

ĐO LƯỜNG BIỂU HIỆN GEN NHƯ MỘT PHƯƠNG PHÁP KHẢO SÁT KHẢ NĂNG SỐNG CỦA NANG NOÃN TRONG KỸ THUẬT TRỮ LẠNH MÔ BUỒNG TRỨNG

Nguyễn Thị Thu Lan^{1,2,✉}, Trương Nguyễn Thái Hà²
Mã Phạm Quế Mai², Nguyễn Cao Trí², Nguyễn Thị Ngọc Diễm²
Trần Bích Thu¹, Trương Đình Kiệt³, Đặng Quang Vinh²
Nguyễn Văn Tiến⁴, Hồ Mạnh Tường²

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP. HCM

²Bệnh viện Mỹ Đức

³Viện Di truyền Y học

⁴Bệnh viện Ung bướu TP. HCM

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 sử dụng biểu hiện gen *GDF-9* và *caspase-3* như một biomarker để khảo sát khả năng sống của nang noãn trong OTC tại IVFMD, Bệnh viện Mỹ Đức (theo NCT04666376) là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam. Mô của 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 IVFMD). Sau đó, mẫu mô mỗi nhóm được tách chiết mRNA và chạy realtime RT-PCR. Kết quả là không có sự khác biệt về mức độ biểu hiện gen *GDF-9* và *caspase-3* giữa 3 nhóm mô, foldchange lần lượt [0,66; 1,38 ở nhóm 1 so nhóm 2] và [0,71; 1,08 ở nhóm 1 so với 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, thụ tinh hoá, vitrification, *GDF-9*, *caspase-3*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự phát triển của kỹ thuật hỗ trợ sinh sản đã mở ra nhiều lựa chọn cho bệnh nhân trong việc bảo tồn khả năng sinh sản, trong đó trữ lạnh mô buồng trứng (Ovarian Tissue Cryopreservation – OTC) được xem là một kỹ thuật phù hợp với nhiều đối tượng bệnh nhân mắc các bệnh ung thư cần phải qua hoá trị hay xạ trị, đặc biệt là phụ nữ trẻ, trẻ vị thành niên hoặc bé gái chưa dậy thì.¹ Mặc dù, cho đến nay, đã có hơn 130

trường hợp trẻ sinh ra khoẻ mạnh từ kỹ thuật OTC và cấy ghép mô buồng trứng trên thế giới, với khả năng phục hồi chức năng của mô sau cấy ghép (sinh sản nội tiết) gần 90% và tỉ lệ có thai tự nhiên xấp xỉ 30% ở phụ nữ, tỉ lệ sống của nang noãn sau OTC có vẻ không ổn định và phụ thuộc nhiều vào phương pháp đông lạnh – rã đông, tốc độ hạ nhiệt độ, loại và nồng độ của chất bảo vệ đông lạnh được sử dụng, cũng như kỹ thuật của người thực hiện.^{2,3} Hầu hết, tại các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) trên thế giới, đếm số lượng và đánh giá hình thái của nang noãn nguyên thủy (primordial follicles) sau nhuộm Hematoxylin – Eosin thường được sử dụng để kiểm tra chất

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Thu Lan

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP. HCM

Email: nttan@hyvonghospital.com

Ngày nhận: 07/12/2023

Ngày được chấp nhận: 20/12/2023

lượng của mô buồng trứng sau đông lạnh – rã đông.^{4,5} Mặc dù, đây là các phương pháp đơn giản, có thể đánh giá tức thời chất lượng của mô thông qua khảo sát hình thái của nang noãn/mô, nhưng sẽ không xác định được tiềm năng phát triển tiếp tục của mô sau nuôi cấy tiếp tục hoặc sau cấy ghép lại cơ thể của bệnh nhân. Do đó, biểu hiện gen ở mức độ mRNA được xem là hướng tiếp cận tiềm năng để phân tích và so sánh giữa trạng thái “khoẻ mạnh” và “không khoẻ mạnh” của mô, từ đó có thể đánh giá tương đối chính xác về tiềm năng phát triển tiếp tục của các tế bào trong mô.⁶

Phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase phiên mã ngược theo thời gian thực (realtime Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction_ realtime RT-PCR) được đánh giá là phương pháp có độ nhạy cao, chính xác để định lượng mRNA.⁷ Bên cạnh đó, gen Growth Differentiation Factor - 9 (*GDF-9*) được biểu hiện nhiều ở tế bào noãn, kích thích sự phát triển của nang noãn thông qua kích thích sự phát triển của tế bào hạt quanh noãn (Granulosa cells - GCs) và sản sinh steroid, giúp nang noãn vượt qua giai đoạn tiền hóc để đạt được các giai đoạn phát triển xa hơn.⁸ Nhiều bằng chứng cho rằng quá trình đông lạnh – rã đông có thể làm ảnh hưởng đến hoạt động của *GDF-9*.^{6,9} Mặt khác, sự giảm chất lượng của nang noãn sau đông lạnh – rã đông cũng có thể do sự gia tăng quá trình chết theo chương trình (apoptosis) của các tế bào trong mô.¹⁰ Trong đó, nhóm gen caspase đóng vai trò chính trong khởi phát apoptosis. Sau khi được kích hoạt, caspase khiến tế bào bắt đầu chu trình apoptosis bằng cách tách và thay đổi chức năng của các protein nội bào.¹¹ *Caspase-3* là gen khởi đầu được hoạt hoá khi tế bào bước vào chu trình apoptosis, sau đó, chính *caspase-3* sẽ kích hoạt sự hoạt hoá của *caspase-8* và *caspase-9*, đây là hai caspase có nhiệm vụ chính trong quá trình thủy phân

các protein (proteolytic) cần thiết cho sự sống và sửa lỗi DNA ở các tế bào có apoptosis. Khi caspase trong tế bào chất được hoạt hoá, phần lớn các tế bào được định sẵn là chết.¹² Chính vì vậy, việc so sánh sự hiện diện của *caspase-3* giữa mô buồng trứng trước đông lạnh và sau rã đông sẽ giúp đánh giá được khả năng sống và tiếp tục phát triển của mô sau rã đông chính xác hơn.^{10,13}

Với mục tiêu đánh giá tính hiệu quả của thủy tinh hoá đối với mô buồng trứng người trong OTC, nghiên cứu này là một trong số ít nghiên cứu trên thế giới sử dụng biểu hiện gen thông qua sự thay đổi về nồng độ mRNA trong mô buồng trứng sau rã đông so với mô buồng trứng trước đông lạnh của cùng một bệnh nhân. Nghiên cứu được thực hiện tại labo IVFMD, Bệnh viện Mỹ Đức từ 2020 - 2023, theo số nghiên cứu đăng ký NCT04666376.

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

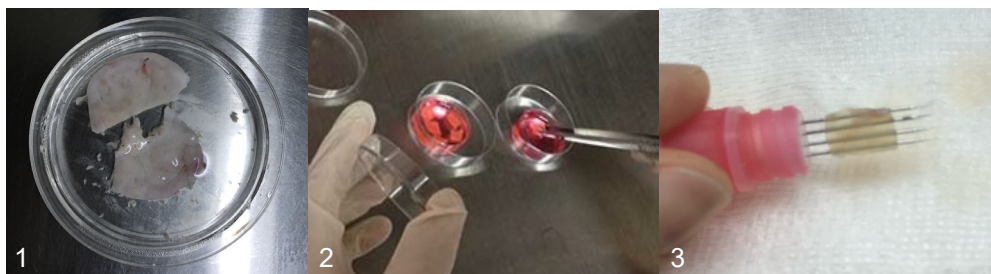
Buồng trứng sau thu nhận được đặt trong môi trường TCM199 có đệm HEPES (Sigma Aldrich), 1% albumin huyết thanh tổng hợp, 100 IU/ml penicillin và 100 µg/ml streptomycin, ở 2 - 4°C, sau đó được vận chuyển về labo TTON IVFMD trong vòng 61,1 ± 9,57 phút.

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 3 mảnh mô đối với mỗi bệnh nhân và chia thành 3 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 thủy tinh hoá bằng

môi trường Ova-kit type M (Kitazato, Japan); nhóm 3 là nhóm mô được đông lạnh thủy tinh hoá bằng môi trường IVFMD. Nhóm 2 và 3 của mỗi bệnh nhân 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

1 - Buồng trứng sau khi loại bỏ vùng tuỷ

2 - Các mảnh mô 1x1x10mm sau xử lý

3 - Mô được đặt trên OTD trước khi nhúng vào nitơ lỏng

Đông lạnh – rã đông bằng phương pháp thủy 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.

