

---

Keiji Kuroda  
Jan J. Brosens  
Siobhan Quenby  
Satoru Takeda  
Editors

***Chiến lược điều trị sảy  
thai tái phát và vô sinh  
không rõ căn nguyên***

## Lời nói đầu

Từ trường hợp thụ tinh trong ống nghiệm đầu tiên thành công vào năm 1978, trong vòng hơn nửa thế kỷ sau đó, chúng ta đã chứng kiến sự cải tiến mang tính bước ngoặt của các công nghệ hỗ trợ sinh sản. Vào khoảng năm 1990–1992, những đứa trẻ đầu tiên đã ra đời sau quá trình trữ đông phôi bằng phương pháp thủy tinh hóa và tiêm tinh trùng vào bào tương trứng; các nhà lâm sàng lúc đó đã tin tưởng rằng mọi nguyên nhân hiếm muộn đều có thể được giải quyết.

Theo thống kê, đã có hơn bảy triệu trẻ sơ sinh đã được sinh ra bằng phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm; tuy nhiên, tỷ lệ thành công của chúng chỉ khoảng 20–30% mỗi chu kỳ. Ở một số khu vực, sàng lọc bất thường di truyền tiền làm tổ (PGS), tức là xét nghiệm nhiễm sắc thể của phôi, ngày càng phổ biến, tuy nhiên tỷ lệ thành công của thụ tinh ống nghiệm sau khi PGS chỉ nằm ở mức dưới 70% cho mỗi lần chuyển phôi; do đó hơn 30% số trường hợp còn lại, nguyên nhân không bắt nguồn từ phôi. Ngoài ra, sảy thai liên tiếp (RM) cũng chưa thể tìm ra căn nguyên ở hơn 50% phụ nữ. Đối với người, tỷ lệ phôi bị hao hụt và sảy thai là khá cao khi so sánh với các loài khác trong giới động vật. Điều đáng tiếc hơn là nhiều trường hợp trong số đó không phát hiện ra nguyên nhân. Do đó, các bác sĩ phụ khoa thường chỉ có thể đưa ra các phương pháp điều trị cơ bản đối với sảy thai/vô sinh nói chung; hoặc thậm chí ngừng điều trị vì họ không thể phát hiện ra nguyên nhân. Việc này tạo ra gánh nặng nghiêm trọng về tài chính, thể chất và tinh thần cho các cặp vợ chồng đang điều trị.

Tuy nhiên, những nguyên nhân này đang dần được hé lộ dựa trên kết quả của các nghiên cứu có sự phối hợp chặt chẽ giữa y học lâm sàng và nghiên cứu hàn lâm. Chúng tôi hy vọng rằng cuốn sách này sẽ cung cấp các giải pháp cho các nhà lâm sàng trong việc đánh giá và xử trí các trường hợp vô sinh không rõ căn nguyên.

Tokyo, Japan  
Tokyo, Japan

Keiji Kuroda  
Satoru Takeda

# Mục lục

## Phần I .Vô sinh không rõ căn nguyên

<b>1</b>	<b>Dẫn nhập</b> .....	<b>3</b>
	<i>Keiji Kuroda</i>	
<b>2</b>	<b>Thụ tinh thất bại</b> .....	<b>7</b>
	<i>Takashi Yamaguchi, Keiji Kuroda, Atsushi Tanaka, và Seiji Watanabe</i>	
<b>3</b>	<b>Bất thường chức năng vòi tử cung không do tắc</b> .....	<b>21</b>
	<i>Yuko Ikemoto, Keiji Kuroda, Yasushi Kuribayashi, và Masato Inoue</i>	
<b>4</b>	<b>Thất bại làm tổ phần 1: Các bất thường buồng tử cung và quá trình đồng bộ niêm mạc tử cung – phôi sau cấy ghép</b> .....	<b>38</b>
	<i>Keiji Kuroda và Satoko Yamashita</i>	
<b>5</b>	<b>Thất bại làm tổ phần 2: Điều biến miễn dịch điều trị bệnh nhân thất bại cấy ghép liên tiếp</b> .....	<b>53</b>
	<i>Koji Nakagawa và Rikikazu Sugiyama</i>	
<b>6</b>	<b>Vô sinh không rõ căn nguyên: Chiến lược điều trị</b> .....	<b>73</b>
	<i>Keiji Kuroda và Asako Ochiai</i>	

## Phần II .Sảy thai tái phát không rõ căn nguyên

<b>7</b>	<b>Dẫn nhập</b> .....	<b>96</b>
	<i>Keiji Kuroda</i>	
<b>8</b>	<b>Kết quả thử nghiệm lâm sàng sảy thai tái phát không rõ căn nguyên</b> .....	<b>105</b>
	<i>Keiji Kuroda</i>	
<b>9</b>	<b>Ảnh hưởng của lối sống tới khả năng thụ thai</b> .....	<b>119</b>
	<i>Keiji Kuroda</i>	

<b>10</b>	<b>Bất thường chức năng màng rụng</b> .....	<b>130</b>
	<i>Keisuke Murakami, Keiji Kuroda, và Jan J. Brosens</i>	
<b>11</b>	<b>Chiến lược điều trị sảy thai tái phát không rõ căn nguyên</b> .....	<b>143</b>
	<i>Keiji Kuroda</i>	

**Phần I**  
**Vô sinh không rõ căn nguyên**

# Chương 1

## Dẫn nhập

# 1

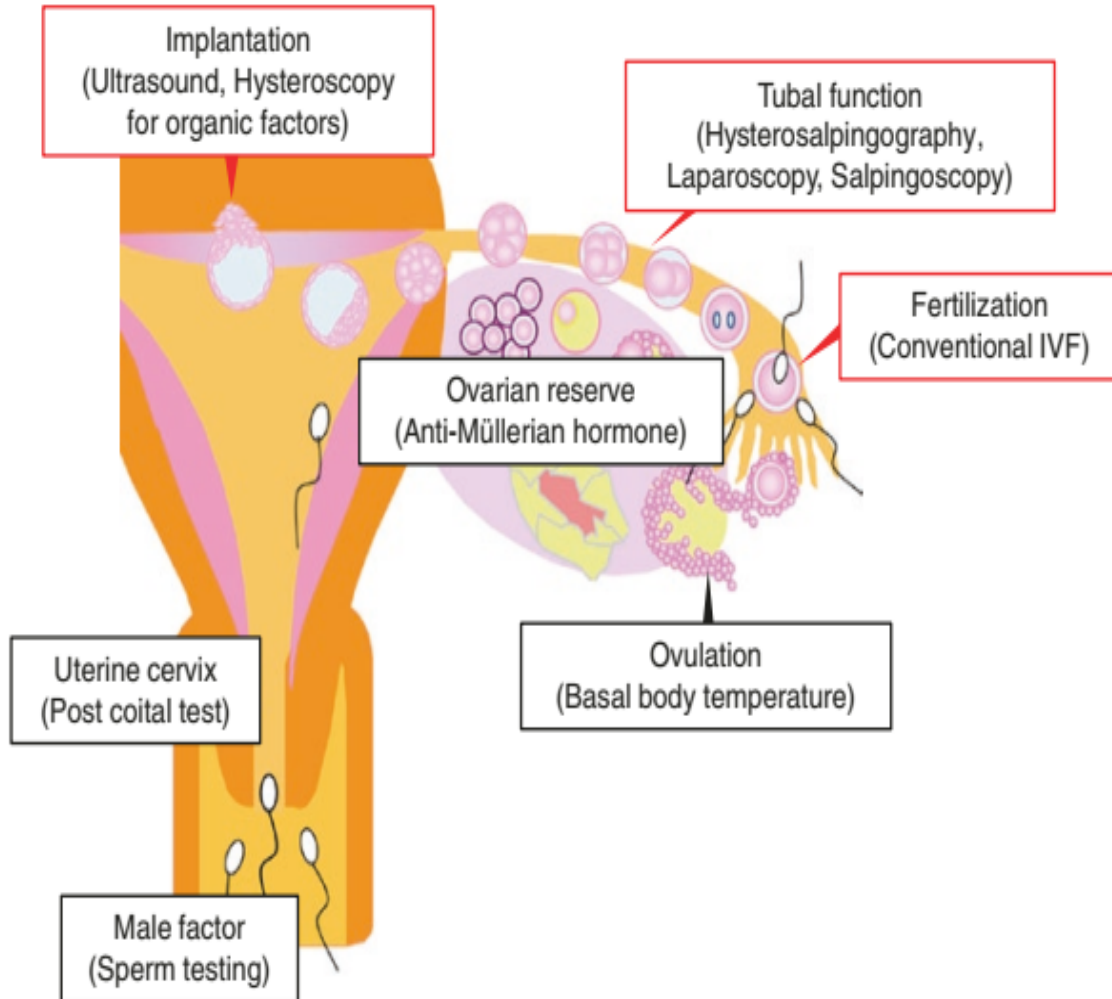
*Keiji Kuroda*

**Tóm tắt** Trong số các cặp vợ chồng hiếm muộn, có khoảng 15–30% số ca được chẩn đoán vô sinh không rõ nguyên nhân sau khi thực hiện các xét nghiệm cơ bản. Những cặp vợ chồng này thụ thai không thành công có thể do ngẫu nhiên hoặc do các nguyên nhân chưa xác định được như (1) rối loạn chức năng ống dẫn trứng không do tắc, (2) Thụ tinh thất bại và (3) Thất bại làm tổ mặc dù không có tổn thương thực thể. Nếu thời gian vô sinh từ 2 năm trở lên thì có khả năng cao là vô căn. Đôi khi rất khó để giải quyết các lý do gây vô sinh bằng cách giao hợp đúng lúc hoặc bơm tinh trùng vào buồng tử cung. Do đó, nên điều trị vô sinh tích cực, bao gồm cả thụ tinh trong ống nghiệm.

**Từ khóa** Vô sinh không rõ căn nguyên (UI) • Rối loạn chức năng vòi tử cung • Thụ tinh thất bại • Thất bại làm tổ • Thụ tinh trong ống nghiệm (IVF)

Ở người, thụ thai thành công cần trải qua nhiều quá trình, từ sự ‘gặp gỡ’ giữa tinh trùng và trứng, sự thụ tinh, sự phát triển của phôi thai và quá trình làm tổ của phôi trên màng rụng. Khả năng sinh sản có thể được đánh giá bằng tỷ lệ sinh sản tháng, tức là xác suất có thai trong một chu kỳ kinh nguyệt. So với các loài động vật có vú khác, tỷ lệ sinh sản trung bình hàng tháng của con người là cực kỳ thấp, ở mức 20%. Do đó, xác suất thụ thai tích lũy của các cặp vợ chồng có khả năng sinh sản bình thường lần lượt là 70–80%, 90–95% và 100% ở các tháng thứ 6, 12 và 24 [1]. Vô sinh, với tỷ lệ 1/7 trên tổng số cặp vợ chồng, được định nghĩa là tình trạng không có khả năng mang thai sau 1 năm giao hợp thường xuyên không sử dụng các biện pháp tránh thai. Nguyên nhân của vô sinh rất đa dạng, bao gồm bất thường số lượng tinh trùng, rối loạn khả năng rụng trứng, tắc hoặc tổn thương ống dẫn trứng và lạc nội mạc tử cung (Hình 1.1). Vô sinh không rõ căn nguyên được chẩn đoán khi không tìm thấy nguyên nhân cụ thể (gây vô sinh ở khoảng 15–30% các cặp vợ chồng) sau khi đã khảo sát khả năng sinh sản tổng quát, bao gồm chụp buồng tử cung – vòi trứng, xác nhận khả năng rụng trứng, đánh giá nồng độ hormone kháng Müllerian trong huyết thanh (khả năng dự trữ buồng

trứng), xét nghiệm sau giao hợp và xét nghiệm tinh trùng [2, 3].



Implantation(Ultrasound, Hysteroscopyfor organic factors): Làm tổ (Siêu âm và nội soi tử cung đánh giá tổn thương thực thể)

Tubal function(Hysterosalpingography,Laparoscopy, Salpingoscopy- Chức năng vòi tử cung (Chụp tử cung – vòi trứng, nội soi ổ bụng, nội soi vòi trứng)

Ovarian reserve(Anti-Müllerian hormone): Dữ trữ buồng trứng (Anti-Müllerian hormone)

Fertilization(Conventional IVF): Thụ tinh (IVF quy ước)

Uterine cervix (Post coital test): Cổ tử cung (Test sau giao hợp)

Ovulation (Basal body temperature): Rụng trứng(Thân nhiệt căn bản)

Male factor (Sperm testing): Yếu tố nam (Test tinh trùng)

*Hình. 1.1 Nguyên nhân của vô sinh và các xét nghiệm để xác định chúng. Rất khó để đánh giá được khả năng vận chuyển giao tử và phôi của vòi tử cung, khả năng thu noãn, thụ tinh và làm tổ bằng các xét nghiệm cơ bản (nguyên nhân gây vô sinh trong khung màu đỏ)*

Khả năng sinh sản của phụ nữ giảm dần theo tuổi. Do đó, một số phụ nữ hiếm muộn tuổi cao có thể không thụ thai được, nhưng không được quyền chẩn đoán UI vì chúng chỉ được xác nhận sau khi đã thực hiện đầy đủ các xét nghiệm cơ bản [4]. Các nguyên nhân chưa được phát hiện của vô sinh có thể là do rối loạn ống dẫn trứng trong quá trình vận chuyển giao tử và phôi, tinh trùng không thể đi qua khớp nối tử cung – vòi trứng, rối loạn chức năng tua vòi, thụ tinh thất bại, rối loạn phát triển phôi và làm tổ thất bại (Hình 1.2). Tuy nhiên, thường thì bệnh nhân mắc UI là do có vấn đề trong khâu hình thành giao tử (trứng + tinh trùng) và khâu làm tổ. Do đó, họ không thể chỉ điều trị bằng các liệu pháp cơ bản như giao hợp đúng thời điểm hay tiêm tinh trùng vào buồng tử cung (IUI).

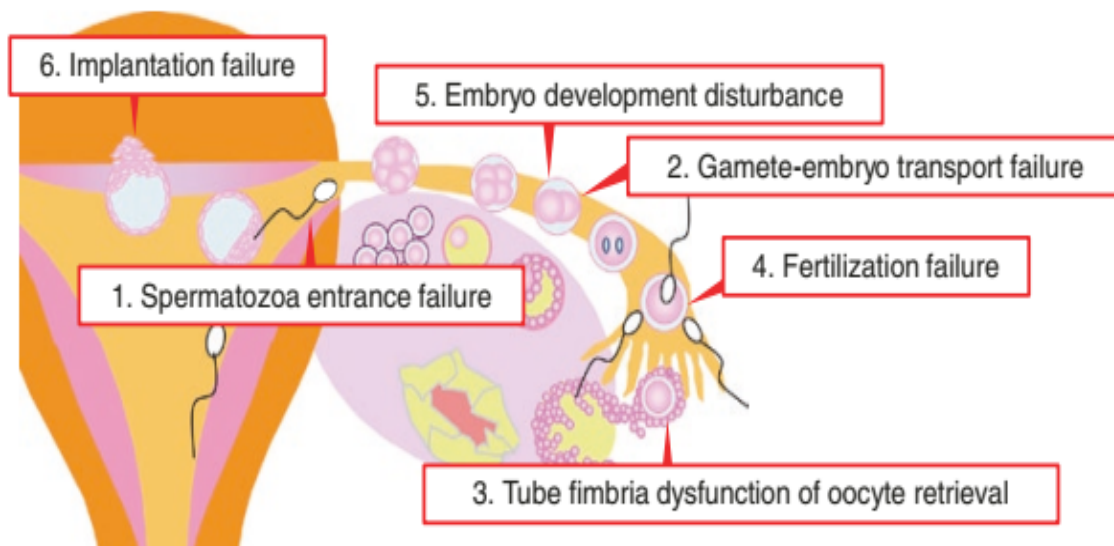
Nếu một phụ nữ mắc UI còn trẻ và chưa có thai trong vòng  $\leq 2$  năm, thì có thể là do ngẫu nhiên. Do đó, các hướng dẫn của Viện Sức khỏe và Lâm sàng Quốc gia (NICE) khuyến nghị chỉ cần điều trị vô sinh bằng các liệu pháp cơ bản. Nếu thời gian vô sinh từ 2 năm trở lên thì người bệnh có khả năng cao do yếu tố vô sinh không phát hiện được. Lúc này, vô sinh sẽ không thể giải quyết bằng giao hợp đúng thời điểm hoặc IUI. Do đó, hướng dẫn của NICE khuyến nghị áp dụng hỗ trợ sinh sản (ART), bao gồm cả IVF [2]. Ngay sau lần áp dụng các liệu pháp cơ bản không thành công, bác sĩ phụ khoa nên đặt ra nghi ngờ về tình trạng vô sinh của bệnh nhân.

