

# HIỆU QUẢ SỬ DỤNG OXY NỒNG ĐỘ THẤP TRONG NUÔI TRƯỞNG THÀNH NOÃN NON TRONG ống NGHIỆM CÓ BƯỚC TIỀN TRƯỞNG THÀNH (CAPA-IVM) Ở BỆNH NHÂN PCOS: NGHIÊN CỨU THỬ NGHIỆM CHIA NOÃN

Trần Quốc Việt<sup>1,3\*</sup>, Phạm Hoàng Huy<sup>1,3</sup>, Lê Hoàng Anh<sup>1,3</sup>, Phạm Dương Toàn<sup>3</sup>, Nguyễn Lê Duy<sup>3</sup>, Vũ Thị Lan Anh<sup>3</sup>, Lê Long Hồ<sup>1,3</sup>, Lê Khắc Tiến<sup>1,3</sup>, Hồ Mạnh Tường<sup>2,3</sup>, Vương Thị Ngọc Lan<sup>4</sup>

<sup>1</sup>IVFMD Phú Nhuận, Bệnh viện Mỹ Đức Phú Nhuận, Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>IVFMD, Bệnh viện Mỹ Đức, Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Trung tâm nghiên cứu HOPE, Bệnh viện Mỹ Đức, Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>4</sup>Khoa Phụ Sản, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Trưởng thành noãn non trong ống nghiệm (IVM) là phương pháp hỗ trợ sinh sản chủ yếu được áp dụng trên nhóm bệnh nhân mắc hội chứng buồng trứng đa nang (PCOS) nhằm giảm tác dụng phụ và rủi ro liên quan đến quá kích buồng trứng. Hệ thống IVM mới có bước tiền nuôi cấy trưởng thành (CAPA-IVM) đã được chứng minh là có hiệu quả cải thiện tiềm năng của noãn. Hiện tại, CAPA-IVM không kiểm soát nồng độ oxy, tương ứng với nồng độ oxy khí quyển (20%). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả nuôi cấy noãn non với nồng độ oxy thấp (5%) so với nồng độ oxy khí quyển (20%) trong cả hai bước của quy trình CAPA-IVM ở nhóm bệnh nhân PCOS. Các phức hợp noãn và tế bào hạt (COCs) từ 20 bệnh nhân được chia ngẫu nhiên thành hai nhóm: nồng độ oxy thấp (5%) và nồng độ oxy khí quyển (20%). Các COCs này được nuôi CAPA-IVM trong tủ cấy benchtop BT37 (Origio, Đan Mạch) và sử dụng hỗn hợp khí trộn thương mại tương ứng. Kết cục chính là số lượng noãn trưởng thành. Các kết cục phụ bao gồm số lượng noãn thụ tinh 2 tiền nhân (2PN), số lượng phôi nang và phôi nang loại tốt, số lượng phôi trữ và động học phát triển phôi. Kết quả cho thấy, số lượng noãn trưởng thành và số lượng noãn thụ tinh thấp hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm sử dụng nồng độ oxy thấp so với nhóm sử dụng nồng độ oxy khí quyển (đạt tỷ lệ 53,6% và 33% so với 65,8% và 47,8% với  $P < 0,05$ ). Nhóm nồng độ oxy thấp có số phôi nang, số phôi nang loại tốt và số phôi trữ thấp hơn so với nhóm nồng độ oxy khí quyển, nhưng không có ý nghĩa thống kê. Động học phát triển phôi là tương tự nhau giữa 2 nhóm. Đây là nghiên cứu đầu tiên khảo sát tác động của nồng độ oxy thấp đến sự trưởng thành trong ống nghiệm của noãn người trong hệ thống CAPA-IVM. Nồng độ oxy khí quyển nên là lựa chọn tối ưu để nuôi cấy CAPA-IVM trên nhóm bệnh nhân PCOS.

*Từ khoá:* CAPA-IVM, hội chứng buồng trứng đa nang (PCOS), IVM, nồng độ oxy, phức hợp noãn - tế bào hạt (COCs).

## MỞ ĐẦU

Thụ tinh trong ống nghiệm (*In vitro* fertilization-IVF) được phát triển bởi Edwards và Steptoe vào năm 1978 bằng cách thu nhận noãn trưởng thành từ nang vượt trội trong chu kỳ kinh nguyệt tự nhiên. Mục tiêu chính của IVF là có trẻ sinh sống khỏe mạnh nên tập trung vào việc tối ưu hóa hiệu quả và giảm thiểu thời gian điều trị. Do đó, hiện nay IVF sử dụng kích thích buồng trứng với nhiều liều gonadotropin để tăng số lượng noãn thu nhận nhằm làm tăng số lượng phôi khả dụng. Các phôi này có thể được sử dụng cho chu kỳ chuyển phôi tươi hoặc được đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hoá cho chu kỳ chuyển phôi trữ. Tuy nhiên, việc sử dụng nhiều liều gonadotropin gây tổn kém và dễ dẫn đến nguy cơ mắc hội chứng quá kích buồng trứng (Ovarian Hyperstimulation Syndrome-OHSS), đặc biệt ở bệnh nhân mắc hội chứng buồng trứng đa nang (Polycystic Ovary Syndrome-PCOS) (Brinsden *et al.*, 1995).

Một phương pháp tiếp cận khác, được gọi là nuôi trưởng thành noãn non trong ống nghiệm (*In vitro* maturation-IVM), đã được Robert Edwards trình bày vào năm 1965. Trong IVM, phức hợp nang noãn chưa trưởng thành (Cumulus-oocyte-complexes-COCs) từ các nang có hốc nhỏ được thu nhận mà không hoặc sử dụng tối thiểu liều gonadotropin. Những COCs này sau đó được nuôi cấy *in vitro* cho đến khi chúng đạt đến giai đoạn metaphase II (noãn MII) để tạo phôi (Edwards, 1965; Paulson *et al.*, 2016; Vuong *et al.*, 2019). IVM có một số ưu điểm so với IVF thông thường, bao gồm thời gian điều trị ngắn hơn, giảm chi phí thuốc, thuận tiện hơn cho bệnh nhân và quan trọng nhất là không gây ra OHSS đặc biệt đối với những bệnh nhân PCOS có nguy cơ cao mắc OHSS sau kích thích buồng trứng trong IVF (Das *et al.*, 2014; Vuong *et al.*, 2019; Vuong *et al.*, 2020; Teede *et al.*, 2023).

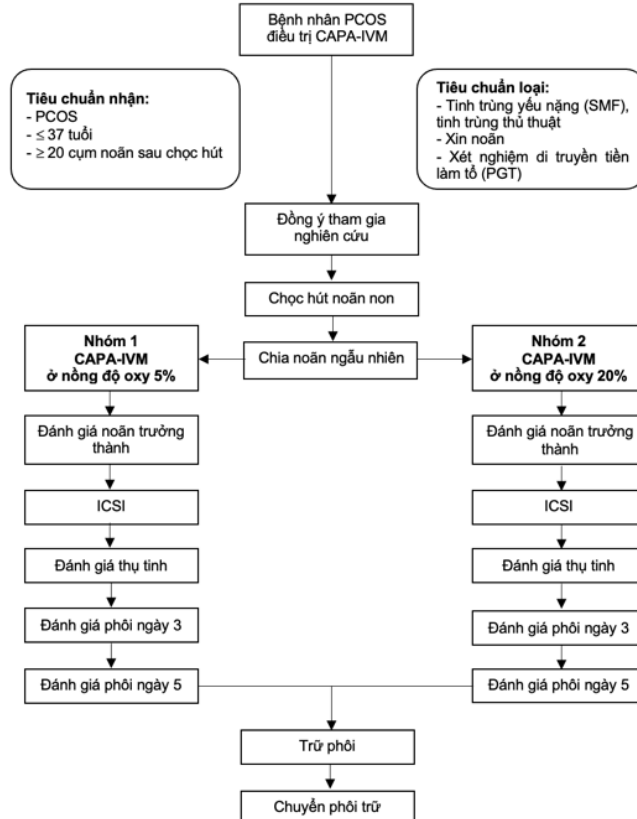
Hệ thống IVM mới có bước tiền nuôi cấy trưởng thành (CAPA-IVM) được giới thiệu bởi Sanchez và cộng sự vào năm 2017, đã được chứng minh giúp cải thiện tiềm năng của noãn sau nuôi trưởng thành thông qua sự đồng bộ trưởng thành nhân và trưởng thành tế bào chất (Sanchez *et al.*, 2019; Vuong *et al.*, 2020). Trong đó, C-type natriuretic peptide (CNP) là yếu tố sinh lý chính trong nang noãn ở người, được thêm vào bước nuôi cấy tiền trưởng thành noãn (CAPA) và hoạt động như một chất ức chế phân bào, ngăn ngừa sự trưởng thành tự phát của noãn. Sau đó, amphiregulin (AREG) (phối tử giống với yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF) trong giai đoạn rụng trứng), được thêm vào bước nuôi cấy trưởng thành noãn (IVM), đã được chứng minh là có tác động tích cực đến sự trưởng thành của noãn (Akin *et al.*, 2022). Tỷ lệ noãn trưởng thành khi sử dụng CAPA-IVM ở bệnh nhân PCOS hoặc bệnh nhân có số lượng nang noãn thứ cấp (Antral Follicle Count-AFC) cao đã được báo cáo là 62-64,3% (Sanchez *et al.*, 2019; Vuong *et al.*, 2020).

Nồng độ oxy trong hệ thống nuôi cấy noãn và phôi thường được duy trì ở hai mức: nồng độ oxy thấp (5%) và nồng độ oxy khí quyển (20%). Về mặt sinh lý, đường sinh sản của con người và động vật có vú có nồng độ oxy thấp, dao động từ 1,5% đến 8,7% và dịch nang noãn chứa 1% đến 5% oxy (Whitty *et al.*, 2021). Điều này đặt ra câu hỏi, noãn và phôi người *in vitro* có thể phát triển tối ưu trong những điều kiện tương tự sinh lý tự nhiên hay không? Mặc dù, hiện nay đã có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của nồng độ oxy đến kết quả IVM và phôi học nhưng các nghiên cứu vẫn chưa có đủ cơ sở để đưa ra kết luận về nồng độ oxy tối ưu. Hệ thống CAPA-IVM đang sử dụng nồng độ oxy trong khí quyển và thiếu dữ liệu về ảnh hưởng của nồng độ oxy thấp trong CAPA-IVM trên người. Do đó, nghiên cứu thí điểm chia noãn này được thực hiện nhằm trả lời cho câu hỏi nghiên cứu: “Sử dụng nồng độ oxy thấp (5%) và nồng độ oxy khí quyển (20%) trong nuôi trưởng thành noãn non *in vitro* ở chu kỳ CAPA-IVM mang lại hiệu quả khác nhau như thế nào về khả năng trưởng thành noãn và tiềm năng phát triển phôi trên nhóm bệnh nhân PCOS?”

**VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**

**Thiết kế nghiên cứu**

Nghiên cứu thí điểm chia noãn (NCT06087354) được thực hiện tại Bệnh viện Mỹ Đức Phú Nhuận, TPHCM từ ngày 09/11/2023 đến 22/5/2024. Nghiên cứu đã được chấp thuận bởi hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Bệnh viện Đa khoa Mỹ Đức, TPHCM (Mã số 11/23/DD-BVMD, ngày 12/10/2023) và được thực hiện theo nguyên tắc thực hành lâm sàng tốt và tuyên bố Helsinki 2002. Tất cả bệnh nhân tham gia nghiên cứu đều được tư vấn về nghiên cứu và đồng ý tham gia nghiên cứu.



**Hình 1. Sơ đồ nghiên cứu tổng thể**

## Dân số nghiên cứu

Đối tượng tham gia nghiên cứu là những bệnh nhân trong độ tuổi 18-37 mắc hội chứng buồng trứng đa nang (có 25 nang với đường kính 2-9 mm trong toàn bộ buồng trứng và/hoặc thể tích buồng trứng tăng > 10 mL (Group, 2004)) và có từ 20 COCs trở lên được thu nhận sau chọc hút (ovum pick-up-OPU). Tiêu chuẩn loại là chu kỳ xin noãn, chu kỳ xét nghiệm di truyền tiền làm tổ (Pre-implantation genetic testing-PGT) và các trường hợp có tình trạng yếu nặng (Severe male factor-SMF) có mật độ <1 triệu tinh trùng/mL, khả năng di chuyển <10% và tinh trùng từ thủ thuật chọc hút tinh trùng từ mào tinh hoàn qua da/thu nhận tinh trùng từ tinh hoàn (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration-PESA/ Testicular Sperm Extraction-TESE). Trong lần thăm khám đầu tiên, bệnh nhân sẽ được cung cấp thông tin về nghiên cứu và những bệnh nhân đồng ý tham gia sẽ ký vào đơn đồng ý tham gia nghiên cứu.

## Can thiệp và đánh giá

Sau chọc hút noãn non, COCs được thu nhận từ mỗi bệnh nhân được chia ngẫu nhiên vào một trong hai nhóm: nuôi cấy ở nồng độ oxy thấp (5%) hoặc ở nồng độ oxy khí quyển (20%) trong cả hai bước của quy trình CAPA-IVM. Nghiên cứu sử dụng tủ cấy benchtop BT37 (Origio, Đan Mạch) và sử dụng hỗn hợp khí trộn thương mại tương ứng với từng điều kiện nuôi cấy.

## Chọc hút noãn non (ovum pick-up-OPU)

Trong lần khám đầu tiên, bệnh nhân được siêu âm để xác định AFC và nồng độ hormone kháng Müllerian (Anti-mullerian hormone-AMH). Bệnh nhân được chẩn đoán mắc PCOS (Group, 2004) và được sàng lọc các tiêu chí đủ điều kiện tham gia nghiên cứu. Nghiên cứu không sử dụng gonadotropin trong điều trị là dựa trên kết quả của thử nghiệm lâm sàng trước đây (NCT05600972). Theo đó, việc sắp xếp lịch khám và chọc hút noãn non được linh hoạt, phụ thuộc vào thời gian phù hợp của bệnh nhân và bác sĩ. Quy trình chọc hút noãn non giống nhau đối với tất cả bệnh nhân, như đã được mô tả trong nghiên cứu trước đây (Vuong *et al.*, 2020).

## Thu nhận và phân chia noãn

COCs từ dịch nang được thu nhận bằng cách quan sát dưới kính hiển vi soi nổi. Sau đó, tất cả dịch nang được đổ vào phễu lọc để kiểm tra lần cuối xem có bất kỳ COCs nào bị bỏ sót hay không. Sau OPU, tất cả COCs được rửa trong môi trường đệm (global® Collect®, Life Global, USA) và được phân chia ngẫu nhiên vào 2 nhóm: nhóm nồng độ oxy thấp hoặc nồng độ oxy khí quyển. COCs được đánh giá hình thái và được phân loại là được bao quanh hoàn toàn khi có ít nhất ba lớp tế bào cumulus bao bọc hoàn toàn noãn hoặc được bao quanh một phần khi chỉ một phần noãn được bao phủ bởi các tế bào cumulus, như mô tả của Sanchez và cộng sự (Sanchez *et al.*, 2019). Các nghiên cứu đã đề cập rằng noãn chỉ được bao quanh một phần bởi cumulus dẫn đến khả năng trưởng thành và phôi kém hơn (Sanchez *et al.*, 2019). Các noãn được bao quanh hoàn toàn và các noãn được bao quanh một phần cumulus được chia đều cho 2 nhóm. Noãn không có cumulus xung quanh sẽ được loại bỏ.

## Nuôi cấy CAPA-IVM và tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (Intracytoplasmic sperm injection-ICSI)

Nghiên cứu sử dụng tủ cấy benchtop BT37 (Origio, Đan Mạch) với hỗn hợp khí trộn thương mại tương ứng với từng điều kiện nuôi cấy (IVF Trigas Cylinder, Thai Special Gas Co., Ltd, Thái Lan) cho cả nhóm oxy thấp (7% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 88% N<sub>2</sub>) và oxy khí quyển (7% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>, 73% N<sub>2</sub>).

Môi trường tiền trưởng thành (bước CAPA), bao gồm môi trường IVM (MediCult IVM System, ORIGIO, Đan Mạch), được bổ sung hormone kích thích nang noãn tái tổ hợp (rFSH) 1 mIU/mL (Puregon, MSD, Australia), insulin 5 ng/mL (Insulin human, Sigma-Aldrich, Đức), estradiol 10 nmol/L (Estradiol, Sigma-Aldrich, Đức), albumin huyết thanh người 5 mg/mL (Human Serum Albumin, SAGE, Đan Mạch) và CNP-22 25nmol/L (C-type natriuretic peptide 1-22, Tocris, UK), được phủ đầu và cân bằng qua đêm.

COCs được rửa và nuôi cấy trong môi trường CAPA, với 5-10 COCs trên 500 µL môi trường trong đĩa 4 giếng (Nunc™, ThermoFisher Scientific, Hoa Kỳ) (Sanchez *et al.*, 2019; Vuong *et al.*, 2020). Sau đó, các đĩa cấy được nuôi cấy trong tủ cấy tương ứng với nhóm nồng độ oxy thấp hoặc oxy khí quyển để nuôi cấy CAPA trong 24 giờ. Sau khi nuôi cấy tiền trưởng thành, COCs được rửa sạch và chuyển sang môi trường trưởng thành (bước IVM) bao gồm môi trường IVM, được bổ sung rFSH 100 mIU/mL, insulin 5 ng/mL, estradiol 10 nmol/L và AREG tái tổ hợp ở người 100 ng/mL (Recombinant Mouse Amphiregulin Protein, R&D Systems, USA) và nuôi cấy thêm 30 giờ ở 37°C, có phủ dầu. Việc chuẩn bị bước IVM cho 2 nhóm cũng tương tự như bước CAPA nêu trên.

Sau 30 giờ nuôi cấy IVM, noãn được tách bỏ cumulus và trạng thái trưởng thành của noãn được đánh giá dưới kính hiển vi đảo ngược. Noãn trưởng thành được xác định là những noãn đã đạt đến giai đoạn metaphase II (MII) dựa trên sự xuất hiện của thể cực thứ nhất. Noãn trưởng thành được thụ tinh bằng kỹ thuật ICSI và nuôi cấy trong tủ nuôi cấy có tích hợp camera quan sát liên tục (timelapse incubator-CCM-iBIS, Astec, Nhật Bản) ở 37°C, 6% CO<sub>2</sub> và 5% O<sub>2</sub> có phủ dầu. Kiểm tra thụ tinh được thực hiện 16-18 giờ sau khi ICSI tuân theo đồng thuận Alpha-ESHRE 2011. Đánh giá phôi ngày 3 được thực hiện vào lúc 68 ± 1 giờ sau ICSI, dựa trên sự đồng thuận Istanbul. Tất cả phôi được nuôi cấy đến giai đoạn phôi nang. Đánh giá phôi nang được thực hiện ở thời điểm 116 ± 2 giờ sau ICSI theo đồng thuận của Gardner 2016.

Động học phát triển phôi được đánh giá các thông số theo hướng dẫn Hiệp hội Sinh sản và Phôi học châu Âu-ESHRE năm 2020 bao gồm: thời gian tổng xuất thể cực thứ 2 (TPB2), thời gian 2 tiền nhân xuất hiện (TPNa), thời gian 2 tiền nhân biến mất (TPNf), thời gian phôi phân chia từ 2-8 tế bào (t2-t8), thời gian phôi bắt đầu nên (tSC), thời gian phôi nên hoàn toàn (phôi đầu-tM), thời gian bắt đầu hình thành phôi nang (tSB) và thời gian phôi nang nở rộng (tEB). Ngoài ra, tỷ lệ phôi nang bất thường phân chia (Direct cleavage-DC) ở chu kỳ phân bào thứ nhất (DC1) và chu kỳ phân bào thứ hai (DC2) cũng được so sánh ở 2 nhóm. Phôi nang được đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa (Cryotech, Nhật Bản).

### Chuyển phôi đông lạnh (Frozen embryo transfer-FET)

Trong chu kỳ FET, nội mạc tử cung được chuẩn bị bằng cách sử dụng estradiol valerate đường uống 8 mg/ngày bắt đầu từ ngày thứ 2 hoặc thứ 3 của chu kỳ kinh nguyệt. Độ dày nội mạc tử cung được theo dõi từ ngày thứ 6 trở đi và bắt đầu sử dụng progesterone âm đạo khi độ dày nội mạc tử cung đạt  $\geq 8$  mm. Chuyển phôi nang được thực hiện vào ngày thứ 6 sau khi bắt đầu sử dụng progesterone. Estradiol và progesterone được sử dụng để hỗ trợ hoàng thể sau chuyển phôi cho đến tuần thứ 7 của thai kỳ. Nồng độ hCG huyết thanh được đo 2 tuần sau khi chuyển phôi và nếu dương tính, siêu âm tử cung được thực hiện khi thai được 7 và 12 tuần.

### Kết quả nghiên cứu

Kết quả chính của nghiên cứu là số lượng noãn trưởng thành. Kết quả phụ bao gồm kết quả phôi học và kết quả lâm sàng. Các kết quả về phôi học bao gồm số noãn được thụ tinh 2 tiền nhân (2PN), số phôi nang, số phôi nang chất lượng tốt, số phôi nang đông lạnh và động học phát triển phôi. Kết quả lâm sàng bao gồm xét nghiệm thai dương tính  $\beta$ -hCG 14 ngày sau chuyển phôi, thai lâm sàng, tỷ lệ làm tổ, thai ngoài tử cung và đa thai.

