

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm (TTÔN) đóng một vai trò quan trọng trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản. Để điều trị TTÔN đạt kết quả cao đảm bảo cho ra đời một thể hệ khoẻ mạnh về thể lực, sáng suốt về tinh thần, góp phần nâng cao chất lượng dân số thì việc nghiên cứu một phương pháp ưu việt để lựa chọn phôi tốt có bộ nhiễm sắc thể (NST) bình thường là yêu cầu cấp thiết và thực tiễn. Hiện nay, việc lựa chọn phôi thường chỉ dựa trên những tiêu chuẩn về hình thái của phôi, do đó không phản ánh đầy đủ chất lượng thực của phôi. Hầu hết các nghiên cứu trước đây chỉ áp dụng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH/Fluorescence In Situ Hybridization) chỉ cho phép kiểm tra một số lượng giới hạn NST của phôi để suy luận đánh giá toàn bộ phôi nên tỷ lệ chẩn đoán âm tính giả cao. Do vậy mục tiêu của nghiên cứu (NC) này là áp dụng một kỹ thuật mới, sử dụng bộ thử chip DNA gọi là phương pháp lai so sánh bộ gen (array comparative genomic hybridization/ a-CGH) để phân tích toàn bộ 23 cặp NST của phôi nhằm:

1. Xác định tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể (LBNST) trên 23 đôi NST của phôi ngày 3 sau thụ tinh trong ống nghiệm bằng kỹ thuật lai so sánh bộ gen (a-CGH) và khả năng tự sửa chữa của phôi ngày 3 bị LBNST khi phát triển thành phôi nang.
2. Nghiên cứu một số yếu tố liên quan với LBNST của phôi ngày 3 trước làm tổ.

### NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

#### Ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn của đề tài

Đề tài này là cơ sở để khuyến cáo ứng dụng một phương pháp chọn lọc phôi hữu hiệu, chính xác hơn các phương pháp trước đây, góp phần làm tăng hiệu quả của kỹ thuật điều trị thụ tinh trong ống nghiệm.

Nghiên cứu này có tính cấp thiết, có giá trị thực tiễn rất cao và có tính nhân văn sâu sắc.

Là tài liệu tham khảo hữu ích trong lĩnh vực Hỗ trợ sinh sản, Phôi học và Di truyền học.

#### Điểm mới của đề tài

Áp dụng phương pháp a-CGH là phương pháp hiện đại xét nghiệm cho toàn bộ 23 đôi NST của 1257 phôi cho kết quả khá chính xác về tỷ lệ LBNST của phôi ngày 3 và các yếu tố liên quan đến LBNST.

Xác định được giá trị của một số chỉ báo quan trọng để dự đoán phôi LBNST dựa vào phân tích đơn biến, đa biến kết hợp với phân tích tỷ số khả năng. Những chỉ báo này có giá trị ứng dụng lâm sàng cao.

Chứng minh được khả năng tự sửa chữa của phôi LBNST khi phát triển thành phôi nang và khả năng này liên quan chặt chẽ với tuổi mẹ.

## CẤU TRÚC LUẬN ÁN

Luận án gồm 133 trang không kể phụ lục và tài liệu tham khảo, có 17 hình ảnh và 34 bảng, tổng quan: 37 trang, đối tượng và phương pháp: 13 trang, kết quả: 35 trang, bàn luận: 40 trang, kết luận: 2 trang.

### Chương 1: TỔNG QUAN

#### 1.1 Sự phát triển của phôi trước khi làm tổ

(1) Phôi ở giai đoạn tiền nhân. (2) Phôi ở giai đoạn phân chia. (3) Phôi đầu. (4) Phôi nang.

#### 1.2 Hiện tượng lệch bội nhiễm sắc thể (LBNST) ở noãn và phôi

LBNST hiện tượng số lượng NST của tế bào tăng lên hoặc giảm đi một hoặc vài NST so với bộ NST lưỡng bội dẫn tới: phôi ngừng phát triển trước khi làm tổ, sảy thai, thai chết lưu; thai sống nhưng phát triển bất thường như trong hội chứng Down, hội chứng Klinefelter...LBNST hay gặp ở giao tử và phôi người do sự sai lệch trong phân ly của NST.

#### 1.3 Hiện tượng phôi thể khảm

Lần đầu tiên được công bố vào năm 1993. Phôi thể khảm là phôi có hai hay nhiều dòng phôi bào có số lượng NST khác nhau trong một phôi, những phôi này thường ngừng phát triển trước khi đến giai đoạn phôi nang, thường ở giai đoạn phôi đầu.

#### 1.4 Các phương pháp phân tích NST của noãn và phôi

(1) Phương pháp lai huỳnh quang tại chỗ (fluorescent in situ hybridization/FISH). (2) Phương pháp lai so sánh bộ gen (comparative genomic hybridization/CGH). (3) Phương pháp lai so sánh bộ gen dùng chip DNA (array –comparative genomic hybridization/a-CGH). (4) Phương pháp phân tích đa hình đơn nucleotide dùng chip DNA (array Single Nucleotide Polymorphism /a-SNP). (5) Phương pháp giải trình tự gene thế hệ mới (Next Generation Sequencing/NGS).

#### 1.5 Tỷ lệ LBNST ở phôi

Trên 50% phôi tạo ra trong ống nghiệm ở giai đoạn phân chia có bất thường về NST, tỷ lệ này tăng lên đến trên 80% ở phụ nữ lớn tuổi. NST có tỷ lệ lệch LBNST cao là 22, 16, 21, 15, 13, 18, 17 và XY (Al-Asma 2012, Rubio 2013). Mặc dù một số phôi bất thường ngừng phát triển từ giai đoạn ngày 3 và 5 nhưng phần lớn vẫn phát triển đến giai đoạn phôi

nang. Ở giai đoạn phôi nang, trên 40% phôi bất thường, tỷ lệ này tăng cùng với tuổi mẹ (Fragouli 2010, Traversa 2011).

### 1.6 Khả năng phát triển và tự sửa chữa của phôi LBNST thành phôi nang

Phôi LBNST có khả năng hình thành phôi nang nhưng với tần suất thấp hơn phôi bình thường (Magli 2000, Sandalinas 2001, Li 2005, Rubio 2003). Khoảng 40% phôi LBNST khi xét nghiệm lại ở giai đoạn phôi nang trở lại bình thường (Li 2005).

### 1.7 Một số yếu tố liên quan đến LBNST

#### 1.7.1 Sự phát triển của phôi và LBNST

\* *Phôi ở giai đoạn phân chia*

Các NC dùng phương pháp FISH để đánh giá NST thấy LBNST có liên quan đến tốc độ phát triển của phôi. Phôi ngừng, chậm phát triển hay phát triển quá nhanh có tỷ lệ LBNST cao hơn phôi phát triển bình thường (Magli 2007, Finn 2010).

\* *Phôi ở giai đoạn phôi nang*

LBNST xuất hiện ở giai đoạn phôi nang nhưng tỷ lệ thấp hơn so với phôi ở giai đoạn phân chia (Fragouli 2008).

#### 1.7.2 Hình thái phôi và tỷ lệ LBNST

\* *Hình thái phôi bào không đồng đều và LBNST*: Sử dụng phương pháp FISH để đánh giá NST, các NC trước thấy những phôi bào không đồng đều có liên quan với tăng tỷ lệ LBNST (Hardason 2001, Finn 2010).

\* *Số lượng, tỷ lệ mảnh vụn tế bào trong phôi và LBNST*: Sử dụng phương pháp FISH đánh giá NST của phôi, các nghiên cứu trước thấy số lượng mảnh vụn của phôi càng nhiều thì tỷ lệ LBNST càng cao (Magli 2007, Munne 2007).

\* *Sự phân bố mảnh vụn tế bào trong phôi và LBNST*: Sử dụng phương pháp FISH để đánh giá NST của phôi, phôi có mảnh vụn nằm rải rác có tỷ lệ LBNST cao hơn so với phôi có các mảnh vụn nằm tập trung tại một vị trí (Magli 2007).

\* *Hình thái phôi nang và tỷ lệ LBNST*: LBNST có ảnh hưởng xấu tới sự phát triển của phôi ở giai đoạn phôi nang dẫn tới giảm chất lượng của mầm phôi và nguyên bào lá nuôi cũng như tốc độ phát triển của phôi nang (Kroner 2012).

**1.7.3 Bệnh nhân có dự trữ buồng trứng giảm**: Đối với phụ nữ dưới 40 tuổi nồng độ FSH cao, có tỷ lệ LBNST tăng đáng kể ( $p < 0,02$ ) (Munne 1998). Tỷ lệ trẻ sinh ra bị tam thể 21 tăng đáng kể ở phụ nữ trẻ tuổi có khả năng dự trữ buồng trứng giảm. Tăng nồng độ FSH có thể liên quan trực tiếp đến tỷ lệ LBNST ở mọi lứa tuổi (Kline 2000, Van Montfrans 1999).

**1.7.4 Một số nguyên nhân gây vô sinh có liên quan đến tỷ lệ LBNST**: Tỷ lệ LBNST tăng ở các trường hợp: thai phụ bị lạc nội mạc tử cung, tác động của các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phóng noãn và ở những phụ nữ có tiền sử sảy thai (Fasolino 1998, Weghofer 2007).

## Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Đối tượng nghiên cứu

#### 2.1.1 Tiêu chuẩn chọn lọc đối tượng

Đối tượng nghiên cứu là phôi ngày 3 của các cặp vợ chồng làm IVF tại trung tâm IVF Red Rock. Các phôi này có các tiêu chuẩn sau:

- Toàn bộ phôi 3 ngày tuổi lấy lần lượt từ khi nghiên cứu cho đến khi đủ số lượng nghiên cứu.

- Phôi ngày 3 có ít nhất 4 phôi bào.

- Số lượng mảnh vụn trong phôi không quá 30%.

#### 2.1.2 Tiêu chuẩn loại trừ

Các phôi không đúng với tiêu chuẩn đã nêu ở mục 2.1.1

#### 2.1.3 Số lượng đối tượng

Nghiên cứu theo phương pháp mô tả, tiến hành loại tiến cứu nên cỡ mẫu được tính theo công thức sau:

$$N = \frac{Z^2 (1-\alpha/2) \cdot p \cdot q}{(p \cdot \epsilon)^2} \quad \text{trong đó}$$

- N= cỡ mẫu tối thiểu
- Z (1- $\alpha/2$ ) biểu thị độ tin cậy; Nếu độ tin cậy của nghiên cứu là 95%, tương ứng với  $\alpha = 5\%$  thì Z (1- $\alpha/2$ ) = 1,96
- $\epsilon$  là độ sai lệch của nghiên cứu so với thực tế. Độ sai lệch  $\epsilon$  chỉ trong giới hạn từ 0,1% (0,01) đến 10% (0,1).
- p biểu thị một tỷ lệ đại diện cho 1 tiêu thức NC được xác định ở mục tiêu NC và liên quan đến độ sâu của NC.
- q = 1-p biểu thị tỷ lệ bình thường.

Áp dụng vào nghiên cứu này:

- Độ tin cậy = 95% tương ứng  $\alpha = 5\%$  thì Z<sup>2</sup> 1- $\alpha/2$  = 1,96
- p = 53% = 0,53 (tỷ lệ phôi phát triển bình thường không có mảnh vụn mà bị lệch bội thể (Magli 2007).
- q = 1- 0,53 = 0,47

- $C = 0,055$  (giới hạn cho phép về thống kê)  
Thay số liệu vào công thức trên ta có:

$$N = \frac{1,96^2 \times 0,53 \times 0,47}{(0,53 \times 0,055)^2} = 1126$$

**Số phôi tối thiểu được thu thập nghiên cứu là 1126**

## 2.2 Phương pháp nghiên cứu và thu thập số liệu

### 2.2.1 Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu theo phương pháp mô tả tiến hành theo cách tiến cứu

### 2.2.2. Phương pháp tiến hành và thu thập số liệu

\*Địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu được tiến hành tại trung tâm IVF Red Rock (Red Rock Fertility Center/RRFC), thành phố Las Vegas, bang Nevada, USA.

\*Quy trình tiến hành, thu thập số liệu

Tất cả bệnh nhân đều được tiến hành theo quy trình sau:

-Xét nghiệm nội tiết: Vào ngày thứ 3 của chu kỳ kinh, các bệnh nhân được xét nghiệm các nội tiết sau: FSH, E2, LH, P4, prolactin, TSH và beta hCG bằng phương pháp Immuno assay (ROCHE E411, Indiana, USA).

-Kích thích buồng trứng: Có 2 phương pháp kích thích buồng trứng được sử dụng:

Sử dụng Lupron (Leuprolide acetate; TAP Pharmaceuticals, Lake Forest, IL) để điều hoà xuống trên 14 ngày, bắt đầu từ ngày 21 của chu kỳ kinh trước. FSH tổng hợp (Gonal-F, EMD Serono hay Follistim, Organon USA) có thể kết hợp với Menopur (Ferring Pharmaceuticals, Parsippany, NJ) được sử dụng từ ngày thứ 3 của chu kỳ kinh.

Sử dụng phác đồ dùng GnRH antagonists (Cetrotide, EMD Serono, Rockland, MA hay Ganirelix, Organon USA, Roseland, NJ): Bệnh nhân được kích thích bằng FSH tổng hợp (Gonal-F hay Follistim), có thể kết hợp với Menopur từ ngày thứ 3 của chu kỳ kinh. Antagon được sử dụng sau 5-6 ngày dùng FSH (khi nang trứng đạt 14mm)

HCG (5000-10000 IU Profasi, Serono; Pregnyl, Organon) được chỉ định khi có ít nhất trên 2 nang noãn có kích thước trên 17 mm.

-Chọc lấy noãn: Noãn được lấy qua đường âm đạo dưới sự chỉ dẫn của siêu âm 36h sau hCG. Noãn lấy ra được nuôi trong môi trường Global (LifeGlobal, USA) với 10% SSS (Serum Substitute Supplement, Irvine Scientific, USA) trong tủ cấy CO<sub>2</sub> 6,5 %, O<sub>2</sub> 5%, N<sub>2</sub> 88,5 % ở 37°C.

-Tiêm tinh trùng vào bào tương của noãn (ICSI): Tất cả noãn trưởng thành được thụ tinh bằng phương pháp ICSI với tinh trùng của chồng hoặc của người hiến tinh trùng.

-Đánh giá thụ tinh và quá trình nuôi cấy phôi: Khoảng 16-18 giờ sau ICSI, trứng được đánh giá xem có thụ tinh hay không. Nếu đã thụ tinh tạo thành phôi sẽ xuất hiện 2 tiền nhân và 2 cực cầu. Sau đó phôi được đánh giá ghi điểm ở từng thời điểm 40 giờ, 68 giờ và 112 giờ sau khi thụ tinh. Số lượng và hình thể của nhân, số phôi bào, và thể loại mảnh vụn được thu thập để đánh giá chất lượng.

-Sinh thiết phôi bào: Dùng kim sinh thiết hút nhẹ nhàng 1 phôi bào vào ngày thứ 3 (66-68 giờ sau tiêm tinh trùng) khi phôi có ít nhất 4 phôi bào và có số lượng mảnh vụn không quá 30%. Sau đó, phôi lại được chuyển vào môi trường nuôi cấy cho đến ngày 5 hay 6.

-Phân tích di truyền bằng phương pháp a-CGH: Phôi bào lấy ra được cho vào PCR tube và được gửi tới phòng xét nghiệm di truyền Genesis Genetics (Detroit, Michigan, USA) để đánh giá 23 cặp NST của phôi bằng phương pháp a-CGH. Tại phòng xét nghiệm di truyền, phôi bào được làm phân rã. DNA của phôi bào cần xét nghiệm và DNA chứng được nhân lên bằng phương pháp SurePlex (BlueGnome, UK). DNA của phôi bào cần xét nghiệm và DNA chứng được đánh dấu bằng hệ thống đánh dấu huỳnh quang theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất (BlueGnome, UK). Thời gian để đánh dấu là 3 giờ. Sau đó, DNA đã được đánh dấu sẽ được tiếp xúc với chip DNA (24Sure-BlueGnome) và được ủ qua đêm. Sáng hôm sau, chip DNA được ngâm 10 phút ở dung dịch 2x SSC/0,05% Tween-20 ở nhiệt độ khoảng 25 độ C, sau đó 10 phút ở dung dịch 1x SSC ở nhiệt độ 25 độ C, tiếp theo ở 0,1x SSC trong 5 phút ở nhiệt độ 59 độ C và cuối cùng 1 phút trong dung dịch 0,1 x SSC ở nhiệt độ 25 độ C. Chip DNA được làm khô trong 3 phút và được đưa vào máy quét hình. Hình ảnh thu được sẽ được phân tích sử dụng phần mềm Bluefuse (BlueGnome, UK). Chẩn đoán thừa thiếu NST nếu 15 hay hơn 15 đầu dò bị lệch khỏi giới hạn bình thường theo phương pháp 24Sure.

-Chuyển phôi vào buồng tử cung: Phôi bình thường sẽ được chuyển vào buồng tử cung của người mẹ hoặc được dự trữ đông lạnh khi phát triển thành phôi nang.

-Theo dõi các phôi bị LBNST (sau khi xét nghiệm): Phôi LBNST được nuôi cấy trong tủ cấy để theo dõi sự phát triển thành phôi nang. Những phôi này nếu phát triển thành phôi nang nếu được sự chấp thuận của bệnh nhân sẽ được sinh thiết lại bằng phương pháp sinh thiết nguyên bào lá nuôi. Từ 2 đến 6 nguyên bào lá nuôi được sinh thiết và chuyển

vào ống PCR để gửi đi xét nghiệm phòng xét nghiệm di truyền Genesis Genetics để xét nghiệm bằng phương pháp a-CGH.

### 2.3 Các chỉ số, biến số nghiên cứu

**2.3.1 Các chỉ số về đặc điểm mẫu nghiên cứu:** Số lượng phôi bào (PB), độ đồng đều của PB, tỷ lệ mảnh vụn, khả năng phát triển thành phôi nang, tốc độ phát triển của phôi nang (các giai đoạn của phôi nang), chất lượng phôi nang, khả năng tự sửa chữa của phôi, tuổi mẹ, nguyên nhân vô sinh, tiền sử sản khoa, nồng độ FSH cơ bản.

**2.3.2 Các chỉ số về kết quả a-CGH:** tỷ lệ LBNST, tỷ lệ phôi bình thường (BT), tỷ lệ LB trên 1 cặp, 2 cặp, 3 cặp và  $\geq 3$  cặp NST.

### 2.3.3 Các tiêu chuẩn có liên quan đến nghiên cứu

**\*Nồng độ FSH trong máu:** Nồng độ FSH 10 mIU/ml được lấy làm điểm cắt để phân biệt giữa bệnh nhân bị giảm dự trữ buồng trứng và bệnh nhân có buồng trứng bình thường về sinh lý.

**\*Đánh giá phôi giai đoạn phân chia (3 ngày sau thụ tinh).**

-Đánh giá phôi giai đoạn phân chia dựa vào đặc điểm quan sát phôi như: số lượng PB: phôi có 4-6 PB = chậm phát triển; phôi có 7-9 PB = phát triển bình thường; phôi có  $\geq 10$  PB = phát triển nhanh.

-Số lượng mảnh vụn trong phôi (% mảnh vụn so với tổng thể tích phôi):  $\leq 5\%$  mảnh vụn = ít; 6-15% mảnh vụn = trung bình; 16-30% mảnh vụn = nhiều;  $>30\%$  mảnh vụn = rất nhiều.

-Sự phân bố mảnh vụn trong phôi: tập trung = mảnh vụn nằm tập trung tại một vị trí; Rải rác = mảnh vụn nằm rải rác giữa các phôi bào.

-Kích thước phôi bào: đồng đều = các PB có kích thước tương đối bằng nhau; không đồng đều = các PB có kích thước khác nhau ( $\geq 25\%$ ).

**\*Đánh giá phôi nang ngày 5 và 6**

-Đánh giá bước 1 dựa vào khoang phôi nang và hiện tượng thoát màng

- Giai đoạn 1: phôi nang giai đoạn sớm (early blastocyst): Khoang dịch chiếm dưới  $\frac{1}{2}$  tổng thể tích của phôi
- Giai đoạn 2: phôi nang (blastocyst): Khoang dịch chiếm trên  $\frac{1}{2}$  tổng thể tích của phôi
- Giai đoạn 3: phôi nang đầy (full blastocyst): Khoang dịch chiếm hầu hết thể tích của phôi
- Giai đoạn 4: phôi nang rộng (expanded blastocyst): Khoang dịch phát triển rộng làm cho màng trong suốt bắt đầu mỏng dần.
- Giai đoạn 5: phôi nang đang thoát màng (hatching blastocyst): nguyên bào lá nuôi bắt đầu thoát ra khỏi màng trong suốt
- Giai đoạn 6: phôi nang đã thoát màng (hatched blastocyst): phôi nang đã hoàn toàn thoát ra khỏi màng trong suốt
- Đánh giá bước 2:

-Đối với phôi nang từ giai đoạn 2 đến giai đoạn 6, cần phải đánh giá bước 2 về đặc điểm nguyên bào phôi (Inner Cell Mass/ICM) và nguyên bào lá nuôi (Trophectoderm/TE) như sau :

- Đánh giá nguyên bào phôi: loại A = khi có rất nhiều PB liên kết chặt chẽ; loại B = khi vài PB liên kết lỏng lẻo; loại C = khi có rất ít PB; loại D = khi không thấy ICM
- Đánh giá nguyên bào lá nuôi: loại A = nhiều PB liên kết tạo thành biểu mô kết; loại B = vài PB tạo thành biểu mô rời rạc; loại C = có vài PB lớn.

### 2.5 Xử lý số liệu

Số liệu thu được sẽ được xử lý bằng phương pháp tính thống kê sau:

#### \*Phép tính thập phân để xác định tỷ lệ

Khi bình phương để xác định sự khác nhau giữa 2 tỷ lệ có ý nghĩa thống kê khi khi bình phương  $\geq 3,84$  tương ứng với  $p < 0,05$  (định tính).  
 $(ad - bc)^2 \cdot N$

Khi bình phương (Chi square) =  $\frac{(ad - bc)^2 \cdot N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$

#### \*Phép tính nguy cơ tương đối (Relative Risk/RR)

RR biểu thị cụ thể cách đo lường hướng định lượng về hậu quả (LBNST) tăng cao gấp bao nhiêu lần khi có yếu tố nguy cơ tác động so với nhóm chứng không có yếu tố nguy cơ tác động. Cách tính dựa vào bảng 2x2 như sau (bảng 2.1):

**Bảng 2.1:** Bảng tính thống kê giữa yếu tố chỉ báo và tỷ lệ LBT

Yếu tố nguy cơ (chỉ báo)	Tình trạng thật về NST của phôi		
	LBNST (có bệnh)	Bình thường (không có bệnh)	Cộng
Có mặt (+)	a (+ thật)	b (+ giả)	a + b
Không có mặt (-)	c (- giả)	d (- thật)	c + d
Cộng	a + c	b + d	a+b+c+d = N

Nguy cơ tương đối (relative risk)  $RR = (a/a+b) / (c/c+d)$

#### \*Tỷ số khả năng (likelihood ratio/ LR)

LR dùng để đánh giá giá trị (hay sự chính xác) của một yếu tố (phương pháp) chẩn đoán. Có 2 loại LR:

LR+ là tỷ số của tỷ lệ dương tính thật (có yếu tố chỉ báo thì phôi bị LBT) và tỷ lệ dương tính giả (có yếu tố chỉ báo, nhưng phôi bình thường).

$LR(+) = (a/a+c) / (b/b+d)$

LR(+) cao hơn 1 có nghĩa là khi có mặt yếu tố lâm sàng (yếu tố chỉ báo) cho thấy khả năng phôi bị LBT. LR (+) càng cao càng có giá trị.

LR- là tỷ số của tỷ lệ âm tính giả (phôi bị LBT khi không có yếu tố chỉ bào) và tỷ lệ âm tính thật (không có yếu tố chỉ báo thì phôi bình thường).  
 $LR(-) = (c/a+c) / (d/b+d)$  thường dưới 1, càng thấp càng có giá trị.

## 2.6 Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu này được tiến hành sau khi đã được sự chấp thuận của hội đồng khoa học, đạo đức của Trường Đại học Y Hà Nội. Đối tượng nghiên cứu tự nguyện tham gia nghiên cứu sau khi được cung cấp đầy đủ các thông tin cần thiết về nghiên cứu. Nghiên cứu chỉ được tiến hành khi có sự cam kết giữa bệnh nhân và Red Rock Fertility Center.

## Chương 3: KẾT QUẢ

### 3.1 Đặc điểm của bệnh nhân có phôi được xét nghiệm bằng phương pháp a-CGH

**Bảng 3.1:** Đặc điểm tuổi mẹ

Tuổi	Số bệnh nhân được lấy phôi	Số lượng phôi
<35	93 (45,8 %)	640 (51 %)
35-40	83 (40,9 %)	481 (38,3 %)
>40	27 (13,3%)	136 (10,7 %)
<b>Cộng</b>	203 (100%)	1257 (100 %)

*Nhận xét:* Gần ½ số bệnh nhân đến sinh thiết phôi để chẩn đoán LBNST dưới 35 tuổi (45,8 %) với tổng số phôi chiếm hơn 50%. Trên 13% bệnh nhân trên 40 tuổi với tổng số phôi chiếm hơn 10%.

### 3.2 Tỷ lệ LBNST ở phôi ngày 3 sau thụ tinh

#### 3.2.1 Tỷ lệ LBNST và mức độ LBNST ở 1257 phôi ngày 3

**Bảng 3.2:** Tỷ lệ LBNST và mức độ LBNST

Số phôi được xét nghiệm	Số phôi bị LBNST = 783 (62,3%)				Số phôi có xét nghiệm cụ thể từng cặp NST = 877	
	LBNST được xác định theo từng cặp NST			LBNST phức tạp, không xác định được theo cặp NST	Phôi bị LBNST	Phôi BT
	LB ở 1 cặp NST	LB ở 2 cặp NST	LB ở 3 cặp NST	LB ≥ 4 cặp NST		
<b>1257</b>	231	127	45	380	403	<b>474 (37,7%)</b>

*Nhận xét:* Tỷ lệ LBNST của phôi ngày 3 cao 62,3%.

### 3.2.2 Tỷ lệ LBNST phân bố theo cặp NST

**Bảng 3.3:** Tỷ LBNST thể phân bố theo các cặp NST từ thấp đến cao

Cặp NST	Số lượng cặp NST	Số cặp bị LBNST	Số cặp không LBNST	RR
Cặp số 5	877	10 (1,1%)	867 (98,9%)	1,0
Cặp số 10	877	10 (1,1%)	867 (98,9%)	1,0
Cặp số 8	877	11 (1,3%)	866 (98,7%)	1,18
Cặp số 7	877	12 (1,4%)	865 (98,6%)	1,27
Cặp số 17	877	12 (1,4%)	865 (98,6%)	1,27
Cặp số 3	877	13 (1,5%)	864 (98,5%)	1,36
Cặp số 6	877	15 (1,7%)	862 (98,3%)	1,55
Cặp số 2	877	17 (1,9%)	860 (98,1%)	1,73
Cặp số 12	877	17 (1,9%)	860 (98,1%)	1,73
Cặp số 4	877	18 (2,1%)	859 (97,9%)	1,91
Cặp số 11	877	18 (2,1%)	859 (97,9%)	1,91
Cặp số 14	877	19 (2,2%)	858 (97,8%)	2,0
Cặp số 20	877	24 (2,7%)	853 (97,3%)	2,45
Cặp số 1	877	25 (2,9%)	852 (97,1%)	2,64
Cặp số 18	877	28 (3,2%)	849 (96,8%)	2,91
Cặp số 13	877	29 (3,3%)	848 (96,7%)	3,0
Cặp số 9	877	30 (3,4%)	847 (96,6%)	3,09
Cặp XY	877	35 (4%)	842 (96%)	3,64
Cặp số 21	877	44 (5,0%)	833 (95%)	4,55
Cặp số 15	877	49 (5,6%)	828 (94,4%)	5,09
Cặp số 16	877	54 (6,2%)	823 (93,8%)	5,64
Cặp số 19	877	56 (6,4%)	821 (93,6%)	5,82
Cặp số 22	877	74 (8,4%)	803 (91,6%)	7,64

(Ghi chú: 380 phôi bị LBNST phức tạp không có kết quả chính các cặp nào không tính trong bảng này)

Nhận xét: Tất cả các cặp NST đều bị LB theo các tỷ lệ khác nhau.

### 3.3 Khả năng tự sửa chữa của phôi ngày 3 bị LBNST

#### 3.3.1 Tỷ lệ phôi tự sửa chữa ở giai đoạn phôi nang

Trong tổng số 1257 phôi được sinh thiết ngày 3 có 253 phôi bị LBNST nhưng vẫn có thể phát triển được thành phôi nang. Trong số 253 phôi này vào ngày 5 và 6 sau khi thụ tinh, 112 phôi nang được sự đồng ý của bệnh nhân tiến hành sinh thiết xét nghiệm dựa trên phân tích tế bào lá nuôi cho kết quả sau (bảng 3.4):

**Bảng 3.4:** Kết quả đánh giá lại bằng sinh thiết tế bào lá nuôi ngày 5-6 của phôi nang phát triển từ phôi ngày 3 có LBNST

Số phôi nang ngày 5-6 phát triển từ phôi có LBNST ở ngày 3	LBNST %	Bình thường (tự sửa chữa)
112	79 (70,5%)	33 (29,5%)

Nhận xét: 29,5% phôi bị LBNST ở ngày thứ 3 có khả năng tự sửa chữa trở lại bình thường (qua xét nghiệm tế bào lá nuôi).

#### 3.3.2 Khả năng tự sửa chữa của phôi LBNST ngày 3 và tuổi mẹ

**Bảng 3.5:** Khả năng tự sửa chữa của phôi và tuổi mẹ

Tuổi	Số phôi xét nghiệm	Tự sửa chữa (bình thường)	Không tự sửa chữa (LBNST)	RR
< 35	46	22 (47,8%) <sup>a</sup>	24 (52,2%)	1
35-40	50	11 (22%) <sup>b</sup>	39 (78%)	2,17
>40	16	0 (0%) <sup>c</sup>	16 (100%)	
Cộng	112	33 (29,5%)	79 (70,5%)	

$P^{a,b} < 0,025$ ;  $P^{a,c} < 0,005$

Nhận xét: Khả năng phôi tự sửa chữa (phôi bị LBNST ngày 3 trở lại bình thường ở ngày 5 và 6 khi ở giai đoạn phôi nang) phụ thuộc vào tuổi mẹ: \*Tuổi mẹ 35-40 thì khả năng tự sửa chữa giảm trên 2 lần so với khi tuổi mẹ trẻ < 35; \*Tuổi mẹ > 40, phôi bị LBNST có thể phát triển thành phôi nang nhưng không có khả năng tự sửa chữa.

### 3.4 Một số yếu tố liên quan đến LBNST qua phân tích đơn biến

#### 3.4.1 Tiền sử sảy thai, điều trị vô sinh và LBNST

**Bảng 3.6:** Tiền sử sảy thai, điều trị vô sinh và LBNST

Tiền sử	LBNST	BT	Cộng	RR
Đã bị sảy thai/ hcg (+)	48 (60%)	32	80	1,04
Sau kỹ thuật IUI bị thất bại	175 (66%)	90	265	1,15
Sau kỹ thuật IVF bị thất bại	146 (76%)	46	192	1,32
Chưa điều trị/phương pháp khác	414 (57,5%)	306	720	1
Cộng	783	474	1257	

Nhận xét: Ở bệnh nhân đã thất bại điều trị IVF, tỷ lệ LBNST cao nhất.

### 3.4.2 Nguyên nhân vô sinh và LBNST

**Bảng 3.7:** Nguyên nhân vô sinh và LBNST

Nguyên nhân vô sinh	LBNST	BT	Cộng	RR
Rối loạn phóng noãn	14 (66,7%)	7 (33,3%)	21	2,44
Không rõ nguyên nhân	359 (65,9%)	186 (34,1%)	545	2,41
Do yếu tố tinh trùng	258 (61,7%)	160 (38,3%)	418	2,26
Buồng trứng đa nang	73 (60,3%)	48 (39,7%)	121	2,21
Do vòi trứng	29 (54,7%)	24 (45,3%)	53	2
Do lạc nội mạc tử cung	47 (53,4%)	41 (46,6%)	88	1,96
Do tử cung	3 (27,3%)	8 (72,7%)	11	1
Cộng	783	474	1257	

Nhận xét: Rối loạn phóng noãn, buồng trứng đa nang và yếu tố tinh trùng và vô sinh không rõ nguyên nhân tương ứng với LBNST > 60%.

### 3.4.3 Tuổi mẹ liên quan đến LBNST

**Bảng 3.8:** Tuổi mẹ và nguy cơ LBNST

Tuổi mẹ	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%				
>40	125	91,9 <sup>a</sup>	11	8,1	136	1,85	8,5	0,74
35-40	340	70,7 <sup>b</sup>	141	29,3	481	1,42	1,7	0,69
<35	318	49,7 <sup>c</sup>	322	50,3	640	1		
Cộng	783		474		1257			

(Ghi chú: RR và LR so sánh với tuổi mẹ trẻ <35)

P<sup>a,b</sup> <0,001; P<sup>a,c</sup> <0,001; P<sup>b,c</sup> <0,001

Nhận xét: Tuổi mẹ càng tăng thì tỷ lệ LBNST càng cao

### 3.4.4 Nồng độ FSH cơ bản của mẹ liên quan đến LBNST

**Bảng 3.9:** Nồng độ FSH cơ bản và LBNST

FSH (mIU/ml)	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	P	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%					
>15	106	76,3	33	23,7	139	1,3	<0,001	1,93	0,93
≤15	677	60,5	441	39,5	1118	1			
Cộng	783		474		1257				

Nhận xét: FSH cơ bản >15 mIU/ml tương ứng với tỷ lệ LBNST 76,3%

### 3.4.5 Tốc độ phát triển và hình thái của phôi ngày 3 và LBNST

\*Tốc độ phát triển của phôi biểu thị qua số lượng PB và LBNST

**Bảng 3.10:** Sự phát triển của phôi ngày 3 và LBNST

Số phôi bào	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%				
4-6	148	83,1 <sup>a</sup>	30	16,9	178	1,48	3,1	0,82
7-9	445	56,3 <sup>b</sup>	345	43,7	790	1		
≥10	190	65,7 <sup>c</sup>	99	34,3	289	1,17	1,35	0,9
Cộng	783				1257			

(Ghi chú: RR và LR so sánh với phôi có 7-9 tế bào)

P<sup>a,b</sup> <0,001; P<sup>b,c</sup> <0,001; P<sup>a,c</sup> <0,001

Nhận xét: Phôi phát triển chậm hay quá nhanh đều có nguy cơ bị LBNST cao hơn phôi phát triển bình thường (P<0,001); Phôi phát triển chậm có 4-6 PB ngày 3 có tỷ lệ LBNST cao hơn phôi phát triển nhanh có ≥ 10 PB ngày 3 (P < 0,001).

\*Độ đồng đều của kích thước phôi bào ngày 3 và LBNST

**Bảng 3.11:** Sự đồng đều của các phôi bào và LBNST

Độ đồng đều	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	P	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%					
Không đều	497	81,6	112	18,4	609	1,85	<0,001	2,69	0,48
Đều	286	44,1	362	55,9	648	1			
Cộng	783		474		1257				

Nhận xét: Kích thước phôi bào ngày 3 không đồng đều có LBNST cao.

\*Xuất hiện mảnh vụn trong phôi ngày 3 và LBNST

**Bảng 3.12:** Sự xuất hiện mảnh vụn trong phôi và LBNST

% mảnh vụn	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%				
16-30%	193	75,1 <sup>a</sup>	64	24,9	257	1,39	1,96	0,77
6-15%	276	65,7 <sup>b</sup>	144	34,3	420	1,21	1,33	0,82
0-5%	314	54,1 <sup>c</sup>	266	45,9	580	1		
Cộng	783		474		1257			

(Ghi chú: RR và LR so sánh với phôi có 0-5% mảnh vụn)

P<sup>a,b</sup> <0,025; P<sup>a,c</sup> <0,001; P<sup>a,d</sup> <0,001; P<sup>b,c</sup> <0,001

Nhận xét: tỷ lệ mảnh vụn tăng thì khả năng bị LBNST càng cao (P<0,025).

\*Sự phân bố vị trí mảnh vụn trong phôi ngày 3 và LBNST

**Bảng 3.13:** Sự phân bố mảnh vụn và LBNST

Phân bố mảnh vụn	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	P	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%					
Rải rác	584	77,6	169	22,4	753	1,94	<0,001	2	0,39
Tập trung ngoại vi	191	40,1	285	59,9	476	1			

Cộng	775	454	1229					
------	-----	-----	------	--	--	--	--	--

(Ghi chú: 28 phôi không có mảnh vụn không tính trong bảng này)

Nhận xét: Phôi có mảnh vụn phân bố rải rác tương ứng tăng tỷ lệ LBT.

### 3.4.6 Tốc độ phát triển thành phôi nang, hình thái của phôi nang

\*Sự phát triển của phôi từ ngày 3 đến giai đoạn phôi nang (biểu thị bằng khả năng hình thành phôi nang) và LBNST

**Bảng 3.14:** Sự phát triển thành phôi nang và LBNST

Phát triển	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	P	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%					
Chậm/ngừng	530	77,4	155	22,6	685	1,75	<0,001	2,1	0,48
Phôi nang	253	44,2	319	55,8	572	1			
Cộng	783		474		1257				

Nhận xét: LBNST sẽ ảnh hưởng đến sự phát triển thành phôi nang.

\*Sự phát triển của phôi từ ngày 3 đến giai đoạn phôi nang (biểu thị bằng thời điểm hình thành phôi nang sớm hay muộn) và LBNST

**Bảng 3.15:** So sánh LBNST ở phôi nang ngày 5 và phôi nang ngày 6

Phát triển Phôi nang	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	P	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%					
Ngày 6	156	66,7	78	33,3	234	2,3	<0,001	2,52	0,51
Ngày 5	97	28,7	241	71,3	338	1			
Cộng	253		319		572				

(Ghi chú: 685 phôi không đủ tiêu chuẩn không tính trong bảng này)

Nhận xét: Phôi phát triển thành phôi nang vào ngày 6 có tỷ lệ LBNST cao hơn so với phôi nang vào ngày 5.

\*Tốc độ phát triển của phôi nang vào ngày 5 và LBNST

**Bảng 3.16:** Tốc độ phát triển của phôi vào ngày 5 và LBNST

Giai đoạn phát triển của phôi nang	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%				
Ngừng phát triển	274	91,6 <sup>a</sup>	25	8,4	299	4,2	6,58	0,16
Phát triển chậm: phôi đầu	97	80,8 <sup>b</sup>	23	19,2	120	3,7	5,6	0,37
Phát triển chậm: Giai đoạn 1	315	63 <sup>c</sup>	185	37	500	2,9	1,67	0,27
Giai đoạn 2	33	43,4 <sup>d</sup>	43	56,6	76	2	2,04	0,73
Giai đoạn 3-4	18	36,7 <sup>e</sup>	31	63,3	49	1,7	1,8	0,85
Giai đoạn 5-6	46	21,6 <sup>f</sup>	167	78,4	213	1		
Cộng	783		474		1257			

(Ghi chú: RR và LR so sánh với giai đoạn 5-6)

P<sup>a,b</sup><0,005; P<sup>a,c</sup><0,001; P<sup>a,d</sup><0,001; P<sup>a,e</sup><0,001; P<sup>a,f</sup><0,001; P<sup>b,c</sup><0,001; P<sup>b,d</sup><0,001; P<sup>b,e</sup><0,001; P<sup>b,f</sup><0,001; P<sup>c,d</sup><0,005; P<sup>c,e</sup><0,001; P<sup>c,f</sup><0,001; P<sup>d,e</sup>>0,05; P<sup>d,f</sup><0,001; P<sup>e,f</sup><0,05

Nhận xét: Phôi nang phát triển càng chậm làm cho nguy cơ LBNST tăng.

\*Mức độ LBNST và khả năng hình thành phôi nang

**Bảng 3.17:** Mức độ LBNST và khả năng hình thành phôi nang

Mức độ LBNST	Phôi nang		Ngừng, chậm phát triển		RR1	RR2	Tổng
	Số phôi	%	Số phôi	%			
Bình thường	319	67,3 <sup>a</sup>	155	32,7	1		474
LB ở 1 cấp NST	121	52,4 <sup>b</sup>	110	47,6	0,78	1	231
LB ở 2 cấp NST	53	41,7 <sup>c</sup>	74	58,3	0,62	0,8	127
LB ở 3 cấp NST	14	31,1 <sup>d</sup>	31	68,9	0,46	0,59	45
LB >3 cấp NST	65	17,1 <sup>e</sup>	315	82,9	0,25	0,33	380
Tổng	572		685				1257

P<sup>a,b</sup><0,001; P<sup>a,c</sup><0,001; P<sup>a,d</sup><0,001; P<sup>a,e</sup><0,001; P<sup>b,c</sup>>0,05; P<sup>b,d</sup><0,025; P<sup>b,e</sup><0,001; P<sup>c,d</sup>>0,05; P<sup>c,e</sup><0,001; P<sup>d,e</sup><0,05

Nhận xét: Khả năng phát triển thành phôi nang có xu hướng giảm dần khi mức độ LBT tăng.

\*Giới tính của phôi (xác định trên phôi nang phát triển bình thường ở giai đoạn 2-6) vào ngày 5 sau thụ tinh và LBNST

Trong tổng số 1257 phôi được xét nghiệm a-CGH, 685 phôi chậm hay ngừng phát triển, còn lại 572 phôi phát triển thành phôi nang (ngày 5 và 6), trong đó 338 phôi phát triển thành phôi nang ngày 5. Trong số 338 phôi nang ngày 5 có 317 phôi nang có kết quả số lượng NST giới tính bình thường. Sau đây là kết quả phân tích giới tính và LBNST trên 317 phôi nang nói trên.

**Bảng 3.18:** Giới tính của phôi nang ngày 5 và LBNST

Giới tính	LBNST		Bình thường		P	Tổng
	Số phôi	%	Số phôi	%		
XX	41	25,8	118	74,2	>0,05	159
XY	35	22,2	123	77,8		158
Tổng	76		241			317

Nhận xét: Tỷ lệ giới tính 1:1 đối với phôi phát triển bình thường vào ngày thứ 5. Tỷ lệ LBNST không bị chi phối qua giới tính.

\*Chất lượng của mầm phôi (ICM) và LBNST

**Bảng 3.19:** Chất lượng của mầm phôi và LBNST

Mầm phôi	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%				
Loại C-D	58	80,6 <sup>a</sup>	14	19,4	72	2,74	6	0,57
Loại B	131	46,3 <sup>b</sup>	152	53,7	283	1,57	1,34	0,66



Loại A	64	29,5 <sup>c</sup>	153	70,5	217	1		
Cộng	253		319		572			

(Ghi chú: RR và LR so sánh với mâm phôi loại A)

$P^{a,b} < 0,001$ ;  $P^{a,c} < 0,001$ ;  $P^{b,c} < 0,001$

Nhận xét: Chất lượng ICM giảm dần khi tỷ lệ LBNST tăng ( $P < 0,001$ ).

### 3.3.6.7 Chất lượng của nguyên bào lá nuôi phôi (TE) và LBNST

**Bảng 3.20:** Chất lượng của nguyên bào lá nuôi phôi và LBNST

Nguyên bào lá nuôi	LBNST		BT		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%				
Loại C	67	79,8 <sup>a</sup>	17	20,2	84	2,1	2,69	0,41
Loại B	157	38,1 <sup>b</sup>	255	61,9	412	0,99	0,99	1
Loại A	29	38,2 <sup>c</sup>	47	61,8	76	1		
Cộng	253		319		572			

(Ghi chú: RR và LR so sánh với loại A)

$P^{a,b} < 0,001$ ;  $P^{a,c} < 0,001$ ;  $P^{b,c} > 0,05$

Nhận xét: Ở phôi nang có TE chất lượng kém (loại C) có LBNST cao.

## 3.5 Một số yếu tố liên quan đến LBNST qua phân tích đa biến

### 3.5.1 Phân tích đa biến 2 yếu tố: Số lượng phôi bào và tuổi mẹ

**Bảng 3.21:** Liên quan giữa tuổi mẹ; số lượng PB và LBNST

2 yếu tố	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	P	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%					
4-6 phôi bào Tuổi >35	98	87,5	14	12,5	112	2,02	<0,001	6,3	0,69
≥10 phôi bào Tuổi >35	107	75,9	34	24,1	141	1,75	<0,001	2,95	0,72
7-9 phôi bào Tuổi <35	185	43,4	241	56,6	426	1			
Cộng	390		289		679				

Ghi chú: RR và LR so sánh với phôi có 7-9 tế bào ở mẹ <35 tuổi (nhóm chứng); 427 phôi không đủ tiêu chuẩn không tính trong bảng này.

Nhận xét: Khi so sánh với nhóm chứng, thì 2 yếu tố phôi phát triển nhanh hay chậm ở mẹ lớn tuổi tác động kết hợp làm tăng nguy cơ LBNST lên 1,75 - 2 lần.

### 3.5.2 Phân tích đa biến 2 yếu tố: số lượng phôi bào và sự có mặt mảnh vụn

**Bảng 3.22:** Liên quan giữa số PB; mảnh vụn >5% và tỷ lệ LBNST

2 yếu tố	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	P	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%					
4-6 PB MV >5%	129	83,2	26	16,8	155	1,69	<0,001	3,5	0,69
≥10 PB MV >5%	101	66,9	50	33,1	151	1,36	<0,001	1,73	0,83
7-9 PB	206	49,2	213	50,8	419	1			

MV <5%								
Cộng	436		289		725			

Ghi chú: RR và LR so sánh với phôi có 7-9 tế bào và 0-5% mảnh vụn (nhóm chứng)

Nhận xét: Khi so sánh với nhóm chứng \*nếu 2 yếu tố số PB ≤6 và tỷ lệ mảnh vụn >5% cùng tác động, sẽ tăng nguy cơ LBNST lên 1,69 lần; \*nếu 2 yếu tố số PB ≥10 và số lượng mảnh vụn trung bình >5% cùng tác động sẽ tăng nguy cơ LBNST lên 1,36 lần.

### 3.5.3 Phân tích đa biến 2 yếu tố: độ đồng đều về kích thước phôi bào và sự có mặt mảnh vụn

**Bảng 3.23:** Phôi bào không đều, mảnh vụn > 15% và LBNST

2 Yếu tố	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	P	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%					
không đều MV >15%	157	86,3	25	13,7	182	1,98	<0,001	5,36	0,66
đều MV ≤ 15%	250	43,6	323	56,4	573	1			
Cộng	407		348		755				

Nhận xét: Khi so sánh với phôi có PB đều với ≤ 15% mảnh vụn, thì 2 yếu tố PB không đều và mảnh vụn >15% tác động kết hợp làm tăng nguy cơ LBNST lên 1,98 lần.

### 3.5.4 Phân tích đa biến 3 yếu tố: Tốc độ phát triển của phôi nhanh/chậm, PB không đều, mảnh vụn >15%

**Bảng 3.24:** Phôi phát triển nhanh/chậm, PB không đều, mảnh vụn > 15% và LBNST

3 Yếu tố	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%				
≥ 10 phôi bào không đều MV >15%	26	89,7 <sup>a</sup>	3	10,3	29	2,3	12	0,88
7-9 phôi bào đều MV ≤ 15%	168	39 <sup>b</sup>	263	61	431	1		
≤ 6 phôi bào không đều MV >15%	62	84,9 <sup>c</sup>	11	15,1	73	2,2	6,75	0,76
Cộng	256		277		533			

$P^{a,b} < 0,001$ ;  $P^{b,c} < 0,001$ ;  $P^{a,c} > 0,05$

**Nhận xét:** So với phôi có 7-9 PB đều với  $\leq 15\%$  mảnh vụn thì \*khi có 3 yếu tố số PB  $\geq 10$ , PB không đều, mảnh vụn  $> 15\%$  kết hợp làm tăng nguy cơ LBNST lên 2,3 lần; \* khi 3 yếu tố số PB  $\leq 6$ , PB không đều, mảnh vụn  $> 15\%$  kết hợp làm tăng nguy cơ LBNST lên 2,2 lần.

### 3.5.5 Phân tích đa biến 3 yếu tố: Số phôi bào, sự có mặt mảnh vụn, và vị trí mảnh vụn

**Bảng 3.25:** Phôi phát triển nhanh/chậm, mảnh vụn  $> 15\%$ ; phân bố rải rác và LBNST

3 Yếu tố	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%				
$\geq 10$ PB MV $> 15\%$ Rải rác	34	79,1 <sup>a</sup>	9	20,9	43	2,3	5,61	0,8
7-9 PB MV $\leq 15\%$ Tập trung	114	35 <sup>b</sup>	212	65	326	1		
$\leq 6$ PB MV $> 15\%$ Rải rác	77	86,5 <sup>c</sup>	12	13,5	89	2,5	7,5	0,63
Cộng	225		233		458			

P<sup>a,b</sup> < 0,001; P<sup>b,c</sup> < 0,001; P<sup>a,c</sup> > 0,05

**Nhận xét:** so sánh với phôi có 7-9 PB với  $\leq 15\%$  mảnh vụn nằm tập trung thì \*khi có 3 yếu tố số PB  $\geq 10$ , mảnh vụn  $> 15\%$  rải rác kết hợp làm tăng nguy cơ LBNST lên 2,3 lần; \* khi 3 yếu tố số PB  $\leq 6$ , mảnh vụn  $> 15\%$  rải rác tác động kết hợp làm tăng nguy cơ LBNST lên 2,5 lần.

## Chương 4: BÀN LUẬN

### 4.1 Bàn luận về phương pháp phân tích di truyền

#### 4.1.1 Bàn luận về ảnh hưởng của việc sinh thiết phôi

\***Sinh thiết phôi ngày 3:** Hiện tại còn hai quan điểm liên quan đến ảnh hưởng của sinh thiết phôi đến sự phát triển thai về sau

-Quan điểm cho rằng sinh thiết phôi bào không ảnh hưởng đến phôi: (Vũ và CS 2012, Nguyễn và CS 2013).

-Quan điểm cho rằng sinh thiết phôi bào có ảnh hưởng đến phôi ít hoặc nhiều (Scott 2013).

-Phôi ở giai đoạn phân chia có tỷ lệ phôi thể khảm cao vì vậy chẩn đoán chỉ dựa vào việc phân tích một tế bào không đại diện cho toàn bộ phôi do vậy chẩn đoán không hoàn toàn đáng tin cậy.

\***Sinh thiết phôi nang:** nhiều chất liệu di truyền hơn nên kết quả chính xác hơn; an toàn hơn do một lượng nhỏ trong tổng số phôi bào được lấy ra; Phôi có khả năng sống phát triển với tốc độ bình thường thành phôi nang có khả năng tự sửa chữa lệch bội thể.

#### 4.2.2 Bàn luận về phương pháp a-CGH

\***Ưu điểm của phương pháp a-CGH:** khả năng đánh giá trên toàn bộ 46 NST.

\***Hạn chế của phương pháp a-CGH:** không thể phát hiện các trường hợp bất thường trong cấu trúc của nhiễm sắc thể ở dạng cân bằng, không phát hiện được một số đa bội như tam bội (triploid) (69,XXX); tứ bội (tetraploidies) (92,XXXX hay 92,

#### 4.2 Bàn luận về tỷ lệ LBNST của phôi ngày 3

Trong NC này, tỷ lệ LBNST là 62,3%, phù hợp với các NC trước đây cho là phôi người trước làm tổ có tỷ lệ LBNST cao. Tỷ lệ này cao hơn so với một số NC khác sử dụng FISH do phương pháp FISH đánh giá 5-12 cặp NST nên tỷ lệ âm tính giả cao. Kết quả NC này thấp hơn so với một số NC trước đây có đối tượng là các bệnh nhân có nguy cơ cao.

Kết quả của NC này thấy rằng các cặp NST của phôi ngày 3 đều có nguy cơ bị LBNST. Trong một phôi, hiện tượng LB có thể xảy ra ở 1 hay nhiều NST trong đó LB thể phức tạp hay gặp nhất, khác với NC của Traversa và CS (2011), nghiên cứu trên phôi nang thấy số phôi bị LBNST thấp hơn ở phôi ngày 3 và LB phức tạp ít gặp nhất do LB phức tạp thường bị ngừng phát triển trước khi phát triển thành phôi nang, đúng vào thời điểm mà Traversa chọn phôi nghiên cứu.

Trong NC này thấy là tất cả các cặp NST đều có bị LB, hay gặp nhất ở cặp 22, 19, 16, 15, 21, XY, 9, 13, 18, phù hợp với kết quả của Al-Asma (2012), Rubio (2013), Guitierrez (2011), Franasiak (2014) khi các phương pháp phân tích di truyền khác nhau được sử dụng.

#### 4.5 Bàn luận về khả năng tự sửa chữa của phôi

Thống nhất với kết luận của các NC sử dụng phương pháp FISH, chúng tôi thấy là trong số 112 phôi ngày 3 bị LBNST phát triển thành phôi nang, có 29,5% cho kết quả bình thường sau sinh thiết lại. Tỷ lệ này thấp hơn trong nghiên cứu của Li và cộng sự khi họ thấy tỷ lệ phôi tự sửa chữa là 40%], hay nghiên cứu của Munne và cộng sự khi tỷ lệ tự

sửa chữa rất cao gần 70% do Li và Munne sử dụng FISH 5-9 đầu dò nên tỷ lệ âm tính giả cao, một số phôi bất thường ở các NST không được đánh giá lại được cho là bình thường

Có hai cơ chế giải thích hiện tượng phôi tự sửa chữa: hiện tượng phôi thể khảm cao ở phôi tiền làm tổ và hiện tượng hiện tượng phục hồi tam thể (trisomy rescue).

Một điểm mới chưa được nêu lên trong các NC trước đây là phôi LBNST có thể phát triển thành phôi nang ở cả phụ nữ lớn tuổi nhưng khả năng tự sửa chữa ở người mẹ trên 35 tuổi giảm đáng kể so với ở mẹ trẻ dưới 35 tuổi. Nguyên nhân phụ nữ lớn tuổi khả năng tự sửa chữa kém là do ở nhóm này tỷ lệ LBNST của noãn rất cao do những bất thường xảy ra trong giai đoạn giảm phân và tạo nên bất thường đồng nhất xảy ra ở tất cả các phôi bào sau này.

#### **4.4 Bàn luận về một số yếu tố liên quan đến LBNST phân tích đơn biến**

**4.4.1 Tiền sử điều trị thụ tinh trong ống nghiệm thất bại liên quan đến LBNST:** Trong nghiên cứu này, nhóm bệnh nhân bị thất bại sau điều trị thụ tinh trong ống nghiệm (phôi không làm tổ được hay sảy thai sớm sau khi chuyển phôi) có LBNST cao nhất 76% cao hơn ở các NC sử dụng FISH

**4.4.2 Nguyên nhân vô sinh liên quan đến LBNST:** Rối loạn phóng noãn, buồng trứng đa nang có phôi LBNST cao >60% phù hợp với NC của Gianaroli (2010) do rối loạn phóng thường hay xảy ra các sai sót trong giảm phân hay buồng trứng trải qua quá trình già hóa sinh học. Vô sinh do yếu tố tinh trùng cũng tương ứng với LBNST cao ở phôi >60%, phù hợp với NC của Magli (2009) do LBNST ở tinh trùng cao hơn.

**4.4.3 Tuổi mẹ liên quan đến LBNST:** phôi tạo ra ở người mẹ trẻ dưới 35 tuổi có LBNST là 49,7% và tăng tới 91,9% ở người mẹ trên 40 tuổi. Tuổi mẹ trên 40 là chỉ báo rất quan trọng trong chẩn đoán LBNST.

**4.4.4 Nồng độ FSH cơ bản liên quan đến LBNST:** phụ nữ có nồng độ FSH cơ bản cao trên 15mIU/ml có LBNST cao gấp 1,3 lần so với ở phụ nữ có nồng độ FSH cơ bản thấp  $\leq 15$  mIU/ml, gần phù hợp với kết quả của Nasser (1999) và El-Touky(2002).

**4.4.5 Tốc độ phát triển của phôi ngày 3 liên quan đến LBNST:** có mối liên quan chặt chẽ giữa LBNST và khả năng phát triển của phôi biểu thị qua số lượng phôi bào. LBNST ảnh hưởng xấu tới sự phát triển của Phôi phát triển quá nhanh cũng liên quan đến LBNST giống như phôi

phát triển chậm, tuy nhiên mức độ liên quan không chặt chẽ như đối với phôi phát triển chậm, phù hợp NC của Magli 2007.

#### **4.4.6 Hình thái của phôi ngày 3 liên quan LBNST:**

**\*Sự xuất hiện mảnh vụn và sự phân bố mảnh vụn trong phôi liên quan đến LBNST:** LBNST tăng cùng với hiện tượng tăng số lượng mảnh vụn trong phôi. Cũng giống như nghiên cứu của Magli, NC này thấy khi mảnh vụn phân bố rải rác, LBNST tăng 1,94 lần. Mảnh vụn có liên quan đến tình trạng phôi thể khảm có thể là do các mảnh vụn có thể chứa nhiễm sắc thể sót lại (lagging chromosomes) hay mảnh vụn của nhiễm sắc thể phát sinh từ những sai sót của thoi phân bào Khi mảnh vụn nằm rải rác chứng tỏ mảnh vụn xuất phát từ nhiều phôi bào gây ảnh hưởng càng xấu.

**\*Độ đồng đều của kích thước phôi bào và LBNST:** phôi có kích thước các phôi bào không đồng đều tương ứng với LBNST cao hơn gần 2 lần, phù hợp NC của Magli (2007). Điều này giải thích lý do tại sao phôi có kích thước không đồng đều thường ảnh hưởng đến tỷ lệ làm tổ và có thai.

**4.4.7 Sự phát triển của phôi từ ngày 3 đến giai đoạn phôi nang liên quan đến LBNST:** NC này khẳng định các nghiên cứu sử dụng FISH trước đây là phôi bình thường có khả năng hình thành phôi nang cao hơn phôi LBNST. Tốc độ phát triển của phôi nang càng chậm thì tỷ lệ lệch bội thể càng cao, phù hợp NC của Alfarawati (2011). Phôi phát triển chậm ở giai đoạn phôi dâu hay ngừng phát triển vào ngày 5 là chỉ báo khả năng phôi bị LBNST cao. Phôi phát triển chậm thành phôi nang vào ngày 6 có LBNST cao hơn 2,3 lần so với phôi phát triển thành phôi nang vào ngày 5, (2014). Kết luận của NC này cũng phù hợp với các kết quả lâm sàng thấy là phôi nang ngày 5 thường làm tổ tốt hơn phôi nang hình thành vào ngày 6.

**4.4.8 Mức độ LBNST và khả năng hình thành phôi nang:** Cũng như NC của Alfarawati (2011), Vegas (2014) chúng tôi thấy LBNST có thể xảy ra trên tất cả các cặp nhiễm sắc thể và khả năng phát triển thành phôi nang (giai đoạn 2 đến 6) giảm khi mức độ lệch bội thể tăng.

**4.4.9 Khả năng phát triển thành phôi nang vào ngày 5, và giới tính của phôi liên quan LBNST:** số liệu của chúng tôi chứng minh là phôi nam và phôi nữ có khả năng phát triển thành phôi nang và khả năng bị LBNST như nhau. Có nghĩa là nuôi cấy đến phôi nang không làm cho khuynh hướng chọn nhiều phôi nam hơn.

**4.4.10 Chất lượng của phôi nang liên quan đến LBNST:** NC trước đây cho là LBNST có ảnh hưởng xấu tới sự phát triển của phôi ở giai đoạn phôi nang dẫn tới giảm chất lượng của mầm phôi và nguyên bào lá nuôi, cũng như tốc độ phát triển của phôi nang. Theo nghiên cứu này thì khả năng chuyển phôi nang bị LBNST giảm từ 44,2% xuống còn 31,1% nếu chỉ chuyển phôi nang có chất lượng tốt. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Alfarawati và Kroener. Chất lượng mầm phôi kém (loại C-D) là chỉ báo tiên lượng phôi LBNST có giá trị cao.

**4.5 Bàn luận về một số yếu tố liên quan đến LBNST qua phân tích đa biến**

**4.5.1 Hai yếu tố: tuổi mẹ và tốc độ phát triển của phôi vào ngày 3 liên quan đến LBNST:** Phôi chậm phát triển ở phụ nữ lớn tuổi là chỉ báo tiên lượng phôi LBNST cao. Kết hợp tuổi mẹ < 35, phôi phát triển bình thường có thể tiên lượng thêm 6,3% - 12,9% phôi bình thường so với khi chỉ dựa vào một yếu tố.

**4.5.2 Hai yếu tố: số lượng phôi bào và sự có mặt mảnh vụn liên quan đến LBNST:** Cũng giống kết quả của Magli (2007), NC thấy phôi phát triển bình thường không có hay có ít mảnh vụn thì vẫn gần một nửa số phôi (49,2%) là bị LBNST. Kết hợp 2 yếu tố này có thể tiên lượng thêm 4,9% - 7,1% phôi bình thường so với khi chỉ dựa vào một yếu tố.

**4.5.3 Hai yếu tố: độ đồng đều về kích thước của phôi bào và sự có mặt của mảnh vụn có liên quan đến lệch bội thể:** khi phôi có cả 2 yếu tố có mảnh vụn > 15% có khả năng tiên lượng phôi LBNST cao. Kết hợp 2 yếu tố phôi đồng đều, mảnh vụn ≤ 15% có thể tiên lượng thêm 0,5-14,4% phôi bình thường so với khi chỉ dựa vào một yếu tố.

**4.5.4 Ba yếu tố: số lượng phôi bào, độ đồng đều và sự có mặt của mảnh vụn liên quan LBNST:** khi phôi phát triển nhanh/chậm có kích thước PB không đều và có tỷ lệ mảnh vụn > 15% có khả năng tiên lượng phôi LBNST cao. Kết hợp 3 yếu tố phôi phát triển bình thường, kích thước PB đều, mảnh vụn ≤ 15% có thể tiên lượng thêm 6,1% - 18,1% phôi bình thường so với khi chỉ dựa vào một yếu tố.

**4.4.5 Ba yếu tố: số lượng phôi bào, sự có mặt mảnh vụn và vị trí mảnh vụn liên quan đến lệch bội thể:** Khi phôi phát triển nhanh/chậm, mảnh vụn > 15% phân bố rải rác có khả năng tiên lượng phôi LBNST cao. Kết hợp 3 yếu tố phôi phát triển bình thường, mảnh vụn ≤ 15% phân bố tập trung có thể tiên lượng thêm 21,5-23% phôi bình thường so với khi chỉ dựa vào một yếu tố.

Tóm lại khi kết hợp càng nhiều yếu tố thì khả năng chọn lọc phôi không bị LBNST càng cao. Tuy nhiên có một số yếu tố đơn biến cũng

có giá trị tiên lượng phôi bị LBNST cao như tuổi mẹ trên 40; Phôi phát triển chậm vào ngày 3 và ngày 5 và chất lượng của phôi nang kém.

## KẾT LUẬN

Sử dụng phương pháp a-CGH đánh giá toàn bộ 23 cặp nhiễm sắc thể của 1257 phôi thụ tinh trong ống nghiệm chúng tôi có những kết luận sau:

1. Phôi ngày 3 sau thụ tinh trong ống nghiệm có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao (62,3%) và thường gặp ở cặp nhiễm sắc thể 22, 19, 16, 15, 21 và XY. Phôi lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3 có thể phát triển thành phôi nang, trong đó 29,5% tự sửa chữa thành bình thường. Khả năng tự sửa chữa giảm khi tuổi mẹ tăng (từ 47,8% ở mẹ dưới 35 tuổi, 22% ở mẹ 35-40 tuổi và 0% ở mẹ trên 40 tuổi).

2. Một số yếu tố liên quan với lệch bội nhiễm sắc thể của phôi ngày 3:

- Bệnh nhân có tiền sử thất bại điều trị thụ tinh trong ống nghiệm, vô sinh do rối loạn phóng noãn, buồng trứng đa nang, do yếu tố tinh trùng hay không rõ nguyên nhân có liên quan với tăng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi.

- Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng dần theo tuổi mẹ, khi tuổi mẹ trên 40 tỷ lệ tăng cao trên 90%, có giá trị tiên lượng lệch bội nhiễm sắc thể cao.

- Nồng độ FSH cơ bản > 15 mIU/ml liên quan đến tăng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể (76,3%).

- Phôi phát triển chậm hay nhanh có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao hơn phôi bình thường (tương ứng 83,1% , 65,7% và 56,3%)

- Phôi có kích thước phôi bào không đều, càng có nhiều mảnh vụn và mảnh vụn nằm rải rác có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao.

- Phôi lệch bội nhiễm sắc thể có khả năng phát triển thành phôi nang kém hơn so với phôi bình thường (32,3% so với 67,3%) và phụ thuộc vào mức độ lệch bội nhiễm sắc thể. Vào ngày 5 sau thụ tinh, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể giảm dần theo tốc độ phát triển của phôi. Phôi nang hình thành vào ngày 6 có nguy cơ lệch bội nhiễm sắc thể cao hơn vào ngày 5.

-Chất lượng của mầm phôi và nguyên bào lá nuôi tỷ lệ nghịch với lệch bội nhiễm sắc thể, chất lượng kém tương đương với tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao khoảng 80%.

-Sự kết hợp đánh giá 2 hoặc 3 chỉ báo làm tăng khả năng tiên lượng lệch bội nhiễm sắc thể:

\*Tuổi mẹ và tốc độ phát triển của phôi: kết hợp tuổi mẹ 35-40 và >40 với phôi chậm phát triển tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tương ứng là 87,2% và 88,2%; tuổi mẹ 35-40 và >40 với phôi phát triển nhanh tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tương ứng là 69,6% và 100%.

\*Kết hợp chỉ báo phôi chậm phát triển và có mảnh vụn >5 %, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể 86,2%.

\*Kết hợp chỉ báo kích thước phôi bào không đều và có mảnh vụn >15 %, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao 86,3%.

\*Kết hợp 3 yếu tố: tốc độ phát triển của phôi chậm/nhanh, phôi bào kích thước không đều, mảnh vụn > 5% làm tăng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tương ứng là 86,1% và 80,6%.

\*Kết hợp 3 yếu tố: tốc độ phát triển của phôi chậm/nhanh, mảnh vụn >15%, phân bố rải rác làm tăng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tương ứng là 86,5% và 79,1%.

### KIẾN NGHỊ

Khi chọn lọc phôi đặc biệt ở các trung tâm TTÒN chưa thực hiện được kỹ thuật sàng lọc phôi trước làm tổ cần phải chú ý đến những chỉ báo tiên lượng phôi LBNST có giá trị cao; kết hợp đánh giá các yếu tố cùng một lúc để có khả năng chọn phôi ít bị rối loạn NST hơn.

Tiến hành nuôi cấy và chuyển phôi vào giai đoạn phôi nang giúp cho khả năng lựa chọn phôi ít bị LBNST cao hơn.

Khi tư vấn, điều trị cho nhóm bệnh nhân có nguy cơ cao, các nhà lâm sàng học cần phải tư vấn kỹ về khả năng phôi bất thường cao, khả năng không có phôi để chuyển phôi cao, nguyên nhân, và đề ra hướng giải quyết trong trường hợp xấu.

Phôi có hình thái và tốc độ phát triển tốt vẫn có khả năng bị LBNST khá cao. Vì vậy, hiện nay sàng lọc trước làm tổ vẫn là phương pháp có khả năng chẩn đoán phôi LBNST thể tương đối chính xác nhất.

### HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

Kết hợp đánh giá phôi ở các giai đoạn khác nhau: đánh giá tiền nhân, đánh giá phôi ở thời điểm 24 giờ, phôi ngày 2, 3, ngày 4 và phôi nang để tìm ra các yếu tố kết hợp có liên quan đến khả năng phát hiện LBNST, góp phần chọn phôi ít bị LBNST nhất.

Đánh giá theo dõi phôi liên tục sử dụng phương pháp timelapse kết hợp với sàng lọc trước làm tổ.

Phân tích đánh giá NST của phôi ở giai đoạn phôi nang để giảm những hạn chế do việc phân tích một phôi bào ở giai đoạn phân chia.

Nghiên cứu thêm các yếu tố liên quan khác như: AMH, kích thước thể tích buồng trứng...

Tìm ra thêm các yếu tố liên quan đến khả năng tự sửa chữa của phôi như chất lượng của phôi nang, mức độ LBNST ngày 3, tình trạng LBNST: thể đơn nhiễm (monosomy) hay thể tam nhiễm (trisomy).

### INTRODUCTION

In Vitro Fertilization (IVF) have significant contributions in human infertility treatment in recent decades. However, it is critical to identify an optimal method to detect abnormal chromosomes in the embryos selection process. The application of this method would significantly contribute to the creation of healthy future generations.

For many years, embryos have been mainly selected based on their morphology. Therefore, it does not evaluate embryo quality at the chromosome level.

FISH/Fluorescence In Situ Hybridization method in most prior studies only evaluates a limited number of chromosome pairs instead of a full 46 chromosomes. As the result, a higher number of false diagnosis were found using FISH.

The objective of this study is to advocate the implementation of array comparative genomic hybridization/ a-CGH to thoroughly examine the entire 23 pairs of chromosomes in human day-3 embryos. This study will focus on the following areas:

- Identify aneuploidies in 23 pairs of chromosomes in day 3 embryos by using a-CGH and self correction capability of day 3 embryos to blastocysts.
- Examine a number of factors correspond with aneuploidies in day 3 embryos prior to implantation.

### MAJOR CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

Scientific and practical contributions

This study is an advocacy for a-CGH practice in screening healthy embryos and therefore greatly improve success rate in ART treatment.

This study is a scientific proof to provide fertility clinicians with practical guidelines and tools in the fields of ART, Clinical Embryology, and Human Genetics.

#### **New findings**

\* Using a cutting-edge technology a-CGH to examine the entire 23 pairs of chromosomes in 1,257 human embryos to achieve accurate and reliable clinical results, interpreting the correlations between relevant factors and aneuploidy of day 3 embryos.

\* Identifying important indicators to predict aneuploidy based on one or multivariable relevant factor(s) analysis in conjunction with likelihood ratio analysis.

\* Confirming the self correction capability of embryos from day 3 to blastocyst stage and its close links with mothers' ages. This revelation is widely applicable in infertility treatment.

### **THESIS STRUCTURE**

This thesis includes 133 pages excluding references and appendix. It consists of 17 figures, 34 tables, 37 reviews, 13 pages of material and methods, 35 pages of results, 40 pages of discussion, and 2 pages of conclusion.

### **Chapter 1: REVIEWS**

#### **1.1 Pre-implantation embryo development**

(1) Pronuclear stage (2) Cleavage stage (3) Morular (4) Blastocyst.

#### **1.2 Aneuploidy in eggs and embryos**

Aneuploidy is a condition in which the number of chromosomes in the nucleus is increased or decreased compared to each pair (two) of normal chromosomes. Most cases of aneuploidy result in arrested or slow development of the embryos, spontaneous abortion, fetal death, newborns with Down, Klinefelter syndromes...Aneuploidy is frequent in human gametes and embryos and originates during cell division due to non-disjunction of the chromosomes.

#### **1.3 Embryos with chromosomal mosaicism**

Embryos with chromosomal mosaicism were first discovered in 1993. Embryos with chromosomal mosaicism or mosaic embryos are those with two or more populations of cells of different chromosomal

status. Most of mosaic embryos arrested before the blastocyst stage usually at the morular stage.

#### **1.4 Methods for evaluating chromosomal status of eggs and embryos**

(1) Fluorescent in situ hybridization/FISH). (2) Comparative genomic hybridization/CGH). (3) Array –comparative genomic hybridization/a-CGH). (4) