

# TRỮ LẠNH MÔ BUỒNG TRỨNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP THUYẾT TINH HOÁ: KINH NGHIỆM ĐẦU TIÊN TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Thị Thu Lan<sup>1,2,✉</sup>, Nguyễn Cao Trí<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Diễm<sup>2</sup>

Trần Bích Thư<sup>1</sup>, Trương Đình Kiệt<sup>3</sup>, Đặng Quang Vinh<sup>2</sup>

Nguyễn Văn Tiến<sup>4</sup>, Hồ Mạnh Tường<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP.HCM

<sup>2</sup>Bệnh viện Mỹ Đức

<sup>3</sup>Viện Di truyền Y học

<sup>4</sup>Bệnh viện Ung bướu TP. Hồ Chí Minh

Trữ lạnh mô buồng trứng (OTC) để bảo tồn khả năng sinh sản ở phụ nữ được áp dụng ở nhiều trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm trên thế giới. Tuy nhiên, chưa có một nghiên cứu nào được công bố tại Việt Nam. Nghiên cứu OTC bằng thuyết tinh hoá (vitrification) tại IVFMD, Bệnh viện Mỹ Đức (2020-2023) trên mẫu mô buồng trứng từ bệnh nhân điều trị ung thư (theo NCT04666376). Mô mỗi bệnh nhân được chia 3 nhóm: 1 (không đông lạnh - chứng), 2 (đông lạnh bằng Ova-kit Type M) và 3 (đông lạnh bằng môi trường của BV Mỹ Đức). Kết quả là tỉ lệ nang noãn sống và tỉ lệ nang noãn có hình thái nguyên vẹn ở nhóm 2 và 3 thấp hơn ý nghĩa so với nhóm 1, lần lượt [80,3% nhóm 1; 70% nhóm 2 và 65% nhóm 3] và [71,3% nhóm 1; 59,4% nhóm 2; 58,3% nhóm 3] ( $p < 0,05$ ). Các kết quả này tương đương với các nghiên cứu trên thế giới do ảnh hưởng của quá trình đông lạnh lên chất lượng của mô. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu cũng chứng minh chất lượng mô đông lạnh bằng môi trường thương mại và môi trường IVFMD không có sự khác biệt.

**Từ khoá:** Trữ mô buồng trứng, OTC, thuyết tinh hoá, vitrification.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ khi em bé đầu tiên ra đời từ kỹ thuật trữ mô buồng trứng (Ovarian tissue cryopreservation - OTC) vào năm 2004, OTC và cấy ghép mô buồng trứng sau đông lạnh - rã đông được xem là một trong những kỹ thuật hứa hẹn trong việc bảo tồn mô buồng trứng ở phụ nữ trong độ tuổi sinh sản mắc ung thư. Trên thực tế, những liệu pháp điều trị ung thư như hoá trị và xạ trị có thể giúp người bệnh kéo dài sự sống, tuy nhiên những liệu pháp này có thể làm tổn thương các nang noãn trong buồng trứng ở những phụ nữ

trẻ tuổi, bé gái ở tuổi vị thành niên và cả bé gái chưa đến tuổi dậy thì, nếu thời gian điều trị kéo dài hoặc liều điều trị cao. Kết quả là họ có khả năng suy buồng trứng sớm và mất khả năng sinh sản trong tương lai. Trên thế giới, có hơn 130 trẻ sinh ra từ kỹ thuật OTC, với khả năng phục hồi của mô buồng trứng sau cấy ghép được ghi nhận là 63,9% và tỉ lệ có thai tự nhiên là 57,5%.<sup>1</sup> Tuy nhiên, tỉ lệ sống của nang noãn trong OTC thường không ổn định, phụ thuộc vào các phương pháp đông lạnh - rã đông và thao tác của người thực hiện.

Mặc dù tiêu chuẩn vàng cho sự kiểm chứng khả năng sống của mô buồng trứng sau đông lạnh là khả năng sống và phát triển tiếp tục của nang noãn trong mô sau ghép tự thân vào cơ thể người bệnh hoặc ghép khác loài lên chuột

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Thu Lan

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP.HCM

Email: nttlan@hyvonghospital.com

Ngày nhận: 21/11/2023

Ngày được chấp nhận: 01/12/2023

suy giảm miễn dịch, phương pháp cấy ghép mô buồng trứng đòi hỏi nhiều về chi phí, kỹ thuật, thiết bị và thời gian theo dõi, do đó thường khó thực hiện ở hầu hết các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) hoặc nghiên cứu.<sup>2-4</sup> Một vài phương pháp có thể được áp dụng để đánh giá khả năng sống của nang noãn trong OTC bao gồm dự đoán tỉ lệ các nang noãn sống bằng nhuộm đỏ trung tính (Neutral red - NR) và khảo sát hình thái của nang noãn bằng phân tích mô học (histological analysis).<sup>5-7</sup> Về lý thuyết, NR là chất có khả năng di chuyển qua màng tế bào, khu trú trong lysosome của tế bào sống và hoàn toàn không gây độc, hay làm ảnh hưởng đến sự sống, cũng như sự phát triển tiếp tục của tế bào/mô.<sup>5</sup> Ngoài ưu điểm này, ngoài kỹ thuật nhuộm NR đơn giản, không cần thiết bị chuyên dụng và có thể đánh giá kết quả tế bào sống/chết trong mô sau một thời gian ngắn (4 - 6 giờ nhuộm), khi sử dụng trong OTC để đánh giá sự sống, mô/tế bào có thể tiếp tục nuôi cấy hoặc sử dụng để cấy ghép lại vào cơ thể của BN. Tuy nhiên, cho đến nay chỉ một số ít báo cáo về sử dụng phương pháp nhuộm NR trong OTC trên thế giới.<sup>5,8</sup> Bên cạnh đó, phân tích mô học là phương pháp được phần lớn các nghiên cứu OTC chọn lựa, với khả năng quan sát được đầy đủ hình thái của nang noãn, giúp dự đoán tương đối chính xác được khả năng phát triển tiếp tục của mô sau khi cấy ghép.<sup>9,10</sup> Một ưu điểm khác của phương pháp phân tích mô học thì đây là phương pháp “đầu tay” và là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán bệnh lý, hầu hết các phòng xét nghiệm y học ở bất kỳ bệnh viện nào cũng có, nên dễ triển khai đối với mẫu mô buồng trứng. Với những ưu điểm kể trên, nhuộm NR và phân tích mô học được xem là hai phương pháp đánh giá đơn giản, cho kết quả đánh giá nhanh và có độ chính xác nhất định trong khảo sát ban đầu chất lượng mô sau rã đông trong nghiên cứu OTC.

Đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hoá đã thực hiện thành công trên phôi và noãn tại hầu hết các trung tâm TTTON ở Việt Nam từ 2006. Cho đến nay, hơn 10.000 em bé khoẻ mạnh ra đời từ phôi và noãn đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hoá.<sup>11</sup> Tuy nhiên, OTC chưa từng được triển khai và cũng chưa có báo cáo chính thức nào về kỹ thuật này tại Việt Nam. Trong khi đó, theo báo cáo tại Hội nghị khoa học quốc tế về Phòng, chống ung thư tại Hà Nội vào 2/2022, ở nước ta tỷ lệ mắc mới bệnh nhân tăng lên 9 bậc (xếp thứ 90/185 quốc gia) so với ghi nhận năm 2018 và ước tính có 182.563 trường hợp mắc mới ung thư từ 2018 - 2022, trong đó nữ giới chiếm 42%. Nhu cầu về bảo tồn khả năng sinh sản ở phụ nữ trẻ tuổi, đặc biệt là trẻ gái vị thành niên và bé gái mắc ung thư ngày càng nhiều, trong khi đó chỉ trữ lạnh mô buồng trứng có thể thích hợp cho các đối tượng này. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là thiết lập quy trình hoàn chỉnh về kỹ thuật OTC, có thể áp dụng cho thực tiễn lâm sàng tại Việt Nam với mong muốn mang lại giải pháp bảo tồn khả năng sinh sản cho phụ nữ trẻ; đồng thời sử dụng tỉ lệ sống và hình thái của nang noãn làm các chỉ số đánh giá hiệu quả của quy trình OTC trên mô buồng trứng người.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Đối tượng

Buồng trứng hoặc một phần buồng trứng của bệnh nhân (BN) mắc ung thư vú hoặc ung thư nội mạc tử cung, dưới 45 tuổi, được chỉ định phẫu thuật cắt tử cung và hai phần phụ bằng kỹ thuật mổ hở hoặc nội soi.

### 2. Phương pháp

**Thiết kế nghiên cứu:** Báo cáo loạt ca, có so sánh đối chứng.

**Quy trình nghiên cứu:** gồm 5 bước chính:

*Thu nhận buồng trứng*

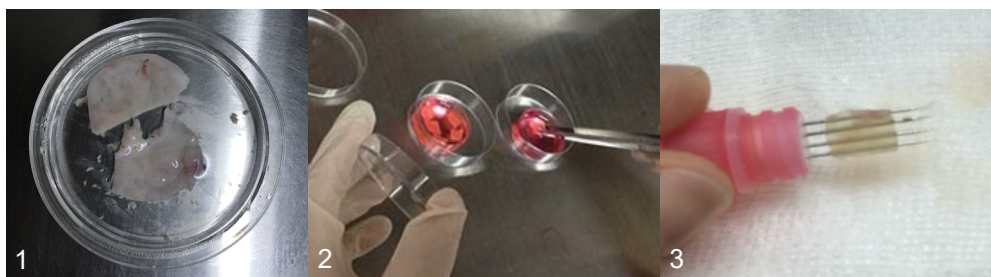
Cả buồng trứng hoặc một phần buồng trứng

được thu nhận bằng phẫu thuật hở hoặc nội soi từ các BN mắc ung thư vú hoặc ung thư nội mạc tử cung, dưới 45 tuổi. Buồng trứng sau thu nhận được đặt trong môi trường có đệm Phosphate buffered saline (PBS), 1% albumin huyết thanh tổng hợp, 100 IU/ml penicillin và 100 µg/ml streptomycin, ở 2 - 4°C, sau đó được vận chuyển về labo TTON IVFMD trong vòng  $61,1 \pm 9,57$  phút.

#### *Xử lý mô buồng trứng*

Mô vỏ buồng trứng được thu từ buồng trứng và được cắt thành từng mảnh 10x10x1mm trên

đá (hình 1), sau đó chọn ra 9 mảnh mô đối với mỗi BN và chia thành 3 nhóm (3 mảnh mô/nhóm). Nhóm 1 là nhóm mô không qua đông lạnh (nhóm mô tươi) và được xem là nhóm đối chứng; nhóm 2 là nhóm mô được đông lạnh thuỷ tinh hoá bằng môi trường Ova-kit type M (Kitazato, Japan); nhóm 3 là nhóm mô được đông lạnh thuỷ tinh hoá bằng môi trường của labo IVFMD. Nhóm 2 và 3 của mỗi BN được thực hiện đông lạnh, lưu trữ trong nitơ lỏng cùng vị trí trong vòng vài tuần và được rã đông cùng thời điểm.



**Hình 1. Buồng trứng và mô buồng trứng kích thước 1x1x10mm sau khi xử lý**

#### *Đông lạnh - rã đông bằng phương pháp thuỷ tinh hoá*

Đối với nhóm 2, ở bước đông lạnh, mô buồng trứng được tiếp xúc với môi trường đông lạnh lần lượt qua 3 dung dịch của Cryo kit, cụ thể Cryo 1 trong 5 phút, Cryo 2 trong 5 phút và Cryo 3 trong 15 phút. Sau đó mô được đặt trên bề mặt của Ova Cryo Device Type M (ODT) trước khi được nhúng trực tiếp vào nitơ lỏng và lưu trữ. Ở bước rã đông, ODT chứa mẫu mô được lấy ra khỏi nitơ lỏng và nhúng trực tiếp vào dung dịch Thaw 1 ở 37°C trong vòng 1 phút cho đến khi mẫu mô rơi ra khỏi ODT, sau đó mô được chuyển lần lượt qua Thaw 2 trong 3 phút và Thaw 3 trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.<sup>12</sup>

Đối với nhóm 3, ở bước đông lạnh, mô buồng trứng được tiếp xúc với môi trường đông lạnh lần lượt qua 2 dung dịch, gồm ES [là 7,5% Ethylene glycol (EG) và 7,5% in dimethyl

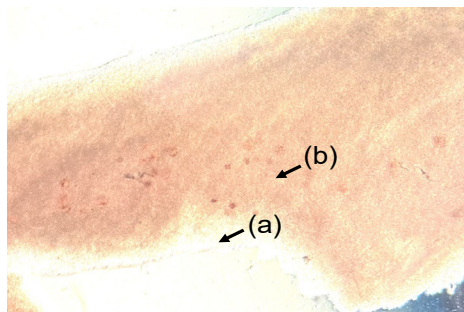
sulphoxide (DMSO) (Sigma) trong môi trường HM (là TCM-199 có đệm HEPES, được bổ sung 20% albumin huyết thanh tổng hợp)] trong vòng 25 phút; sau đó là VS [là 20% EG, 20% DMSO and 0,5 mol/l sucrose trong HM] trong vòng 15 phút ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, mô được đặt trên bề mặt của ODT trước khi được nhúng trực tiếp vào nitơ lỏng và lưu trữ. Ở bước rã đông, ODT chứa mẫu mô được lấy ra khỏi nitơ lỏng và nhúng trực tiếp vào dung dịch TS [là HM và 1 mol/l sucrose] ở 37°C trong vòng 1 phút cho đến khi mẫu mô rơi ra khỏi ODT, sau đó, mô được chuyển qua WS [0,5 mol/l sucrose trong HM] trong 5 phút và rửa 2 lần với HM trong 10 phút/lần ở nhiệt độ phòng. Quy trình được điều chỉnh dựa trên quy trình của Kagawa và cộng sự.<sup>9</sup>

#### *Nhuộm NR để đánh giá nang noãn sống*

Mô buồng trứng ở mỗi nhóm được cắt thành

các lát mỏng, có độ dày khoảng 100 $\mu$ m bằng dao phẫu thuật trong điều kiện vô trùng, sau đó, dùng kẹp nhỏ chuyển các lát mô vào đĩa cấy chứa môi trường Ova-culture (Kitazato) có 30 $\mu$ l dung dịch NR 0,33% (Sigma) (đã được làm ấm ở 37°C trước đó). Ủ mô trong dung dịch này ở

37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong trong vòng 4 giờ. Sau khi đủ thời gian ủ, dùng kẹp nhỏ gấp các lát mô nhỏ này đặt lên lame kính và đếm số lượng các nang noãn bắt màu đỏ đặc trưng của NR (nang noãn sống) và nang noãn không bắt màu dưới kính hiển vi quang học x200 (Hình 2).



**Hình 2. Mô buồng trứng sau nhuộm NR**

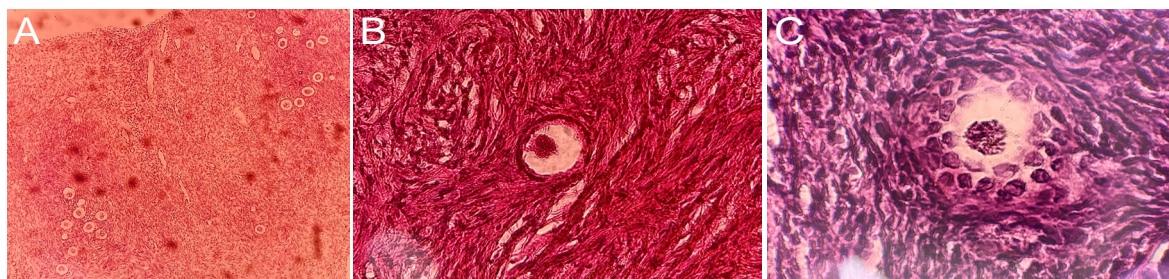
*Nang noãn sống bắt màu đỏ của NR*

*Nang noãn chết không bắt màu hoặc bắt màu đỏ của NR rất nhạt*

*Nhuộm Hematoxylin-Eosin (HE) và phân tích mô học*

Mô buồng trứng ở mỗi nhóm được cố định trong dung dịch Formalin 10% trong 12 - 24 giờ, sau đó được nhúng vào paraffin (56 - 580°C) để đúc khuôn trước khi cắt thành các lát mỏng với độ dày 10 $\mu$ m. Sau lát cắt đầu tiên, cứ lần lượt mỗi 3 lát cắt liên tiếp sẽ chọn lát cắt thứ 3 để nhuộm HE (theo quy trình xử lý mẫu giải phẫu bệnh của phòng xét nghiệm, Bệnh viện

Mỹ Đức). Hình thái của tế bào noãn và tế bào hạt quanh noãn (GCs - Granulosa cells) trong các nang noãn nguyên thủy (primordial follicles) và nang noãn sơ cấp (primary follicles) của mô được đánh giá dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại x200 (Hình 3). Các nang noãn được đánh giá hình thái của noãn và GCs trong 3 nhóm mô ở mỗi BN dưới kính hiển vi x200 và theo phân loại theo tiêu chí mô tả ở Hình 4.



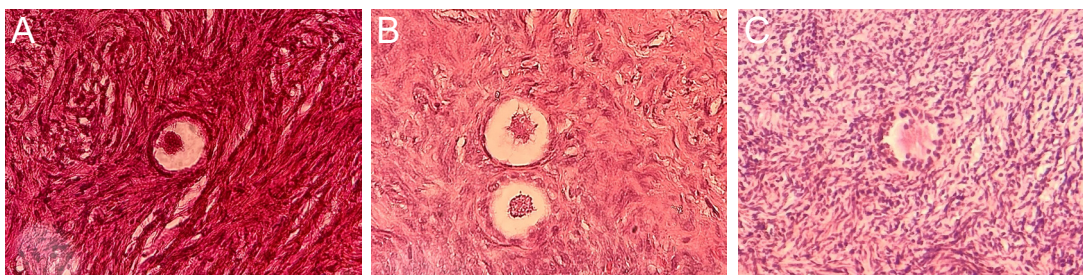
**Hình 3. Mô buồng trứng sau nhuộm HE**

*A: Các nang noãn tập trung ở vùng vỏ buồng trứng*

*B: Nang noãn nguyên thủy có đường kính 25-30  $\mu$ m, với 1 lớp tế bào GC dạng dẹt hay vảy bao quanh*

*C: Nang noãn sơ cấp có đường kính khoảng 100  $\mu$ m, với 1 lớp tế bào GC dạng khối bao quanh*





**Hình 4. Các hình thái khác nhau của nang noãn sau nhuộm NR**

*A: Nang noãn với cả noãn và GCs nguyên vẹn*

*B: Nang noãn có GCs tổn thương*

*C: Nang noãn với cả noãn và GCs tổn thương*

#### *Xử lý số liệu*

Số liệu được thu thập và phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm RR 4.3.0, trong đó, phép thử Conover post hoc được thực hiện theo sau phép thử Friedman. Ngưỡng khác biệt giữa nhóm 1 và hai nhóm 2, 3 được xác định khi xác suất thấp hơn 0,05 ( $p < 0,05$ ).

### **3. Đạo đức nghiên cứu**

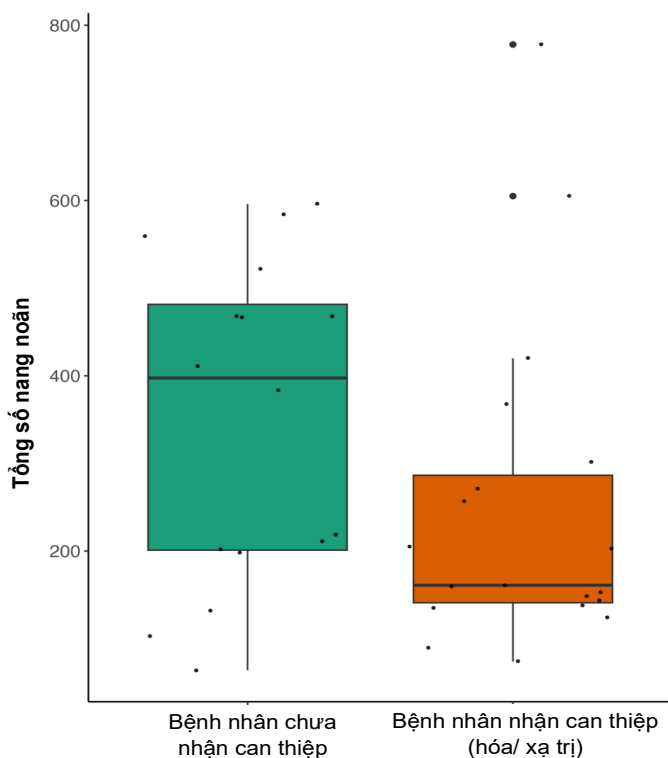
Nghiên cứu được chấp thuận bởi Hội đồng Đạo đức của Bệnh viện Mỹ Đức (quyết định 16/2020/MĐ-HĐĐĐ, tháng 11/09/2020). Tất cả bệnh nhân được cung cấp thông tin, giải đáp thắc mắc đầy đủ và đồng thuận tham gia nghiên cứu bằng văn bản.

### **III. KẾT QUẢ**

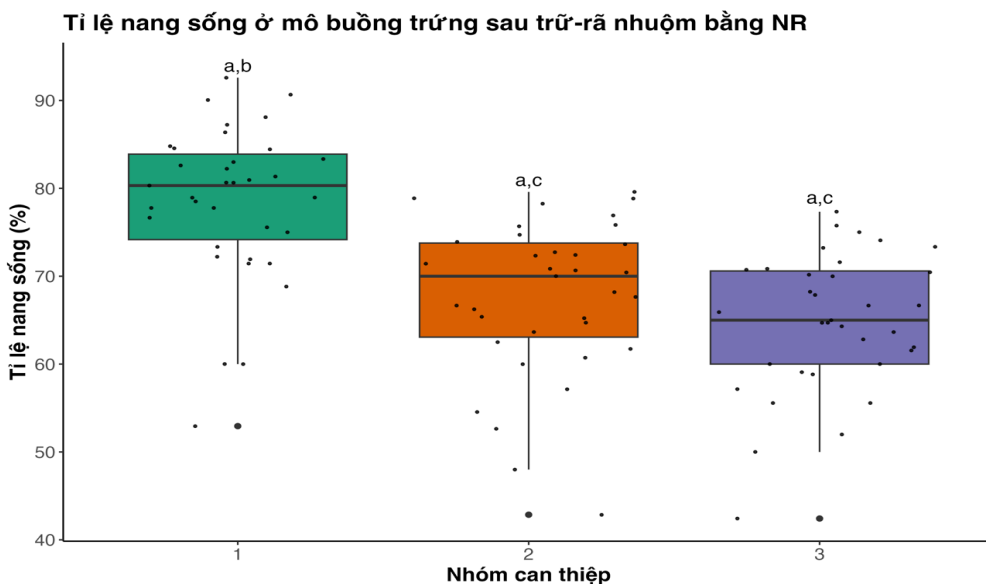
Mô buồng trứng được thu nhận từ 35 bệnh nhân (BN) ở độ tuổi trung bình  $37,5 \pm 4,92$ , phần lớn được thực hiện phẫu thuật cắt buồng trứng tại Bệnh viện Ung bướu TP. Hồ Chí Minh và một số ít được thực hiện tại Bệnh viện Mỹ Đức từ 2020 - 2023. Gần 50% bệnh nhân sử dụng các liệu pháp điều trị ung thư trước khi được chỉ định cắt buồng trứng (Bảng 1). Tổng nang noãn đếm được trong mỗi mảnh mô  $1 \times 1 \times 10 \text{mm}$  ở nhóm BN chưa nhận can thiệp của liệu pháp điều trị ung thư là 398 [201; 482] nang, nhiều hơn so với nhóm đã nhận can thiệp của liệu pháp điều trị ung thư là 161 [141; 286] nang, nhưng không có sự khác biệt về thống kê ( $p = 0,115$ ) (Biểu đồ 1).

**Bảng 1. Đặc điểm của bệnh nhân cho buồng trứng theo loại ung thư**

Loại ung thư	n = 35
Tuổi trung bình ( $\bar{x} \pm SD$ )	$37,5 \pm 4,92$
<i>Chẩn đoán, n (%)</i>	
Ung thư vú	3 (8,57%)
Ung thư vú đã hoá trị	15 (42,9%)
Ung thư vú đã xạ trị và hoá trị	2 (5,71%)
Ung thư cổ tử cung	7 (20,0%)
Ung thư nội mạc tử cung	8 (22,9%)



**Biểu đồ 1. Tổng số nang nóng ở hai nhóm bệnh nhân nhận và chưa nhận can thiệp của liệu pháp điều trị ung thư**



**Biểu đồ 2. Tỷ lệ nang sống ở các nhóm sau nhuộm NR**

*Phép thử Conover post hoc được thực hiện sau phép thử Friedman*

*a: khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm 1 và nhóm 2 ( $p < 0,05$ )*

*b: khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm 1 và nhóm 3 ( $p < 0,05$ )*

*c: khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm 2 và 3 ( $p < 0,05$ )*

### 1. Tỷ lệ sống của nang noãn sau nhuộm NR

Tổng số nang noãn trong đếm được trong 1 mảnh mô 1x1x10mm ở mỗi BN dao động từ 19 - 222 nang tùy vào tuổi của BN hoặc BN có nhận liệu pháp điều trị ung thư hay không. Tỷ lệ sống của nang noãn ở nhóm 1 (80,3% [74,2; 83,9] ) cao hơn đáng kể so với nhóm 2 (70,0% [63,1; 73,8] ) và nhóm 3 (65,0% [60,0; 70,6]), với  $p < 0,001$  (Biểu đồ 2).

### 2. Đánh giá hình thái nang noãn sau nhuộm HE

Trong 35 BN, sau rã đông, cả hai nhóm mô

đông lạnh có tỷ lệ nang noãn với noãn và GCs nguyên vẹn thấp hơn rất nhiều, lần lượt là 59,4% [56,7; 64,0] ở nhóm 2 và 58,3% [50,9; 61,1] ở nhóm 3, khi so sánh với nhóm 1 là 71,3% [61,3; 76,3] ( $p < 0,05$ ). Ngược lại, tỷ lệ nang noãn có cả tế bào noãn và GCs bị tổn thương trong hai nhóm 2 và 3 cao hơn rất nhiều so với nhóm 1, cụ thể, 17,4% [13,6; 22,6] ở nhóm 1; 25,0% [21,4; 28,5] ở nhóm 2 and 28,8% [21,8; 33,0] ở nhóm 3 ( $p < 0,05$ ) (Bảng 2). Trong khi đó, các tỷ lệ này tương đương giữa hai nhóm mô được đông lạnh - rã đông bằng hai môi trường khác nhau ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 2. Kết quả phân tích hình thái nang noãn sau nhuộm HE ở các nhóm**

% (nang noãn)	Nhóm 1 (n = 35)	Nhóm 2 (n = 35)	Nhóm 3 (n = 35)	p	P <sub>1-2</sub>	P <sub>1-3</sub>	P <sub>2-3</sub>
Cả tế bào noãn và GCs nguyên vẹn	71,3 [61,3; 76,3] (1349)	59,4 [56,7; 64,0] (1180)	58,3 [50,9; 61,1] (1096)	< 0,001	0,007	< 0,001	0,289
Tổn thương GCs	12,5 [9,69; 15,9] (217)	15,5 [11,3; 19,3] (304)	15,6 [11,0; 19,2] (307)	0,002	0,005	0,012	0,95
Cả tế bào noãn và GCs tổn thương	17,4 [13,6; 22,6] (347)	25,0 [21,4; 28,5] (462)	28,8 [21,8; 33,0] (484)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,21
Tổng	100 (1913)	100 (1946)	100 (1887)				

Phép thử Conover post hoc được thực hiện sau phép thử Friedman

$p_{1-2}$ : nhóm 2 so với nhóm 1

$p_{1-3}$ : nhóm 3 so với nhóm 1

$p_{2-3}$ : nhóm 2 so với nhóm 3

## IV. BÀN LUẬN

Hiện nay, nhiều quy trình thực hiện kỹ thuật OTC các nhau được giới thiệu và sử dụng trên thế giới với mục đích bảo tồn khả năng sinh sản của phụ nữ, trong đó phương pháp đông lạnh thủy tinh hoá đang tỏ ra là lựa chọn phù hợp trong OTC do không có yêu cầu nào về

thiết bị phải đầu tư tại các trung tâm IVF.<sup>8,9</sup> Phần lớn các nghiên cứu về OTC cũng chứng minh rằng tỷ lệ sống của nang noãn và khả năng phục hồi của mô buồng trứng thường thấp sau đông lạnh - rã đông do sự tổn thương của các nang noãn.<sup>5,10,13</sup> Bên cạnh đó, trong mô buồng trứng,

có nhiều nhóm tế bào khác nhau và cũng như nhiều giai đoạn phát triển khác nhau của nang noãn, tuy nhiên trong nghiên cứu này, nang noãn ở giai đoạn tiền hóc (cụ thể là nang noãn nguyên thủy và nang noãn sơ cấp) được chọn làm đối tượng để đánh giá, so sánh mô buồng trứng ở điều kiện trước và sau đông lạnh, do những nang noãn ở giai đoạn này được xem là nguồn nang noãn dự trữ tiềm năng trong bảo tồn khả năng sinh sản. Do đó, tỉ lệ sống của nang noãn sau nhuộm NR và hình thái của nang sau nhuộm HE được khảo sát và so sánh giữa nhóm mô tươi và hai nhóm mô đông lạnh - rã đông bằng phương pháp thủy tinh hoá.

