránh được tác hại của sự thay đổi nội tiết, dẫn đến hội chứng quá kích buồng trứng [20]. Thủy tinh hóa có thể coi là phương pháp tốt nhất hiện nay để đông lạnh phôi ở mọi giai đoạn với tỷ lệ phôi sống sót sau rã đông cao, giúp tăng tiềm năng của chuyển phôi đông lạnh đối với trường hợp quá kích buồng trứng và nội mạc tử cung mỏng [21]. Do đó, chuyển phôi nang sau nuôi cấy từ phôi phân cắt rã đông là khuynh hướng thích hợp trong các chu kỳ IVF có phôi đông lạnh là phôi phân cắt, đặc biệt trong các trường hợp thất bại trước đây.

Số phôi đông lạnh trung bình trên mỗi chu kỳ của nhóm nghiên cứu lớn $4,15 \pm 1,35$. Nguyên nhân là do cần phải rã đông nhiều phôi đông lạnh hơn, cụ thể là có 28 trường hợp rã 2 cryotop và 24 trường hợp rã 1 cryotop. Thủy tinh hóa là phương pháp đông lạnh phôi xuất sắc khi tỷ lệ phôi toàn vẹn đạt rất cao (99,07%). Điểm lưu ý ở đây là việc giảm số lượng phôi tốt (phôi A) chuyển sau nuôi cấy kéo dài từ phôi phân cắt rã đông lên phôi nang. Việc phát triển thành phôi nang thất bại trong quá trình nuôi cấy từ ngày 2 lên ngày 5 đã làm giảm số phôi chuyển, nhưng tỷ lệ phôi hữu dụng đạt khá cao với 103 phôi được chuyển và 21 phôi dư được trữ lại. Trong nghiên cứu của chúng tôi, sự thành công của nuôi cấy phôi kéo dài từ ngày 2 lên ngày 5 biểu đạt bằng 57,94% phôi hữu dụng. Thực tế, bất lợi chính của chuyển phôi là việc phải hủy chu kỳ với những trường hợp không có phôi nào phát triển được thành phôi nang. Kasraie đã tổng kết tỷ lệ hủy chu kỳ chuyển phôi nang cao hơn so với phôi phân cắt (8,9 so với 2,8%) [22]. Theo các báo cáo trước, không chỉ phôi ngày 3 tốt mà các phôi có chất lượng kém cũng có thể phát triển thành phôi nang và cho kết quả có thai thành công [6],[23],[24]. Sallem và cộng sự (2018) cũng cho rằng các phôi có chất lượng ở ngày 2 cũng có thể phát triển thành phôi nang và tạo ra em bé khỏe mạnh [7]. Các nghiên cứu này kiến nghị rằng các phôi nên nuôi cấy kéo dài đến ngày 5 thay vì lựa chọn theo tiêu chuẩn hình thái và phôi học sớm ở giai đoạn phân cắt [11].

Chúng tôi nhận thấy rằng chuyển phôi phân cắt rã đông lên phôi nang đòi hỏi nhiều phôi cần rã đông hơn. Điều này là do chỉ một nửa phôi giai đoạn phân cắt có thể khả năng phát triển thành phôi nang [4], [23]. Chúng tôi rã đông nhiều phôi hơn để đảm bảo hầu hết các bệnh nhân có phôi nang tốt để chuyển. Nếu số phôi nang tạo thành nhiều hơn thì các phôi dư có thể được đông lạnh lại để sử dụng cho các chu kỳ chuyển phôi tiếp theo. Những phôi dư này là phôi có chất lượng tốt và khá, tạo thêm cơ hội cho bệnh nhân bị thất bại làm tổ liên tiếp vì một vài báo cáo đã chỉ ra phôi đông lạnh-rã đông 2 lần không ảnh hưởng đến tỷ lệ có thai [25], [26]. Mặc khác, mặc dù có ít phôi chuyển loại A hơn nhưng tỷ lệ có thai của nhóm chuyển phôi nang tốt hơn nhóm chuyển phôi rã đông. Tuy nhiên, trong tất cả các trường hợp, bệnh nhân cần được tư vấn về nguy cơ hủy chu kỳ chuyển phôi nang vì không có phôi đủ điều kiện để chuyển phôi.

Hạn chế của nghiên cứu này là chúng tôi không có tiêu chuẩn nào để xác định số phôi cần rã đông. Tuy quy trình thủy tinh hóa là phương pháp tốt để đông lạnh

phôi với tỷ lệ phôi toàn vẹn rất cao (99,07%) nhưng nhiều nghiên cứu vẫn nên được tiến hành để tìm ra số phôi thích hợp để rã đông trước khi nuôi cấy kéo dài. Bên cạnh đó, với số lượng phôi nhiều hơn thì nhân sự, thiết bị, môi trường và chi phí sẽ cao hơn để nuôi cấy kéo dài. Một nghiên cứu về hiệu quả kinh tế cần được tiến hành nhằm xem xét lại chi phí của chiến lược chuyển phôi này. Dựa vào kết quả của nghiên cứu, chúng tôi nhận ra nuôi cấy kéo dài phôi phân cắt sau rã đông nên sử dụng cho một số trường hợp chuyên biệt. Những bệnh nhân có các chu kỳ chuyển phôi thất bại trước đó mà vẫn còn phôi phân cắt đông lạnh nên được tư vấn để chuyển phôi phân cắt có hoặc không nuôi cấy tiếp lên phôi nang để tăng cơ hội có thai.

5. KẾT LUẬN

Tóm lại, nghiên cứu này chỉ ra kết quả có thai cao ở các chu kỳ chuyển phôi đông lạnh với phôi phân cắt rã đông được nuôi lên phôi nang. Với chất lượng phôi tốt, hiệu quả có thai cao, giảm số phôi chuyển cũng như giảm bớt số chu kỳ chuyển phôi so với phôi giai đoạn phân cắt, đây có thể là một lựa chọn hợp lý trong thực hành lâm sàng cho các trường hợp đã thất bại với chuyển phôi giai đoạn phân cắt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zacà C, Bazzocchi A, Pennetta F, Bonu MA, Coticchio G, Borini A. Cumulative live birth rate in freeze-all cycles is comparable to that of a conventional embryo transfer policy at the cleavage stage but superior at the blastocyst stage. *Fertil Steril*. 2018;110(4):703–9.
2. Rahimi AA, Omid M, Akyash F, Faramarzi A, Farshchi FA. Does overnight culture of cleaved embryos improve pregnancy rate in vitrified-warmed embryo transfer programme? *Malaysian J Med Sci*. 2019;26(2):52–8.
3. Korkmaz C, Gül Yİldız Ü, Fidan U, Baykal B, Temel Ceyhan S, Açıayak E. Investigation of transfer results of human embryos that were vitrified and thawed at the cleavage, morula and blastocyst stages. *Zygote*. 2020;4–8.
4. Eftekhari M, Afatoonian A, Mohammadian F, Tabibnejad N. Transfer of blastocysts derived from frozen-thawed cleavage stage embryos improved ongoing pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;286(2):511–6.
5. Zhang X, Gao Y, Liu W, Liu J, Wu L, Xiong S, Zhu J, Han W, Wang J, Hao X, Han S, Huang G. Frozen blastocyst embryo transfer vs. frozen cleavage-stage embryo transfer in couples with recurrent implantation failure: a cohort study. *Hum Fertil*. 2019; 0(2019):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/14647273.2019.1633021>
6. Hershko Klement A, Ovadia M, Wisner A, Berkovitz A, Shavit T, Nemerovsky L, Ghetler Y, Cohen I, Shulman A. What we learned from extended culture of “rejected” day-3 cleavage stage embryos: A prospective cohort study. *J Ovarian Res*. 2017;10(1):1–5.
7. Sallem A, Santulli P, Barraud-Lange V, Le Foll N, Ferreux L, Maignien C, Bourdon M, Chapron C, Ziegler

- D, Wolf JP, Cheriet KP. Extended culture of poor-quality supernumerary embryos improves ART outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(2):311–9.
8. Cobo A, De Los Santos MJ, Castellò D, Gámiz P, Campos P, Remohí J. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: Evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil Steril.* 2012; 98:138-46.
9. Azimineko E, Mohseni Salehi MS, Kalantari V, Tehraninejad ES, Haghollahi F, Hossein Rashidi B, Zandiej Z. Pregnancy outcome after blastocyst stage transfer comparing to early cleavage stage embryo transfer. *Gynecol Endocrinol.* 2015; 31:880-4.
10. Ahuja MS, Sharma RK, Tandon A, Pandit S. Comparative study of implantation rate in cleavage embryo transfer vs blastocyst transfer among couples undergoing in vitro fertilization for treatment of infertility. *J Anat Soc India.* 2017;66:S32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jasi.2017.08.103>
11. Elassar A, Benadiva C, Kummer N, Diluigi A, Nulsen J, Engmann L. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in frozen-thawed assisted conception cycles. *Fertil Steril.* 2010;94(4):S174. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.690>
12. Chan C, Ling HY, Chen C-H, Tzeng C-R. Pregnancy outcomes of frozen thawed cleavage stage embryos with or without extended culture to blastocyst stage. *Fertil Steril.* 2019; 112(3):e159. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.07.532>
13. Shi W, Zhang W, Li N, Xue X, Liu C, Qu P, Shi J, Huang C. Comparison of perinatal outcomes following blastocyst and cleavage-stage embryo transfer: analysis of 10 years' data from a single centre. *Reprod Biomed Online.* 2019;38(6):967–78.
14. Balaban B, Brison D, Calderón G, Catt J, Conaghan J, Cowan L, Ebner T, Gardner D, Hardarson T, Lundin K. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: Proceedings of an expert meeting. *Reproductive Biomedicine Online.* 2011;22(6):632-46.
15. Le MT, Nguyen VT, Nguyen TT, Evans MB, Nguyen TTT, Nguyen TAT, Le Đ, NguyenVQH, Cao NT, Hill MJ. Prolonged post-thaw culture of embryos does not improve outcomes of frozen human embryo transfer cycles: A prospective randomized study. *Asian Pacific J Reprod.* 2019; 260-6.
16. Singh R, Singh M. A prospective randomised controlled study comparing the cost effectiveness of IVF-ICSI treatment: cleavage stage (day 3) embryo transfer versus extended culture (day 5/6 blastocyst) transfer. *Fertil Steril.* 2013;100(3):S289. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.1081>
17. Dekel-Naftali M, Aviram-Goldring A, Litmanovitch T, Shamash J, Yonath H, Hourvitz A, Yung Y, Bregauz M, Schiff E, Rienstein S. Chromosomal integrity of human preimplantation embryos at different days post fertilization. *J Assist Reprod Genet.* 2013; 30:633-48. doi: 10.1007/s10815-013-9988-y.
18. Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Wells D. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mol Hum Reprod.* 2014; 20(2):117-26. doi: 10.1093/molehr/gat073. Epub 2013 Nov 1. PMID: 24184690.
19. Papanikolaou EG, D'haeseleer E, Verheyen G, Van de Velde H, Camus M, Van Steirteghem A, Devroey P, Tournaye H. Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study. *Hum Reprod.* 2005 Nov;20(11):3198-203. doi: 10.1093/humrep/dei217.
20. Shi Y, Sun Y, Hao C, Zhang H, Wei D, Zhang Y, Zhu Y, Deng X, Qi X, Li H, Ma X, Ren H, Yang Y, Zhang D, Wang B, Liu Y, Zhou Y, Sun M, Liu H, Li J, Zhang L, Chen X, Zhang S, Sun X, Legro RS, Chen Z.. Transfer of fresh versus frozen embryos in ovulatory women. *N Engl J Med.* 2018;378(2):126–36.
21. Zhu Q, Zhu J, Wang Y, Wang B, Wang N, Yin M, Zhang S, Lyu Q, Kuang Y. Live birth rate and neonatal outcome following cleavage-stage embryo transfer versus blastocyst transfer using the freeze-all strategy. *Reprod Biomed Online [Internet].* 2019;38(6):892–900. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.12.034>
22. Kasraie J. Cleavage Stage or Blastocyst Transfer: Which Is Better? In: Kovacs G, Salamonsen L, editors. *How to Prepare the Endometrium to Maximize Implantation Rates and IVF Success.* Cambridge: Cambridge University Press; 2019; 91–103.
23. Zhao P, Li M, Lian Y, Zheng X, Liu P, Qiao J. The clinical outcomes of day 3 4-cell embryos after extended in vitro culture. *J Assist Reprod Genet.* 2014;32(1):55–60.
24. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril.* 2000;74(2):282-7.
25. Valle M, Guimarães F, Cavagnoli M, Sampaio M, Geber S. Birth of normal infants after transfer of embryos that were twice vitrified/warmed at cleavage stages: Report of two cases. *Cryobiology.* 2012; 65(3):332–334. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.05.012>
26. Budani MC, Tiboni GM. Successful pregnancy following the transfer of re-vitrified twice-warmed embryos due to the forced cancellation of the primary FET: A case report. *Cryobiology.* 2020; 97:242–244. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.08.009>