Họ nên tìm cách giải thích tại sao bệnh nhân không thể thụ thai và tư vấn cho họ về các liệu pháp điều trị vô sinh tích cực, bao gồm cả ART. Nguyên nhân của UI thường được tìm thấy trong quá trình điều trị ART.

Một số trường hợp UI rất khó giải quyết ngay cả khi các cặp vợ chồng điều trị ART. Trong cuốn sách này, chúng tôi sẽ chứng minh các trường hợp UI đều thuộc ít nhất 1 trong 3 nhóm sau:

(1) Rối loạn chức năng ống dẫn trứng không do tắc, (2) Thụ tinh thất bại (3) Thất bại làm tổ khi không có tổn thương thực thể. Qua đó, chúng tôi mong rằng các quý đồng nghiệp có thể nâng cao kiến thức về UI và từ đây đưa ra được các phương pháp điều trị vô sinh tối ưu.





- 6. Implantation failure: Thất bại làm tổ
- 5. Embryo development disturbance: Rối loạn phát triển phôi
- 4. Fertilization failure: Thất bại thụ tinh
- 3. Tube fimbria dysfunction of oocyte retrieval: Rối loạn chức năng tua vòi => không thu noãn
- 2. Gamete-embryo transport failure: Thất bại vận chuyển giao tử/phôi
- 1. Spermatozoa entrance failure: Bất thường di chuyển của TT

*Hình. 1.2 Nguyên nhân yếu tố nam/nữ ở những bệnh nhân UI. UI được định nghĩa là tình trạng mang thai không thành công do các nguyên nhân mà xét nghiệm sinh sản tổng quát không phát hiện được. Các nguyên nhân như tinh trùng không vượt qua ngã ba tử cung – vòi trứng, thất bại trong quá trình vận chuyển giao tử và phôi, rối loạn chức năng tua vòi, thụ tinh thất bại, rối loạn phát triển phôi và thất bại làm tổ.*

### **Tài liệu tham khảo**

- 1. Evers JLH. Female subfertility. Lancet. 2002;360:151–9.
- 2. NICE. National Institute for Health and Clinical Excellence. National Collaborating Centre for Women’s and Children’s Health. Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems 2013;156:63.
- 3. Practice Comm Amer Soc Reprod M. Effectiveness and treatment for unexplained infertility. Fertil Steril. 2006;86:S111–4.
- 4. Somigliana EPA, Busnelli A, Filippi F, Pagliardini L, Vignani P, Vercellini P. Age-related infertility and unexplained infertility: an intricate clinical dilemma. Hum Reprod. 2016;31:1390–6.

# Chương 2

## Thụ tinh thất bại

# 2

*Takashi Yamaguchi, Keiji Kuroda, Atsushi Tanaka, and Seiji Watanabe*

**Tóm tắt** Giai đoạn đầu của quá trình thụ tinh là sự kết hợp ở cấp độ tế bào giữa tinh trùng và trứng, theo nghĩa hẹp thì chính là định nghĩa sự thụ tinh. Trong trứng chưa được thụ tinh, quá trình phân bào giảm nhiễm sẽ bị dừng lại ở một giai đoạn nhất định tùy thuộc mỗi loài. Tuy nhiên, giai đoạn sớm của quá trình thụ tinh sẽ 'kích hoạt' phân bào giảm nhiễm của TB trứng. Hiện tượng này được gọi là hoạt hóa noãn (OA); chúng xảy ra cho phép chu kỳ giảm phân được hoàn thành, và sau đó các tiền nhân đực và cái sẽ được hình thành. Sự hợp nhất của bộ gen nam và nữ (syngamy) sẽ kết thúc quá trình thụ tinh. Mặt khác, quá trình thụ tinh sẽ không thành công/kết thúc nếu trứng hoặc tinh trùng có bất thường. Do đó, phương pháp vi thụ tinh (tiêm tinh trùng vào bào tương trứng, ICSI) ra đời với tỉ lệ thành công cao. Tuy nhiên, có nhiều trường hợp hợp không thể thụ tinh ngay cả khi thực hiện ICSI. Trong những trường hợp vô sinh nghiêm trọng như vậy, việc kích hoạt nhân tạo tế bào trứng là một trong những giải pháp khả thi. Do đó, chúng tôi đã thực hiện đánh giá tính hiệu quả của các phương pháp kích hoạt buồng trứng khác nhau từ cả hai khía cạnh là tế bào học (tạo phôi) và sinh hóa (đáp ứng  $Ca^{2+}$  + nội bào).

**Từ khóa** Thụ tinh thất bại • Tế bào trứng • Hoạt hóa noãn • Phospholipase C zeta (PLC $\zeta$ ) •  $Ca^{2+}$  oscillations • Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) • Hỗ trợ hoạt hóa noãn

### 2.1 Dẫn nhập

Tế bào trứng trưởng thành đã phóng được bao bọc bởi các lớp màng trong suốt (ZP) và lớp tế bào nang (cumulus); giảm phân bị dừng lại ở lần phân chia thứ hai cho đến khi có sự xâm nhập của tinh trùng [1]. Tinh trùng đến được với trứng sẽ đi qua lớp chất nền axit hyaluronic bao quanh trứng và gắn với ZP. Tinh trùng đã đi qua ZP sẽ hợp nhất với màng tế bào của noãn và được đưa vào tế bào chất của chúng. Sự xâm nhập của tinh trùng tạo ra phản ứng bề mặt của noãn và kích hoạt tái khởi động giảm phân. Ở trứng trưởng thành, các hạt bề mặt chứa enzym được phân bố ngay dưới màng tế bào, các hạt này sẽ bị phá vỡ và giải phóng ra ở

vùng quanh hoàng thể khi có phản ứng bề mặt. Enzyme được giải phóng loại bỏ một số chuỗi đường khỏi glycoprotein của ZP, gây biến tính protein. Ngay sau đó, sự di chuyển và xâm nhập của tinh trùng đến ZP bị ức chế. Màng tế bào trứng cũng thay đổi khiến tinh trùng khác không thể hợp nhất với chúng. Những thay đổi này được gọi là phản ứng zona (zona reaction) và sự thay đổi trong lớp vỏ của TB trứng sẽ giúp ngăn cản hiện tượng đa thụ tinh [2].

Mặt khác, quá trình thụ tinh sẽ không được hoàn thành nếu khả năng sinh sản của trứng hoặc tinh trùng bị suy giảm. Sự cải thiện tỷ lệ thụ tinh bằng phương pháp vi thụ tinh (phương pháp tiêm tinh trùng vào tế bào chất, ICSI) là đáng chú ý; tuy nhiên, có nhiều trường hợp không đạt được sự thụ tinh ngay cả khi đã thực hiện ICSI [3]. Có những trường hợp xác suất thụ tinh thành công chỉ từ 25% trở xuống mặc dù chất lượng trứng vẫn bình thường [4–6]. Trong những trường hợp vô sinh nghiêm trọng như vậy, kích hoạt noãn nhân tạo là một trong những giải pháp khả thi. Do đó, chúng tôi đã thực hiện đánh giá hiệu quả của các phương pháp kích hoạt noãn khác nhau từ cả hai khía cạnh đánh giá tế bào học (tạo phôi) và đánh giá sinh hóa (phản ứng  $Ca^{2+}$  + nội bào).

## 2.2 Thụ tinh thất bại

Khả năng di chuyển, trưởng thành và phản ứng cực đầu của tinh trùng là những yếu tố quan trọng góp phần vào thành công của IVF; tuy nhiên những yếu tố này không còn quan trọng đối với bệnh nhân thực hiện ICSI. Sự xuất hiện thể cực hai và tiền nhân là những yếu tố báo hiệu một trường hợp thụ tinh thành công. Ngay cả trong trường hợp tế bào tinh tròn và tế bào tinh chưa trưởng thành, quá trình thụ tinh vẫn thành công khi noãn được hoạt hóa nhân tạo [7, 8].

Nguyên nhân của các rối loạn sinh sản có thể được chia thành các trường hợp xuất phát từ bản thân giao tử và vi môi trường xung quanh giao tử. Đầu tiên là số lượng và chất lượng của giao tử, và thứ hai là vấn đề về vi môi trường ở bên trong đường sinh dục nữ. Khi chúng ta xem xét các nguyên nhân vô sinh thì các căn nguyên liên quan đến tinh trùng như quá trình sinh tinh, biệt hóa tinh bào, các điều kiện bên trong cơ quan sinh dục nữ, thành phần hóa học của dịch ống dẫn trứng bao quanh các tế bào nang, tương tác với ZP, hợp nhất màng tế bào và hoạt hóa noãn là những vấn đề thường gặp.

Còn liên quan đến nguyên nhân gây vô sinh do trứng thì dự trữ buồng trứng, quá trình sinh trứng, nhân tế bào trứng và sự 'trưởng thành' của các thành phần tế bào chất, bản chất của ZP, hợp nhất màng tế bào, khả năng tự hoạt hóa noãn để tiếp tục quá trình giảm phân sau khi tinh

trùng xâm nhập và những quá trình thúc đẩy việc hợp nhất nhân tế bào lại là những vấn đề cần quan tâm.

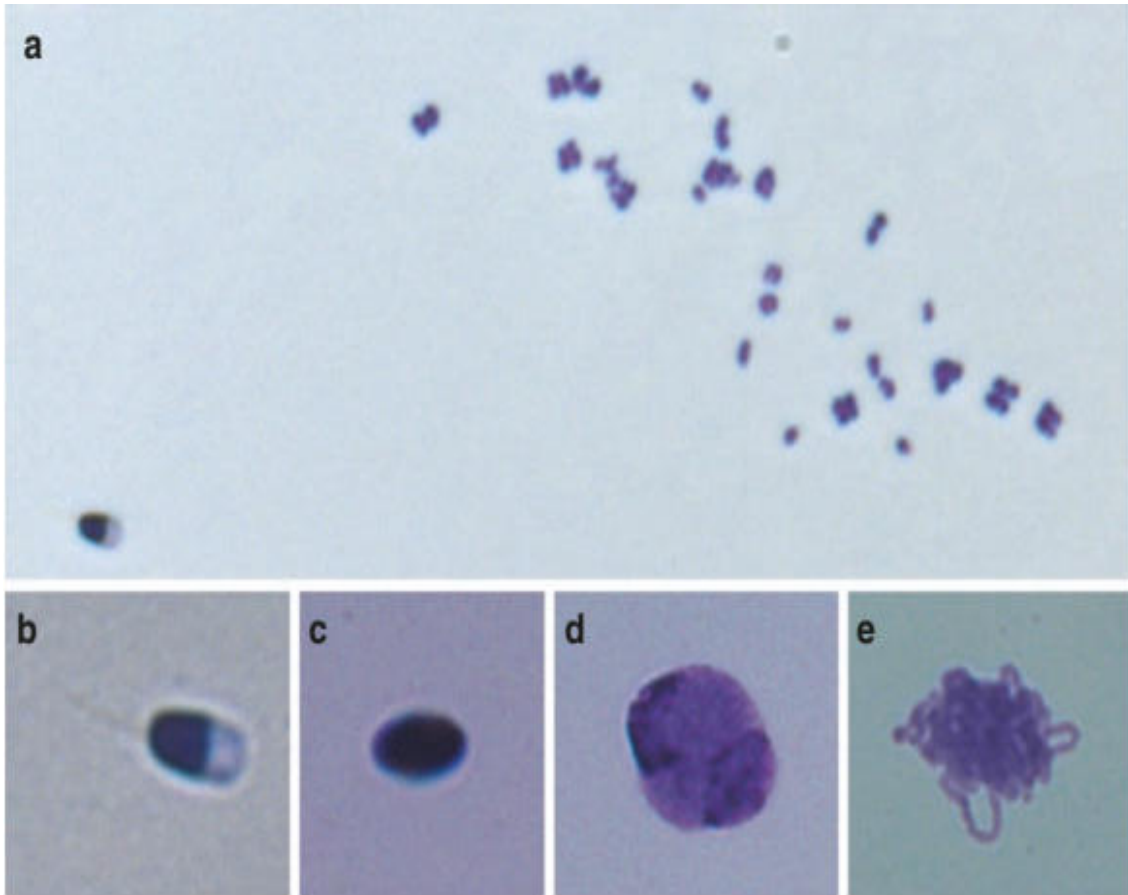
Ở đây chúng tôi tập trung vào những gì xảy ra khi thực hiện ICSI trên các tế bào trứng mà không hình thành tiền nhân. Từ phía tinh trùng, hiện tượng này ám chỉ sự thiếu hụt hoặc không đủ yếu tố tinh trùng để bắt đầu quá trình hoạt hóa noãn. Còn từ phía trứng, thất bại là do việc hoạt hóa noãn phụ thuộc vào tín hiệu nội bào được kích hoạt bởi các yếu tố tinh trùng không xảy ra.

## 2.3 Chiến lược điều trị cho trường hợp thụ tinh thất bại

### 2.3.1 Tiêm tinh trùng vào bào tương trứng (ICSI)

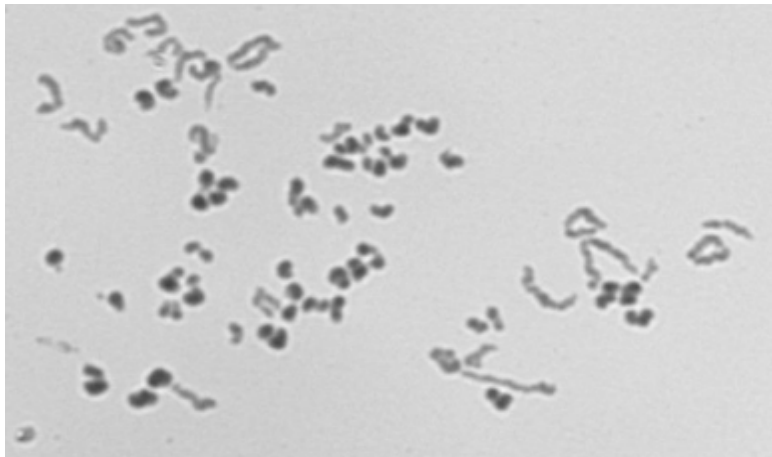
Trong điều trị vô sinh, một trong những phương pháp điều trị yếu tố nam tốt nhất là tiêm trực tiếp một tinh trùng vào bào tương trứng, được gọi là ICSI. Kỹ thuật ICSI hiện nay rất tiên tiến nên tỷ lệ thụ tinh thành công cao (khoảng 70–80%) [3]. Tuy nhiên, có khoảng 1–5% số trường hợp thực hiện ICSI nhưng không có trứng nào được thụ tinh [9, 10]. Điều này có thể là do sự thụ tinh của tế bào trứng không thành công. Để xác định lý do thụ tinh thất bại sau ICSI, chúng tôi đã cố gắng phân tích di truyền tế bào của những TB trứng không hình thành tiền nhân sau 12 giờ thụ tinh bằng phương pháp **gradual fixation-air drying**.

Trong số 92 tế bào trứng được kiểm tra, 84 (91,3%) vẫn ở giai đoạn kỳ giữa của giảm phân II (MII), cho thấy rằng quá trình hoạt hóa noãn chưa xảy ra ngay cả 12 giờ sau ICSI (Hình 2.1). Nhân tinh trùng được tìm thấy trong tế bào chất của tế bào trứng chưa hoạt hóa được phân chia thành bốn loại dựa trên mức độ giảm kết đặc của DNA (Hình. 2.1b-e). Nhóm đầu tiên bao gồm các đầu tinh trùng với màng sinh chất bao quanh nhân còn nguyên vẹn (Hình. 2.1a - c). Nhân ở đầu tinh trùng như vậy bị nhuộm thành màu tím đậm, và thỉnh thoảng có thể tìm thấy đuôi tinh trùng và mũ cực đầu tinh trùng. Trong những tinh trùng còn nguyên vẹn này, màng sinh chất còn lại có thể ngăn cản yếu tố tinh trùng được phóng ra ngoài tế bào chất. Do đó, có những trường hợp màng tinh trùng không bị thoái triển trong tế bào chất của trứng mặc dù đã áp dụng thao tác cố định. Trong ba nhóm còn lại, tế bào trứng dường như là nguyên nhân dẫn đến sự thất bại trong quá trình thụ tinh. Nhóm thứ hai bao gồm các đầu tinh trùng hình cầu với các nhân tích nước (hình tròn) được giải phóng vào khoang tế bào chất và được nhuộm màu tím nhạt (Hình 2.1d). Hiện tượng này là kết quả của sự phân ly các liên kết protamine disulfide cho phép DNA của tinh trùng kết tụ lại với nhau. Nhóm thứ ba là trường hợp xuất hiện một khối nhiễm sắc kết đặc (Hình. 2.1e). *Yếu tố kìm tế bào có trong tế bào chất của noãn bào MII buộc DNA của tinh trùng kết tụ thành các sợi nhiễm sắc mỏng thay thế protamine bằng histone sinh dưỡng*. Các sợi nhiễm sắc kết đặc chưa trưởng thành (PCC) thường có vẻ mỏng hơn các sợi được sao chép trong pha S. Nhóm thứ tư được tạo nên từ các PCC, trong đó tâm động và các nhánh của nhiễm sắc thể có thể được phân biệt dưới kính hiển vi ánh sáng (Hình. 2.2).



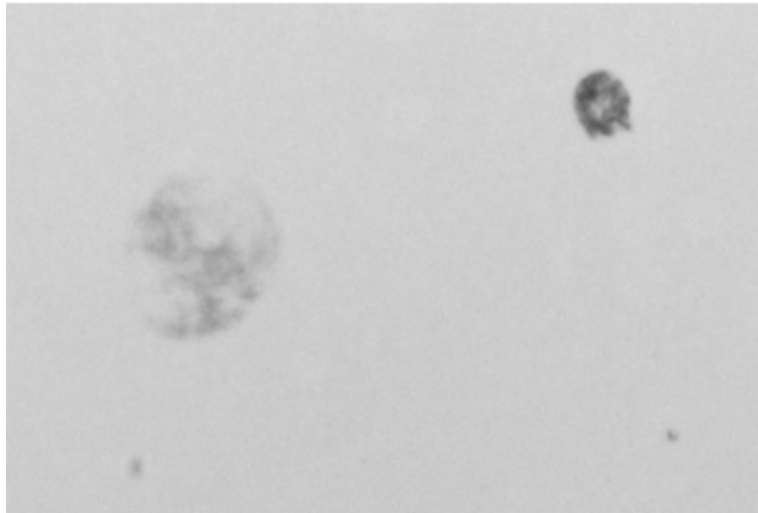
**Hình. 2.1** Đầu tinh trùng được tìm thấy trong các tế bào trứng sau ICSI. Đây là những trường hợp không thể tạo thành tiền nhân trong ngày đầu tiên. (a) Hai mươi ba nhiễm sắc thể được mang bởi một tinh trùng có đầu và đuôi đầy đủ (b) Tinh trùng được tìm thấy trong tế bào chất. (c) Nhân tinh trùng được giải phóng khỏi màng tế bào (d) Nhân tinh trùng phình to (e) Khối nhiễm sắc kết tụ (bar = 5  $\mu$ m)

**Hình. 2.2** Nhiễm sắc thể kết đặc chưa trưởng thành có nguồn gốc từ nhiễm sắc thể của tinh trùng và trứng sau giảm phân (vật kính  $\times 1000$ ). Dải nhiễm sắc thể mỏng của tinh trùng (mũi tên) và nhiễm sắc thể của tế bào trứng ở kỳ giữa giảm phân II, bao gồm hai nhiễm sắc thể chị em tương đồng (đầu mũi tên)



Mặt khác, sự hình thành tiền nhân chứng tỏ rằng đã có sự hoạt hóa noãn. Chúng ta có thể quan sát thấy chúng một số tế bào trứng sau khi nhuộm Giemsa, mặc dù trước đó thì không (kính hiển vi nền sáng). Trong tế bào trứng có một tiền nhân, người ta quan sát thấy một khối PCC có nguồn gốc từ nhân tinh trùng. Các tế bào trứng với tiền nhân lớn là nhân TB trứng và tiền nhân nhỏ là từ nhân tinh trùng (Hình 2.3). Kết quả phân tích được tóm tắt trong Bảng 2.1. Dữ liệu cho thấy nguyên nhân chính của việc thất bại trong điều trị ICSI là do hoạt động hoạt hóa noãn có vấn đề. Do đó, những tế bào trứng này cần điều trị để có thể thụ tinh.

**Hình. 2.3** Hai tiền nhân tích hợp trong tế bào trứng đã được thụ tinh sau ICSI (vật kính x 400). Tiền nhân lớn (cái) và tiền nhân nhỏ (đực) được quan sát thấy ở TB trứng sau khi đã cố định và nhuộm bằng Giemsa 2%, mặc dù trên kính hiển vi nền sáng chưa quan sát thấy.



	N	%
Số lượng trứng phân tích	90	
Số lượng trứng bất hoạt (Giảm phân, kỳ giữa II)	84	93.3
1. Tinh trùng nguyên vẹn	12	13.3
2. Tinh trùng phình đầu	7	7.8
3. Nhiễm sắc thể kết đặc	49	54.4
4. PCC	16	17.7
Số lượng trứng hoạt hóa	6	6.7

**Bảng 2.1** Kết quả phân tích di truyền tế bào trong TB trứng đã thực hiện ICSI mà không quan sát thấy tiền nhân trên kính hiển vi

### **2.3.2 Hỗ trợ hoạt hóa noãn/Hoạt hóa noãn nhân tạo (AOA)**

Sự xâm nhập của tinh trùng hình thành một dòng chuyển vận ion  $Ca^{2+}$  (oscillations), là sự gia tăng thoáng qua lặp đi lặp lại của nồng độ ion canxi trong tế bào chất của trứng. Như trong **Hình. 2.4c**, quy trình ICSI cũng tạo ra một loạt các ‘dao động’ nồng độ ion  $Ca^{2+}$  như khi thực hiện IVF thông thường. Chính sự dao động này đã kích hoạt noãn bào 2 tiếp tục giảm phân để hình thành noãn chín. Hiện tượng này được gọi là hoạt hóa noãn; nhiệm vụ thể phân tách và chuyển tiếp tới kỳ sau của lần phân bào 2 và giải phóng thể cực thứ hai, dẫn đến hình thành tiền nhân đực và tiền nhân cái (PN), đồng thời bước vào giai đoạn phân cắt phôi. Mỗi ‘nhịp’ dao động của ion  $Ca^{2+}$  nội bào là kết quả của việc giải phóng  $Ca^{2+}$  từ lưới nội chất thông qua thụ thể inositol 1,4,5-trisphosphat (IP3) [11–14]. ‘Dao động’  $Ca^{2+}$  được kích hoạt bởi yếu tố tinh trùng (được giải phóng từ tế bào chất) trong quá trình hợp nhất tinh trùng-trứng [15]. Bằng chứng chỉ ra rằng isozyme đặc hiệu cho tinh trùng “zeta” của enzyme phospholipase C zeta sản xuất IP3 (PLC $\zeta$ ) là ứng cử viên sáng giá nhất cho vai trò ‘yếu tố tinh trùng’ [12, 16–18]. Việc loại bỏ PLC $\zeta$  khỏi dịch chiết tinh trùng bằng kháng thể chống PLC $\zeta$  cho thấy lưới nội bào lúc này không còn giải phóng  $Ca^{2+}$  nữa [16]. Việc tiêm PLC $\zeta$  RNA gây ra các ‘dao động’  $Ca^{2+}$ , không thể phân biệt được với các dao động lúc thụ tinh thông thường và các dao động lúc hoạt hóa noãn, dẫn đến phát triển thành phôi bào về mặt di truyền [16, 19]. Protein PLC $\zeta$  tái tổ hợp đã được tiêm vào tế bào trứng với mục đích hình thành ‘dao động’ ion  $Ca^{2+}$  [20, 21]. Việc làm giảm lượng PLC $\zeta$  ở chuột chuyển gen đã cho thấy khả năng hoạt hóa noãn thấp [22].

Hầu hết các trường hợp thụ tinh thất bại đều có thể áp dụng ICSI; tuy nhiên tỷ lệ thụ tinh thất bại sau ICSI vẫn là 1–5% số trường hợp [9, 10]. Và những trường hợp này đều được cho là do bất thường quá trình hoạt hóa noãn (**Bảng 2.1**). Lúc này người ta nghĩ tới hoạt hóa noãn nhân tạo (AOA) vì chúng có thể tạo đáp ứng của ion  $Ca^{2+}$  hệt như thụ tinh thông thường. AOA là một thủ thuật hiệu quả cho các cặp vợ chồng có tiền căn thụ thai thấp hoặc không thành công sau ICSI. AOA được chia thành 3 hình thức chính, gồm hoạt hóa cơ học, điện và hóa học (**Bảng 2.2**).