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.⁴

Mô buồng trứng sau rã đông ở nhóm 2 và 3 được nuôi cấy trong môi trường Ova-culture (Kitazato) bổ sung 50 mIU/ml FSH (GonalF, Mỹ) và 200 ng/ml hormon tăng trưởng (Zomacton, Thụy Sĩ) đã được làm ấm ở 37°C trước ít nhất 2 giờ. Việc nuôi cấy kéo dài ít nhất 24 giờ trong điều kiện 5% CO₂ và 37°C, trước khi tiến hành tách chiết mRNA.

Thu nhận mRNA

Mô buồng trứng ở mỗi nhóm được cắt nhỏ

và giữ trong Phosphate Buffered Saline (PBS 1X) có bổ sung chất ức chế Rnase và lưu trữ ở -20°C cho đến khi tách chiết RNA. Thực hiện tách chiết RNA theo bằng AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (cat. No. 80004) của Qiagen (Đức), theo quy trình hướng dẫn trong AllPrep DNA/RNA/Protein Mini handbook.¹⁴ (www.qiagen.com/HB-0447). RNA sau khi tinh sạch được lưu giữ ở -20°C cho đến khi thực hiện phản ứng PCR.

Thực hiện phản ứng

Phản ứng phiên mã ngược để thu cDNA

được thực hiện bằng iScript cDNA Synthetic kit (BioRad, Mỹ) trước khi tiến hành phản ứng realtime PCR với kit SsoAdvanced universal probes supermix (2X) và Primer probe assay (20X) (Biorad, Mỹ) của gen tham chiếu RPL4 và hai gen khảo sát (*GDF-9* và *Caspase-3*) được thể hiện ở Bảng 1. Có 40 chu trình nhiệt của realtime RT-PCR với các bước gia nhiệt lần lượt 95°C/ 30 giây, 95°C/ 15 giây và 60°C/ 30 giây. Thí nghiệm real-time RT-PCR được lặp lại 3 lần trên từng mẫu mô và từng gen.

Bảng 1. Các môi của các gen sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên môi	Hãng	Lô Sản xuất	Cat
1	PrimePCR Probe Assay Fluorophore CASP3: FAM 500 reactions, Hsa (20X)	Biorad	qHsaCIP0029139	#10031225
2	PrimePCR Probe Assay Fluorophore GDF9: FAM 500 reactions, Hsa (20X)	Biorad	qHsaCEP0053480	#10031225
3	PrimePCR Probe Assay Fluorophore RPL4: FAM 500 reactions, Hsa (20X)	Biorad	qHsaCEP0041478	#10031225

Xử lý số liệu

So sánh sự tương quan về biểu hiện của từng gen trong các mẫu can thiệp với mẫu chứng được thực hiện dựa trên phương pháp $2^{-\Delta\Delta Ct}$ của Livak.⁷ Dữ liệu được biểu diễn ở dạng trung bình (giao động) [mean (SD)], sau đó phân tích thống kê được thực hiện bằng phép thử Wilcoxon (theo cặp) sau khi chuyển thành dạng log2 của fold change, bằng phần mềm RR 4.3.0. 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 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 25 bệnh nhân ở độ tuổi trung bình $37,5 \pm 4,92$ tuổi, phần lớn được thực hiện phẫu thuật cắt buồng trứng tại Bệnh viện Ung bướu TP. HCM 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 2).

Mức độ biểu hiện gen của *GDF-9* và *Caspase-3* trong mô của cả 3 nhóm được đo lường và sau đó, đánh giá sự tương quan giữa nhóm 1 – nhóm 2 và giữa nhóm 1 – nhóm 3 thông qua mức fold change của mRNA các gen giữa các nhóm mô. Tất cả các mẫu mô ở cả 3 nhóm đều ghi nhận được tín hiệu biểu hiện của gen tham chiếu và các gen khảo sát. Khi so

sánh giữa nhóm 1 và nhóm 2, mức độ biểu hiện của *GDF-9* ở mô buồng trứng trong nhóm 2 và nhóm 3 tương đương với mô ở nhóm 1; với fold change của *GDF-9* là 0,66 và *Caspase-3*

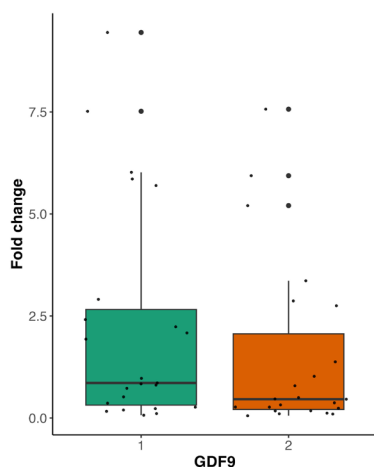
là 0,71; $p > 0,05$ (Bảng 3). Fold change giữa nhóm 2 so với nhóm 1 và nhóm 3 so với nhóm 1 của *GDF-9* và *Caspase-3* có thể được quan sát rõ hơn trong các Biểu đồ 1, 2, 3, 4.

Bảng 2. Đặc điểm các bệnh nhân cho buồng trứng

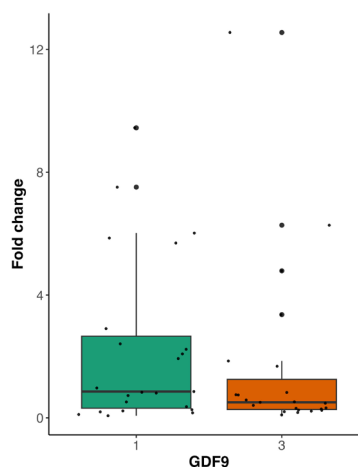
Loại ung thư	n = 25
Tuổi trung bình (TB \pm SD)	37,5 \pm 4,92
Chẩn đoán, n (%):	
Ung thư vú	2 (8,0%)
Ung thư vú đã hoá trị	10 (40,0%)
Ung thư vú đã xạ trị và hoá trị	1 (4,0%)
Ung thư cổ tử cung	5 (20,0%)
Ung thư nội mạc tử cung	7 (28,0%)

Bảng 3. Mức độ phiên mã thay đổi (Fold change) của *GDF-9* và *Caspase-3* khi so sánh nhóm 2, nhóm 3 với nhóm 1

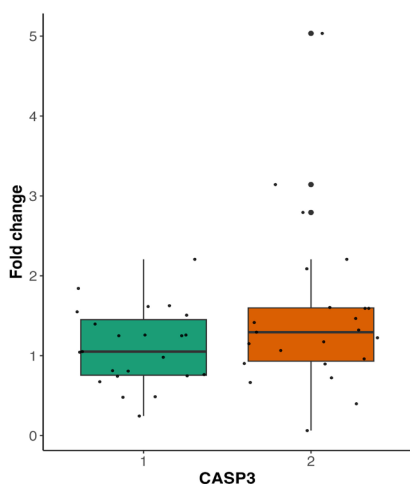
	1 (n = 25) Control	2 (n = 25)	3 (n = 25)	1 so với 2	1 so với 3	Fold change 2 - 1	Fold change 3 - 1
Fold change <i>GDF9</i> , mean (SD)	2,27 (2,71)	1,50 (2,13)	1,63 (2,86)	0,2595	0,1793	1,5/2,27 (0,66)	1,63/2,27 (0,71)
Fold change <i>Caspase-3</i> , mean (SD)	1,11 (0,48)	1,51 (1,04)	1,20 (0,46)	0,2989	0,5202	1,51/1,11 (1,36)	1,2/1,11 (1,08)



Biểu đồ 1. Tương quan biểu hiện của *GDF-9* trong mô buồng trứng giữa nhóm 2 so với nhóm 1

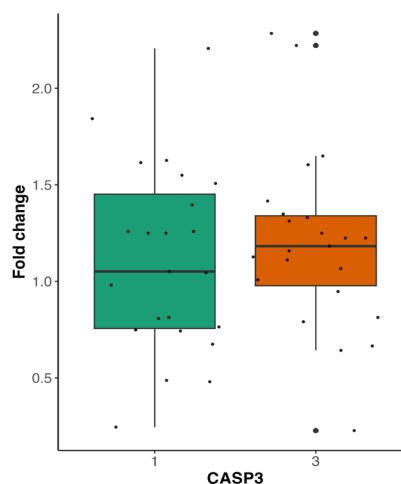


Biểu đồ 2. Tương quan biểu hiện của *GDF-9* trong mô buồng trứng giữa nhóm 3 so với nhóm 1



Biểu đồ 3. Tương quan biểu hiện của Caspase-3 trong mô buồng trứng giữa nhóm 2 so với nhóm 1

Mức độ biểu hiện của *GDF-9* và *Caspase-3* ở mô buồng trứng cũng được so sánh giữa nhóm 2 và nhóm 3. Trong đó, mức độ biểu hiện của *GDF-9* và *Caspase-3* trong mô của



Biểu đồ 4. Tương quan biểu hiện của Caspase-3 trong mô buồng trứng giữa nhóm 3 so với nhóm 1

nhóm 2 không có sự khác biệt so với mô của nhóm 3, với fold change của *GDF-9* là 1,08 và *Caspase-3* là 0,79, $p > 0,05$ (Bảng 4 và Biểu đồ 5, 6).

Bảng 4. Mức độ phiên mã thay đổi (Fold change) của *GDF-9* và *Caspase-3* khi so sánh nhóm 2 và nhóm 3

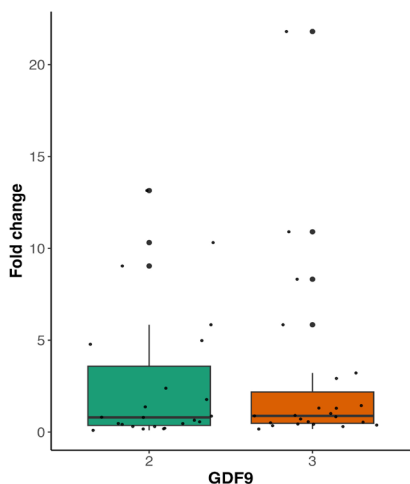
	2 (n = 25) Control	3 (n = 25)	2 so với 3	Fold change 2 so với 3
Fold change <i>GDF9</i> , mean (SD)	2,61 (3,70)	2,83 (4,97)	0,3447	2,83/2,61 (1,08)
Fold change <i>caspase-3</i> , mean (SD)	1,28 (0,88)	1,01 (0,39)	0,3765	1,01/1,28 (0,79)

IV. BÀN LUẬN

Trữ lạnh mô buồng trứng (OTC) là kỹ thuật hứa hẹn trong bảo tồn khả năng sinh sản, không những phù hợp cho phụ nữ trong độ tuổi sinh sản, mà còn phù hợp đối với các trường hợp trẻ ở tuổi vị thành niên và bé gái chưa dậy thì phải nhận các liệu pháp điều trị ung thư, có thể ảnh hưởng đến khả năng sinh sản trong tương lai. Ưu điểm của OTC, so với trữ lạnh noãn, là khả năng bảo tồn được một số lượng lớn các tế

bào noãn chưa trưởng thành trong môi trường “sinh lý” của mô buồng trứng, thay vì riêng lẻ trong môi trường trong ống nghiệm (invitro). Tuy nhiên, các phương pháp đông lạnh, bao gồm thủy tinh hoá đều tác động bất lợi đến khả năng sống của nang noãn.

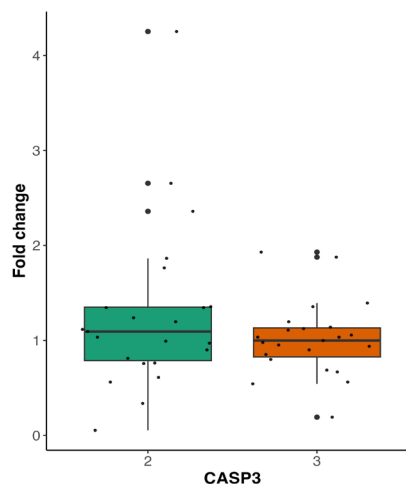
Một số nghiên cứu trên mô buồng trứng trước đây trên mô hình động vật sử dụng biểu hiện gen đặc trưng của noãn hoặc nang noãn



Biểu đồ 5. Tương quan biểu hiện của GDF-9 trong mô buồng trứng giữa nhóm 2 so với nhóm 3

để đánh giá chất lượng của mô buồng trứng sau trữ lạnh – rã đông được thực hiện, tuy nhiên phần lớn sử dụng kỹ thuật hoá mô miễn dịch (immunohistochemistry), rất ít nghiên cứu sử dụng kỹ thuật PCR để ghi nhận sự biểu hiện gen.^{5,15-17}

Realtime RT-PCR là kỹ thuật được sử dụng phổ biến trong chẩn đoán phân tử, đặc biệt hữu ích khi mẫu thử nghiệm có số lượng tế bào ít.⁹ Khi so sánh biểu hiện gen trong các mẫu khác nhau, các gen tham chiếu (housekeeping gene) thường được sử dụng để kiểm soát độ chính xác của phản ứng.¹⁸ *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* là gen tham chiếu thường được sử dụng trong PCR, tuy nhiên một số nghiên cứu khẳng định rằng do đóng nhiều vai trò khác nhau trong tế bào nên mức độ biểu hiện của *GAPDH* khác nhau ở các loại mô và kết quả *GAPDH* được đánh giá có vai trò tham chiếu kém.^{18,19} Trong khi đó, nhiều bằng chứng cho thấy gen *Ribosomal protein L4 (RPL4)* được sử dụng làm gen tham chiếu trong nhiều nghiên cứu trên mô buồng trứng, nội mạc tử cung có sử dụng kỹ thuật PCR để xác định ung thư hoặc tế bào ác tính và có mức



Biểu đồ 6. Tương quan biểu hiện của Caspase-3 trong mô buồng trứng giữa nhóm 2 so với nhóm 3

độ ổn định cao trong các thí nghiệm.^{20,21} Chính vì thế, *RPL4* được chúng tôi chọn làm gen tham chiếu trong các thí nghiệm phân tử của nghiên cứu này.

Ở người, sự phiên mã của *GDF-9* được biểu hiện ở tế bào noãn trong giai đoạn phát triển sớm của nang noãn, do đó *GDF-9* được xem là dấu ấn sinh học (biomarker) tiềm năng để đánh giá chất lượng noãn/ nang noãn.²² Kết quả từ nghiên cứu của Aaltonen và cộng sự năm 1999 về biểu hiện của *GDF-9* trong mô buồng trứng sau sinh thiết bằng kỹ thuật hoá mô miễn dịch đã chứng minh *GDF-9* bắt đầu phiên mã thành protein tương ứng ngay trong nang noãn ở giai đoạn tiền hóc (bao gồm giai đoạn muộn của nang nguyên thủy và giai đoạn sớm của nang sơ cấp).²³ Kết quả tương tự được tìm thấy trong nghiên cứu của Kristensen và cộng sự, năm 2022, bằng kỹ thuật huỳnh quang miễn dịch (immunofluorescence).²² Đối với sự biểu hiện gen *GDF-9* ở mô buồng trứng trong nghiên cứu này, chúng tôi không ghi nhận có sự khác biệt giữa nhóm 1 và nhóm 2, giữa nhóm 1 và nhóm 3. Điều này cho thấy quy trình đông lạnh – rã đông mô buồng trứng của chúng tôi có thể

không gây tác động bất lợi đến chất lượng của mô. Bên cạnh đó, các mô sau rã đông được nuôi cấy ít nhất 24 giờ trước khi thực hiện tách chiết mRNA. Điều này bảo đảm độ tin cậy của kết quả biểu hiện gen, do trong quá trình nuôi cấy này, sự thay đổi về chất lượng mô (nếu có) ít nhiều có đủ thời gian diễn ra và tác động lên các hoạt động sống của tế bào. Trong khi, nếu tách chiết mRNA của mô ngay sau khi rã đông, các cấu trúc vi thể của tế bào, mô chưa kịp có những thay đổi bởi các ảnh hưởng của quy trình trữ lạnh – rã đông nên khả năng cao là lượng mRNA trong mô trước đông lạnh và ngay rã đông hoàn toàn giống nhau. Dữ liệu từ nghiên cứu của Wang và cộng sự trên 5 bệnh nhân, năm 2016, đã chứng minh có sự biểu hiện giảm (down regulation) của *GDF-9* ở nhóm mô thủy tinh hoá (khoảng $0,8 \pm 0,4$ lần) khi so sánh với nhóm mô trước đông lạnh ($p < 0,05$).⁵ Đây cũng là nghiên cứu duy nhất chúng tôi tìm thấy được có thiết kế tương tự nghiên cứu của chúng tôi, nhưng với số lượng mẫu nhỏ (5 bệnh nhân). Cỡ mẫu nghiên cứu nhỏ có thể là lý do khiến cho fold change của *GDF-9* trong nghiên cứu của Wang và cộng sự có sự khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm can thiệp và nhóm chứng, mặc dù kết quả fold change của *GDF-9* giữa nghiên cứu của Wang và nghiên cứu của chúng tôi khá tương đồng. Ngoài ra, chúng tôi cũng xác định được kết quả tương tự về độ biểu hiện của *GDF-9* khi so sánh mô buồng trứng khi đông lạnh với hai môi trường thủy tinh hoá khác nhau, điều này cũng chứng minh rằng, môi trường IVFMD cũng có thể cho hiệu quả đông lạnh tương tự môi trường thương mại Ova Kit Type M trên mô buồng trứng.

Sự kích hoạt các men thủy phân protein (protease) là bởi các gen nhóm caspase là một trong các cơ chế tự nhiên ở các tế bào chết do apoptosis. Với vai trò là gen “khởi động” sự hoạt hoá của các gen còn lại trong nhóm

caspase, *Caspase-3* được xem là gen có vai trò chủ chốt trong qua trình apoptosis của tế bào. Nhiều nghiên cứu trên động vật chứng minh sự biểu hiện tăng (up regulation) của caspase-3 được tìm thấy ở GCs và tế bào vỏ ở các nang noãn xảy ra apoptosis, đồng thời hoàn toàn không hiện diện ở GCs trong các nang noãn khoẻ mạnh của mô buồng trứng.^{14,24} Trong phần khảo sát biểu hiện của *Caspase-3*, chúng tôi cũng không tìm thấy sự khác biệt về fold change của caspase-3 khi so sánh nhóm 1 và nhóm 2, nhóm 1 và nhóm 3, mặc dù trên biểu đồ 2 và 3, ở nhóm mô đông lạnh có xuất hiện 1 vài điểm có giá trị của fold change vượt qua 3 – 5 lần. Kết quả tương tự được tìm thấy trong nghiên cứu của Abdollahi và cộng sự, năm 2013 trên 3 mẫu mô khác nhau, với tỉ lệ biểu hiện của *Caspase-3*/ gen tham chiếu thấp (dưới 0,01) ở cả 2 nhóm mô trước đông lạnh và sau rã đông ($p > 0,05$).²⁵ Bên cạnh đó, cũng không có sự khác biệt về mức độ biểu hiện của *Caspase-3* trong mẫu mô được trữ lạnh bằng hai loại môi trường trong nghiên cứu này.

Với các dữ liệu khảo sát được về độ biểu hiện gen *GDF-9* và *Caspase-3* từ nghiên cứu này, chúng tôi có thể đề xuất rằng có vẻ không có sự thay đổi về chất lượng mô, cũng như khả năng sống tiếp tục của mô sau rã đông, khi so với mô trước đông lạnh. Theo các tài liệu mà chúng tôi tham khảo được, mặc dù hơn 700 công bố về OTC trên thế giới, nhưng có rất ít nghiên cứu sử dụng biểu hiện gen để đánh giá hiệu quả của OTC bằng kỹ thuật realtime RT-PCR, và phần lớn trong số này được thực hiện trên mô hình động vật.^{4,25-27}

V. KẾT LUẬN

Đo lường độ biểu hiện của gen bằng realtime RT-PCR như một biomarker để khảo sát khả năng sống của mô buồng trứng trong việc đánh giá hiệu quả của quy trình đông lạnh

thủy tinh hoá đối với mô buồng trứng người là một trong những hướng tiếp cận mới trong Hỗ trợ sinh sản trên thế giới và tại Việt Nam. Mặc dù, không thể thay thế “tiêu chuẩn vàng” của kết quả mô buồng trứng phát triển tiếp tục sau khi cấy ghép, độ biểu hiện gen có thể giúp dự đoán ở cấp độ phân tử (có thể chính xác hơn so với các khảo sát về hình thái học của mô thường thấy) về khả năng sống và phát triển tiếp tục của mô sau rã đông bằng phương pháp thủy tinh hoá, làm cơ sở đáng tin cậy hơn cho việc chọn lựa mẫu mô để cấy ghép lại vào cơ thể bệnh nhân.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Kristensen SG, Rasmussen A, Byskov AG, et al. Isolation of pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue. *Hum Reprod.* 2011;26:157-66.
- Fabbri R, Vicenti R, Magnani V, et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: 20 years experience in Bologna University. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2022;13:1035109. doi: 10.3389/fendo.2022.1035109
- Arapaki A, Christopoulos P, Kalampokas E, et al. Ovarian tissue cryopreservation in children and adolescents. *Child. (Basel)* 9. 2022;1256. doi: 10.3390/children9081256
- Kagawa N, Silber S, Kuwayama M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *RBMOnline.* 2009;18(4):568-577.
- 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.
- Liu L, Liu B, Liu K, et al. Identification of biomarkers for predicting ovarian reserve of primordial follicle via transcriptomic analysis. *Original research.* 2022;13:879974. doi: 10.3389/fgene.2022.879974
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PRC and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods.* 2001;25(4):402-408.
- Wang N, Li C-Y, Zhu H-B, et al. Effect of vitrification on the mRNA transcriptome of bovine oocytes. *Reprod. Domest. Anim..* 2017;52:531-541.
- Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ, et al. Post-analysis follow-up of a microarray experiment. *Nat Genet.* 2002;32:509-514.
- Zhang JM, Li LX, Yang YX, et al. Is caspase inhibition a valid therapeutic strategy in cryopreservation of ovarian tissue? *J Assist Reprod Genet.* 2009;26:415-420. doi: 10.1007/s10815-009-9331-9.
- Men H, Agca T, Riley LK, et al. Improves survival of vitrified porcine embryos after partial delipidation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology.* 2006;2008-2016.
- Shin SY, Lee JY, Lee EY. Protective effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) in frozen-thawed granulosa cells is mediated by inhibition of apoptosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;125:233-238.
- Amorim CA, Dolmas MM, David A, et al. Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. *Fertil and Steril.* 2012;98(5):1291-1298.
- QIAGEN. AllPrepDNA/RNA/ProteinMini handbook. 2020 Nov. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=e00044e1-a80b-4c54-8989-957207ac8be2&lang=en>
- Glamoclija V, Vilovic K, Saraga-Babic M, et al. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertil and Steril.* 2005;83(2):426-431. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.06.075.
- Hurst PR, Mora JM, Fenwick MA. Caspase-3, TUNEL and ultrastructural studies of small follicles in adult human ovarian

biopsies. *Hum Reprod.* 2006;21(8):1974-1980. doi:10.1093/humrep/del109

17. Hariya M, Suzuki H. Incidence of apoptosis cells after vitrification in canine ovarian tissues. *J. of Mammalian Ova Research.* 2016;33(1):69-75. <https://doi.org/10.1274/jmor.33.69>

18. Silver N, Cotroneo E, Proctor G, et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in the adult rat submandibular gland under normal, inflamed, atrophic and regenerative states. *BMC Mol Biol.* 2008;9:64-72. doi: 10.1186/1471-2199-9-64

19. Butterfield DA, Hardass SS, Lange ML. Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease: many pathways to neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(2):369-393. doi:10.3233/JAD-2010-1375.

20. Fu J, Bia L, Zhao L, et al. Identification of genes for normalization of quantitative realtime PCR data in ovarian tissue. *ABBS.* 2010;42:568-574. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq062>

21. Kolkova Z, Arakelyan A, Casslen B, et al. Normalizing to GAPDH jeopardies correct quantification of gene expression in ovarian tumours - IPO8 and RPL4 are reliable reference genes. *J Ovarian Res.* 2013;6(60):1-10. <http://www.ovarianresearch.com/content/6/1/60>

22. Kristensen SG, Kumar A, Mamsen LS,

et al. Intrafollicular concentration of oocyte-secreted factors GDF-9 and BMP15 vary inversely in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022;107(8):e3374-e3383. doi:10.1210/clinem/dgac272

23. Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen RJ, et al. Human Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9) and Its novel homolog GDF-9B are expressed in Oocytes during early folliculogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1999;84(8):2744-2750.

24. Van Nassauw L, Tao L, Harrisson F. Distribution of apoptosis-related proteins in the quail ovary during folliculogenesis: BCL-2, BAX and CPP32. *Acta Histochem.* 1999;101:103-12.

25. Abdollahi M, Salehnia M, Salehpour S, et al. Human ovarian tissue vitrification/warming has minor effect on the expression of apoptosis-related genes. *Iran Biomed J.* 2013;17(4):179-186.

26. Wang Y, Xiao Z, Li L, et al. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Hum Reprod.* 2008;23(10):2256-65.

27. Cheng J, Ruan X, Zhou Q, et al. Long-time low-temperature transportation of human ovarian tissue before cryopreservation. *RBMO.* 2021;43 2): 72-183. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.05.006>

Summary

USING GENE EXPRESSION AS A METHOD TO QUANTIFY FOLLICLE SURVIVAL IN OVARIAN TISSUE CRYOPRESERVATION

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 recently, and there is no publication of OTC in Vietnam. Using the expression of GDF-9 and caspase-3 as a biomarker to evaluate the survival of follicles in OTC in IVFMD at My Duc Hospital (NCT04666376) is the first study conducted in Vietnam. Ovarian tissues from each donor were divided into 3 groups, 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. Then, mRNA was extracted and transcribed reversely to cDNA before realtime PCR was performed. The findings showed there was no statistical difference between 3 groups about the expression of GDF-9 and caspase-3, respectively, [0.66, 1.38 in group 1 vs group 2] and [0.71, 1.08 in group 1 vs group 3], $p > 0.05$. The results aligned with previous findings because of the negative effects of cryopreservation. Moreover, it was illustrated that there was no change in tissue quality between the commercial medium and IVFMD's medium in OTC.

Keywords: Ovarian tissue cryopreservation, OTC, vitrification, GDF-9, caspase-3.