### Phân tích thống kê

Dữ liệu được trình bày bằng cách sử dụng số liệu thống kê mô tả (giá trị trung bình và độ lệch chuẩn cho các biến phân phối chuẩn hoặc trung vị và liên vùng [IQR] cho các biến phân phối không chuẩn). Biến phân loại được trình bày dưới dạng số (%). Sự khác biệt giữa các nhóm về kết quả chính và phụ được phân tích bằng thử nghiệm chính xác của Fisher (các biến phân loại), được báo cáo là các giá trị rủi ro tương đối (RR) và khoảng tin cậy (CI) 95%. Giá trị  $p < 0,05$  là được xem là có ý nghĩa thống kê cho tất cả các thử nghiệm.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Dân số nghiên cứu

Từ ngày 9/11/2023 đến ngày 22/5/2024, tổng cộng 20 bệnh nhân mắc PCOS đã được tham gia vào nghiên cứu (tuổi trung bình  $31,4 \pm 3,2$  tuổi, chỉ số khối cơ thể trung bình  $22,6 \pm 2,5$  kg/m<sup>2</sup>). Thời gian vô sinh trung bình là 2 năm, tất cả bệnh nhân đều thực hiện CAPA-IVM lần đầu và 3/4 là vô sinh nguyên phát. Tổng cộng có 554 COCs được thu nhận (276 ở nhóm oxy thấp và 278 ở nhóm oxy khí quyển).

### Kết quả noãn trưởng thành và phôi học

Khi được phân tích theo COCs, số lượng noãn trưởng thành và số lượng noãn thụ tinh 2PN thấp hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm nồng độ oxy thấp so với nhóm nồng độ oxy khí quyển. Số lượng phôi nang, phôi nang tốt và phôi nang đông lạnh cũng thấp hơn ở nhóm oxy thấp, nhưng sự khác biệt so với nhóm oxy khí quyển không đạt ý nghĩa thống kê (Bảng 1). Những kết quả tương tự cũng đạt được khi dữ liệu được phân tích trên cơ sở từng bệnh nhân (Bảng 2).

Bảng 1. Kết quả phôi học trên từng phức hợp noãn-cumulus (COCs)

Đặc điểm	5% O <sub>2</sub> (N = 276)	20% O <sub>2</sub> (N = 278)	RR (95% CI)	P-value
Noãn trưởng thành, n (%)	148 (53,6)	183 (65,8)	0,81 (0,71-0,94)	0,004
Noãn thụ tinh 2PN, n (%)	91 (33)	133 (47,8)	0,69 (0,56-0,85)	<0,001
Phôi nang, n (%)	31 (11,2)	46 (16,5)	0,68 (0,44-1,04)	0,07
Phôi nang tốt, n (%)	8 (2,9)	14 (5)	0,58 (0,25-1,35)	0,2
Phôi nang đông lạnh, n (%)	31 (11,2)	46 (16,5)	0,68 (0,44-1,04)	0,07

Từ viết tắt: CI, confidence interval; RR, relative risk.

Bảng 2. Kết quả phôi học trên mỗi bệnh nhân

Đặc điểm	5% O <sub>2</sub> (N = 20)	20% O <sub>2</sub> (N = 20)	P-value
Phức hợp noãn-cumulus	14 [12; 16]	14 [11; 16]	0,902
Số lượng noãn trưởng thành	8 [6; 9]	9 [7; 11]	0,058
Tỷ lệ noãn trưởng thành, %	57,3 [45,0;64,4]	67,7 [57,5;78,1]	0,029

## CÔNG NGHỆ SINH HỌC Y DƯỢC

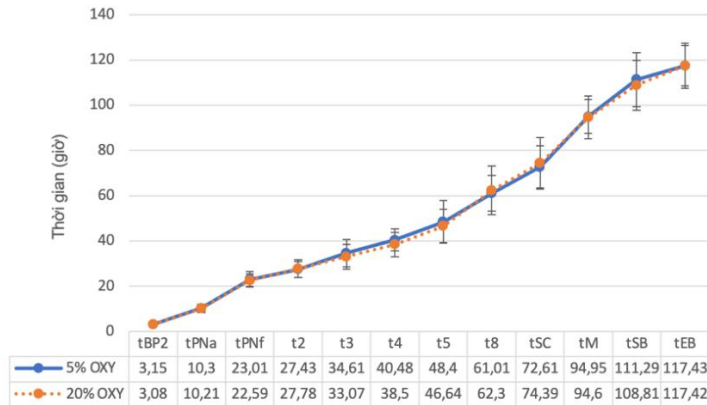
Noãn thụ tinh 2PN	4 [3; 6]	7 [4; 9]	0,036
Phôi nang	2 [1; 2]	2[1; 3]	0,357
Phôi nang tốt	0 [0; 1]	1[0; 1]	0,121
Không phôi <sup>a</sup> , n (%)	4 (20,0)	3 (15,0)	0,680
Phôi nang đông lạnh	2 [1; 2]	2 [1; 3]	0,357

*Giá trị: trung vị [tứ phân vị 1; tứ phân vị 3], hoặc số lượng bệnh nhân (%).*

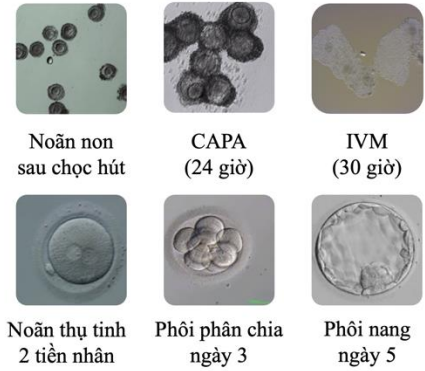
<sup>a</sup>Số bệnh nhân không có phôi nang ở mỗi nhóm, trong đó có 2 bệnh nhân không có phôi nang để chuyển ở cả hai nhóm.

### Kết quả động học phát triển phôi CAPA-IVM ở 2 nhóm điều kiện nuôi cấy

Các thông số động học phát triển phôi là tương đương nhau khi nuôi cấy CAPA-IVM ở 2 nhóm nồng độ oxy (trung bình ± độ lệch chuẩn và P >0,05) (Hình 2). Ngoài ra, tỷ lệ phôi nang có phân chia trực tiếp DC1 (29,03% so với 21,74%) và DC2 (6,45% so với 8,70%) là tương đương nhau giữa 2 nhóm nồng độ oxy thấp và nồng độ oxy khí quyển với P <0,05.



Hình 2. Đồ thị động học phát triển phôi CAPA-IVM



Hình 3. Quá trình phát triển noãn non CAPA-IVM, sự thụ tinh và phát triển phôi

### Kết quả lâm sàng

Trong số 20 bệnh nhân PCOS, có 16 bệnh nhân được chuyển phôi đông lạnh. Một bệnh nhân yêu cầu chuyển 2 phôi nang (một phôi nang từ nồng độ oxy thấp và một phôi nang từ nồng độ oxy trong khí quyển), do đó đã bị loại khỏi phân tích. Tổng cộng có 15 bệnh nhân chuyển đơn phôi nang được phân tích trong nghiên cứu, trong đó 6 người ở nhóm oxy thấp và 9 ở nhóm oxy khí quyển. Tỷ lệ thử thai sinh hoá, thai lâm sàng, thai diễn tiến và các kết quả về khả năng sinh sản khác không khác biệt đáng kể giữa hai nhóm (Bảng 3).

**Bảng 3. Kết quả lâm sàng sau lần chuyển phôi trữ đầu tiên**

Kết quả	5% O <sub>2</sub> (n=6)	20% O <sub>2</sub> (n=9)	P-value
Chất lượng phôi nang			0,01
Phôi nang loại tốt	2 (33,3)	9 (100,0)	
Phôi nang loại xấu	4 (66,7)	0 (0,0)	
Thai sinh hoá	3 (50,0)	7 (77,8)	0,58
Thai lâm sàng	3 (50,0)	5 (55,6)	0,95
Thai diễn tiến	2 (33,3)	5 (55,6)	0,75
Tỷ lệ phôi làm tổ	60,0 ± 54,8	50 ± 52,7	0,75
Thai lưu <12 tuần	1 (16,7)	0 (0,0)	-
Thai ngoài tử cung	0 (0,0)	0 (0,0)	-
Đa thai	0 (0,0)	0 (0,0)	-

*Giá trị: trung bình ± độ lệch chuẩn hoặc số lượng bệnh nhân (%).*

### Thảo luận

Trong nghiên cứu thí điểm này với những bệnh nhân PCOS, việc sử dụng nồng độ oxy thấp (5%) cho hệ thống nuôi cấy CAPA-IVM đã làm giảm đáng kể khả năng trưởng thành của noãn so với nồng độ oxy khí quyển (20%).

Nhìn chung, các kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng nồng độ oxy thấp trong CAPA-IVM không cải thiện khả năng trưởng thành noãn ở bệnh nhân PCOS. Những phát hiện này hỗ trợ cho thực tiễn áp dụng nồng độ oxy khí quyển trong cả hai bước của quy trình CAPA-IVM hiện tại và cung cấp bằng chứng bổ sung để giúp tối ưu hóa hệ thống nuôi cấy CAPA-IVM.

Đây là nghiên cứu đầu tiên đánh giá tác động của nồng độ oxy lên sự trưởng thành COCs trong hệ thống CAPA-IVM trên người. Trong nghiên cứu có liên quan (Akin *et al.*, 2023), nồng độ oxy thấp trong giai đoạn CAPA có ảnh hưởng đến sự trưởng thành của COCs chuột. Trong nghiên cứu này, COCs chuột được nuôi cấy với 5% oxy trong giai đoạn CAPA, tiếp theo là 20% oxy trong giai đoạn IVM. Không có sự khác biệt về tỷ lệ noãn trưởng thành, đường kính noãn, tỷ lệ phân chia ngày 2 hoặc tỷ lệ phôi nang giữa các nhóm nuôi cấy CAPA với nồng độ oxy 5% hoặc 20%. Tuy nhiên, các noãn non (Germinal vesicle-GV) từ COCs được nuôi cấy trong điều kiện oxy thấp so với oxy khí quyển trong bước CAPA cho thấy cấu hình hô hấp của ty thể gần với cấu hình hô hấp của ty thể từ noãn GV-COCs *in vivo* hơn. Nghiên cứu hiện tại của chúng tôi nhằm mục đích nuôi cấy cả hai bước CAPA-IVM ở nồng độ oxy thấp, phù hợp với xu hướng gần đây trong các hệ thống nuôi cấy phôi thiên về mức oxy thấp hơn (~5%). Lý do cơ bản thực hiện nghiên cứu là sử dụng cùng điều kiện oxy cho cả nuôi cấy phôi và noãn *in vitro*, đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho việc xây dựng hệ thống tử nuôi cấy phôi sử dụng phương pháp CAPA-IVM. Điều này có nghĩa là nồng độ oxy 5% được áp dụng cho cả bước CAPA và IVM. Tuy nhiên, cách tiếp cận này có tác động tiêu cực đến hiệu quả trưởng thành noãn và tiềm năng phát triển phôi nang. Vai trò của nồng độ oxy trong từng giai đoạn của hệ thống CAPA-IVM vẫn chưa được hiểu rõ và có ít bằng chứng giải thích tại sao nồng độ oxy thấp dường như không hiệu quả khi nuôi cấy IVM của COCs trên người, trái ngược với sinh lý tự nhiên (Whitty *et al.*, 2021). Tuy nhiên, dữ liệu của chúng tôi và những phát hiện của Akin và cộng sự có thể chỉ ra rằng việc giảm nồng độ oxy chỉ ở bước CAPA có thể là một chiến lược nuôi cấy đầy hứa hẹn cho CAPA-IVM (Akin *et al.*, 2023).

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vai trò quan trọng của nồng độ oxy đối với hiệu quả của IVM tiêu chuẩn. Hầu hết các nghiên cứu đều dựa trên mô hình động vật và kết quả vẫn còn gây tranh cãi. Nghiên cứu trên chuột cho thấy không có sự khác biệt về khả năng trưởng thành noãn, thụ tinh và tạo phôi ở điều kiện nồng độ oxy thấp trong IVM, nhưng tổng số tế bào phôi nang cao hơn đã được ghi nhận. Tế bào trứng của bò và lợn cho thấy tiềm năng phát triển tốt hơn khi chúng được nuôi cấy trong điều kiện oxy thấp. Cũng có nghiên cứu cho thấy sự hình thành phôi nang tốt hơn khi noãn được nuôi cấy IVM trong điều kiện oxy khí quyển. Sự khác biệt quan sát được có thể là do việc sử dụng các môi trường nuôi cấy và hệ thống IVM khác nhau.

Nghiên cứu hiện tại sử dụng phác đồ không có FSH dành cho bệnh nhân mắc PCOS trong chu kỳ CAPA-IVM dựa trên kết quả của một thử nghiệm lâm sàng được thực hiện tại trung tâm của chúng tôi (NCT05600972). Theo đó, bệnh nhân không cần sử dụng liều gonadotropin nào (so với 2-3 liều trong các nghiên cứu đã công bố (Sanchez *et al.*, 2019; Vuong *et al.*, 2020)). Vai trò của mỗi FSH (Follicle Stimulating Hormone) trong CAPA-IVM vẫn chưa rõ ràng. Tuy nhiên, phác đồ không có FSH có thể ngăn ngừa tác dụng phụ, an toàn cho bệnh nhân và góp phần tiết kiệm chi phí. Trong nghiên cứu này, thời gian trung bình từ ngày kinh cuối cùng đến ngày chọc hút là 3,5 [2,8; 5,5] ngày.

Nghiên cứu của chúng tôi đã báo cáo các kết quả lâm sàng tương đương sau chu kỳ FET đơn phôi nang đầu tiên từ nhóm oxy thấp và oxy khí quyển (Bảng 3). Tuy nhiên, cỡ mẫu nhỏ và sự sắp xếp chuyển phôi không đồng đều giữa hai nhóm khó đưa ra bất kỳ kết luận chắc chắn nào về kết quả lâm sàng. Mặc dù số lượng phôi nang cao hơn ở nhóm oxy khí quyển so với nhóm oxy thấp, nhưng sự khác biệt giữa các nhóm không có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ thai lâm sàng tương đương ở nhóm oxy thấp và nhóm oxy khí quyển (50,0% và 55,6% với  $P = 0,95$ ) và không có trường hợp đa thai.

Điểm mạnh của nghiên cứu là việc sử dụng cùng loại tử cấy cho cả hai nhóm và hệ thống cung cấp khí sử dụng khí trộn thương mại với nồng độ khí chính xác, được nhà sản xuất và phòng thí nghiệm xác nhận về chất lượng. Điều này đảm bảo mức oxy đồng nhất trong suốt nghiên cứu. Hơn nữa, COCs được nuôi cấy trong các buồng riêng biệt của tử cấy sẽ giảm thiểu khả năng dao động về nhiệt độ và nồng độ khí. Tuy nhiên, nghiên cứu cũng có một số hạn chế: thứ nhất, cỡ mẫu tương đối nhỏ và chỉ bao gồm dân số Việt Nam; thứ hai, nghiên cứu tập trung vào bệnh nhân mắc PCOS và do đó cần thận trọng khi ngoại suy kết quả cho các nhóm bệnh nhân khác. Cuối cùng, nghiên cứu này không bao gồm phân tích quá trình chuyển hóa glucose hoặc hô hấp ty thể của COCs trong quy trình CAPA-IVM, vì điều này có thể cung cấp những hiểu biết có giá trị về các cơ chế phân tử ảnh hưởng đến sự trưởng thành noãn.

## KẾT LUẬN

Việc sử dụng nồng độ oxy thấp (5%) trong cả hai bước của CAPA-IVM làm giảm số lượng noãn trưởng thành và noãn thụ tinh 2PN so với nồng độ oxy khí quyển (20%). Hiện tại, hệ thống nuôi cấy CAPA-IVM vẫn nên sử dụng nồng độ oxy khí quyển và cần có nghiên cứu sâu hơn để xác định nồng độ oxy tối ưu cho từng giai đoạn của CAPA-IVM.

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi xin cảm ơn các nhân viên tại Bệnh viện Mỹ Đức Phú Nhuận đã hỗ trợ thu thập dữ liệu. Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia Việt Nam (NAFOSTED) theo số tài trợ FWO.108-2022.01.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Akin N, Le AH, Ha UD, Romero S, Sanchez F, Pham TD, Nguyen MH, Anckaert E, Ho TM, Smitz JJHR (2022) Positive effects of amphiregulin on human oocyte maturation and its molecular drivers in patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 37: (1) 30-43.

Akin N, Ates G, von Mengden L, Herta A-C, Meriggioli C, Billooye K, Stocker WA, Ghesquiere B, Harrison CA, Cools W (2023) Effects of lactate, super-GDF9, and low oxygen tension during bi-phasic *in vitro* maturation on the bioenergetic profiles of mouse cumulus–oocyte complex. *Biol Reprod* 109: (4) 432-449.

Brinsden P, Wada I, Tan SL, Balen A, Jacobs HSBjoo, gynaecology (1995) Diagnosis, prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Brit J Obs Gynaecol* 102: (10) 767-772.

Das M, Son WY, Buckett W, Tulandi T, Holzer H (2014) *In-vitro* maturation versus IVF with GnRH antagonist for women with polycystic ovary syndrome: treatment outcome and rates of ovarian hyperstimulation syndrome. *Reprod BioMed Onl* 29: (5) 545-551.

Edwards RG (1965) Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *The Lancet* 286: (7419) 926-929.

Group REASPCW (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 19: (1) 41-47.

Paulson RJ, Fauser BC, Vuong LT, Doody K (2016) Can we modify assisted reproductive technology practice to broaden reproductive care access? *Fert Ster* 105: (5) 1138-1143.

Sanchez F, Le AH, Ho VN, Romero S, Van Ranst H, De Vos M, Gilchrist RB, Ho TM, Vuong LN, Smitz JJJoar, genetics (2019) Biphasic in vitro maturation (CAPA-IVM) specifically improves the developmental capacity of oocytes from small antral follicles. *J Assis Reprod Genet* 36: 2135-2144.

Teede HJ, Tay CT, Laven JJ, Dokras A, Moran LJ, Piltonen TT, Costello MF, Boivin J, Redman LM, Boyle JA (2023) Recommendations from the 2023 international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 189: (2) G43-G64.

Vuong LN, Ho TM, Gilchrist RB, Smitz J (2019) The place of *in vitro* maturation in assisted reproductive technology. *Fert Reprod* 1: (01) 11-15.

Vuong LN, Ho VN, Ho TM, Dang VQ, Phung TH, Giang NH, Le AH, Pham TD, Wang R, Smitz J (2020) *In-vitro* maturation of oocytes versus conventional IVF in women with infertility and a high antral follicle count: a randomized non-inferiority controlled trial. *Hum Reprod* 35: (11) 2537-2547.

Whitty A, Kind KL, Dunning KR, Thompson JG (2021) Effect of oxygen and glucose availability during in vitro maturation of bovine oocytes on development and gene expression. *J Ass Reprod Genet* 38: (6) 1349-1362.

## IMPACT OF LOW VERSUS AIR OXYGEN TENSION ON OOCYTE MATURATION DURING BIPHASIC IVM IN PCOS: A SIBLING OOCYTE PILOT STUDY

Tran Quoc Viet<sup>1,3\*</sup>, Pham Hoang Huy<sup>1,3</sup>, Le Hoang Anh<sup>1,3</sup>, Pham Duong Toan<sup>3</sup>, Nguyen Le Duy<sup>3</sup>, Vu Thi Lan Anh<sup>3</sup>, Le Long Ho<sup>1,3</sup>, Le Khắc Tiến<sup>1,3</sup>, Ho Manh Tuong<sup>2,3</sup>, Vuong Thi Ngoc Lan<sup>4</sup>

<sup>1</sup>IVMFD Phu Nhuan, My Duc Phu Nhuan Hospital, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>IVFMD, My Duc Hospital, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>3</sup>HOPE Research Center, My Duc Hospital, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>4</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam

### SUMMARY

In vitro maturation (IVM) is an alternative assisted reproductive technology that minimizes hormone-related side effects and treatment burden for patients. Capacitation-IVM (CAPA-IVM), a biphasic IVM system, improves the competence of oocytes matured *in vitro*. The current CAPA-IVM culture operates under air oxygen concentration, but it is important to understand the impact of oxygen tension on oocyte maturation because it remains unclear whether the maturation process aligns with *in vivo* conditions. This study investigated the effectiveness of using low oxygen tension for both steps of CAPA-IVM culture. Cumulus-oocyte complexes (COCs) recruited from 20 women with polycystic ovary syndrome (PCOS) were allocated into two groups and underwent CAPA-IVM culture with low oxygen tension (5%) or air oxygen tension (20%). Cultivation of COCs took place in two benchtop incubators, each equipped with commercial mix-gas bottles to establish the respective oxygen conditions. The number of matured oocytes and the number of 2-pronuclei fertilized oocytes were significantly lower when COCs were cultured under low versus air oxygen tension during the two steps of biphasic CAPA-IVM. This is the first study to report the impact of low oxygen tension on the *in vitro* maturation of human COCs in a biphasic CAPA-IVM system. Air oxygen tension should be chosen for human COCs maturation in the CAPA-IVM approach.

**Keywords:** CAPA-IVM, cumulus-oocyte complex, *in vitro* maturation, oxygen tension, Polycystic Ovary Syndrome-PCOS.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0966050928; Email: viet.tq@myduchospital.vn