Ở thí nghiệm nhuộm NR, dung dịch NR là dung dịch có màu đỏ đặc trưng, thường sử dụng để nhuộm tế bào sống. Về lý thuyết, NR không gây độc và ảnh hưởng đến khả năng sống tiếp tục của tế bào sau khi nhuộm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đếm các nang sống (nhuộm màu đỏ) ở cả 3 nhóm mô. Trung bình 80,3% nang noãn sống trong nhóm 1, cho thấy chất lượng của mô là tốt và ổn định sau quá trình thu nhận, vận chuyển và trước khi thực hiện thủy tinh hoá. So với mô trước khi đông lạnh, tỉ lệ sống của nang noãn ở hai nhóm thủy tinh hoá giảm đáng kể, kết quả tương tự cũng được báo cáo trong các nghiên cứu trước đó.<sup>4,8,14</sup> Tác động bất lợi của nhiệt độ thấp trong quá trình đông lạnh lên sức sống của nang noãn là không thể tránh khỏi và một lần nữa được chứng minh trong nghiên cứu của chúng tôi. Năm 2014, trong nghiên cứu của Langbeen và cộng sự trên mô buồng trứng bò, 90,5 ± 3% nang noãn sống sau NR trong nhóm chứng (mô tươi), trong khi tỉ lệ nang sống giảm đáng kể ở nhóm mô sau đông lạnh - rã đông (77 ± 6%) và nhóm mô được nuôi cấy ở ngày thứ 4 sau khi đông lạnh - rã đông (76 ± 9%), với  $p = 0,008$ .<sup>1,8</sup> Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy khoảng 10% số nang sống giảm ở 2 nhóm

mô thủy tinh hoá so với nhóm mô tươi. Sự khác nhau trong nghiên cứu của Langbeen và cộng sự so với nghiên cứu của chúng tôi là tác giả thực hiện nghiên cứu trên mô buồng trứng bò, và sử dụng nang noãn phân lập để trữ lạnh thay vì trữ lạnh mô buồng trứng, nên có thể không giống nhau về tỉ lệ nang noãn sống ở nhóm mô đầu vào của hai nghiên cứu. Tuy nhiên, kết quả của Langbeen và cộng sự cũng chứng minh việc mô sẽ giảm chất lượng rất nhiều sau đông lạnh và rã đông. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng ghi nhận chỉ 5% nang noãn sống giảm ở nhóm 3 so với nhóm 2, mặc dù về mặt thống kê thì sự khác biệt này có ý nghĩa, nhưng về mặt lâm sàng, tỉ lệ này có thể không ảnh hưởng đến chất lượng, cũng như sự phục hồi và phát triển của mô nếu được sử dụng tiếp tục.

Đối với kết quả khảo sát mô học sau nhuộm HE giữa nhóm mô không qua đông lạnh và qua đông lạnh, dựa trên các kết quả trong nghiên cứu của Wang và cộng sự năm 2016, 80% nang noãn có noãn và CGs đều nguyên vẹn ở nhóm mô tươi, trong khi tỉ lệ nang noãn có cả noãn và CGs đều nguyên vẹn chỉ đạt 56% ở nhóm mô thủy tinh hoá ( $p < 0,05$ ). Trong khi đó, tỉ lệ nang noãn có noãn và CGs đều tổn thương ở nhóm mô tươi là 2,1%, thấp hơn rất nhiều so với nhóm mô thủy tinh hoá (26%) ( $p < 0,05$ ). Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng thấy kết quả tương tự khi so sánh nhóm mô tươi và hai nhóm mô thủy tinh hoá. Kết quả cũng cho thấy trữ lạnh có lẽ không ảnh hưởng đến GCs, cụ thể không có sự khác biệt về tỉ lệ nang noãn chỉ tổn thương GCs giữa 3 nhóm. Dữ liệu của chúng tôi phân tích được tương đồng với các nghiên cứu trên động vật và trên người trước đó.<sup>8,13-15</sup> Hơn nữa, nghiên cứu này cũng chứng minh rằng không có sự khác nhau đáng kể về chất lượng của hai nhóm mô được đông lạnh - rã đông bằng hai quy trình thủy tinh hoá (bằng môi trường thương mại Ova kit Type M và môi



trường của IVFMD) tại trung tâm của chúng tôi. Trên thực tế, sự tăng tỉ lệ nang noãn bị tổn thương ít hay nhiều do tác động bất lợi của trữ lạnh đối với mô buồng trứng khác nhau ở các nghiên cứu về OTC từ trước đến nay, lý giải cho điều này là có lẽ tùy thuộc vào từng quy trình thủy tinh hoá khác nhau với tốc độ, thời gian đông lạnh và loại, nồng độ chất bảo vệ đông lạnh được sử dụng trong từng quy trình.<sup>5,9,13,16</sup>

## V. KẾT LUẬN

Với kết quả từ nghiên cứu này, chúng tôi đã thực hiện đông lạnh mô buồng trứng bằng phương pháp đông lạnh thủy tinh hoá với chất lượng mô buồng trứng sau rã đông tương đương với các nghiên cứu về OTC trên thế giới, và có thể áp dụng quy trình này vào thực tiễn. Đây là một kỹ thuật bảo tồn sinh sản hứa hẹn và cần sớm được triển khai tại Việt Nam nhằm mang lại cho phụ nữ trong độ tuổi sinh sản, và các bé gái vị thành niên hoặc chưa dậy thì không may mắc ung thư mà phải sử dụng các liệu pháp điều trị ung thư gây ảnh hưởng đến hoạt động / dự trữ của buồng trứng. Bên cạnh đó, với hai phương pháp được dùng để kiểm chứng chất lượng của mô buồng trứng sau đông lạnh, kết quả nhận được với tỉ lệ sống và tỉ lệ nguyên vẹn về hình thái của nang noãn tương đương nhau. Mặc dù không thể thay thế “tiêu chuẩn vàng” của kết quả mô sống bằng cấy ghép, nhưng hai phương pháp đánh giá đơn giản này hữu ích và có thể thực hiện được tại các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm mới triển khai chương trình OTC trong điều kiện Việt Nam để kiểm soát chất lượng của kỹ thuật OTC trước khi quyết định sử dụng mô sau rã đông cho bệnh nhân.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Leonel ECR, Lucci CM, Amorim CA. Cryopreservation of human ovarian

tissue: a review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2019;46:173-81. <https://doi.org/10.1159/000499054>

2. Rosendahl M, Schmidt KT, Ernst E, et al. Cryopreservation of ovarian tissue for a decade in Denmark: a view of technique. *Reprod Biomed Online*. 2015;22:162-171. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.10.015>

3. Radwan P, Abramik A, Wilczyński J, et al. Successful autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue with recovery of the ovarian function. *Ginekol Pol*. 2016;87:235-240. <https://doi.org/10.17772/gp/61981>

4. Kristensen SG, Rasmussen A, Byskov AG, et al. Isolation of pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue. *Hum Reprod*. 2011;26:157-66. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq318>

5. Kristensen SG, Liu Q, Mamsen LS, et al. A simple method to quantify follicle survival in cryopreservation human ovarian tissue. *Hum reprod*. 2018;33(12):2276-2284.

6. Chang HJ, Moon JH, Lee JR, et al. Optimal condition of vitrification method for cryopreservation of human ovarian cortical tissues. *J Obstet Gynaecol Res*. 2011;37:1092-1101.

7. Fabbri R, Vicenti R, Macciocca M, et al. Morphological, ultra-structural and functional imaging of frozen/thawed and vitrified/warmed human ovarian tissue retrieved from oncological patients. *Hum Reprod*. 2016;31:1838-1849.

8. Langbein A, Jorssen EPA, Granata N, et al. Effects of neutral red assisted viability assessment on the cryotolerance of isolated bovine preantral follicles. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(12):1727-1736.

9. Kagawa N, Silber S, Kuwayama M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *RBM Online*. 2009;18(4):568-577.

10. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32:1167-1170.
11. Lan NV, Vinh QD, Tuong MH, et al. IVF transfer of fresh or Frozen Embryos in Women without Polycystic Ovaries. *NEJM.* 2018;378(2):137-147. doi: 10.1056/NEJMoa1703768.
12. Kitazato. Ova Cryo Kit Protocol - Ovarian tissue vitrification method. [https://www.kitazato.co.jp/en/pdf/vitrification/Protocol-EN-OvaCryoKit\\_210601ver2.pdf](https://www.kitazato.co.jp/en/pdf/vitrification/Protocol-EN-OvaCryoKit_210601ver2.pdf).
13. Wang T, Yan J, Lu C, et al. human single follicle growth in invitro from cryopreserved ovarian tissue after slow freezing or vitrification. *Hum Reprod.* 2016;31(4):763-773.
14. Isachenko V, Lapidus I, Isachenko E, et al. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. *Reproduction.* 2009;138:319-327.
15. Campos ALM, Guedes JS, Rodrigues JK, et al. Comparison between slow freezing and vitrification in terms of ovarian tissue viability in a bovine model. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2016;38:333-339.
16. Ramezani M, Salehnia M, Jafarabadi M. Short term culture of vitrified human ovarian cortical tissue to assess the cryopreservation outcome: molecular and morphology analysis. *J reprod Infertil.* 2017;18(1):162-171.

## Summary

### OVARIAN TISSUE CRYOPRESERVATION BY VITRIFICATION METHOD: THE FIRST EXPERIENCE IN VIETNAM

Ovarian Tissue Cryopreservation (OTC) is a promising technique for reproductive preservation in women with cancer. Although this technique was applied successfully in many In Vitro Fertilization (IVF) centers worldwide, OTC has not been developed in Viet Nam as well as there is no publication of OTC in Vietnam. The study of OTC by vitrification at IVFMD, My Duc Hospital was conducted from 2020 to 2023 with trial registration number NCT04666376. Ovarian tissues from each patient were divided into 3 groups, in which group 1 was fresh tissues as a control group, group 2 was vitrified tissues by Ova kit Type M (Kitazato, Japan) and group 3 was vitrified tissues by IVFMD medium. The findings showed the rates of viable follicles and follicles with both healthy oocyte and CGs in group 2 and 3 were significantly lower than in group 1, at [80.3% in group 1, 70% in group 2 and 65% in group 3] and [71.3% in group 1, 59.4% in group 2 and 58.3% in group 3] respectively ( $p < 0.05$ ). The results aligned with previous findings because of the negative effects of cryopreservation. Moreover, it was illustrated that there was no change in the quality of tissue between the commercial medium and IVFMD's medium in OTC.

**Keywords:** Ovarian tissue cryopresvertion, OTC, vitrification.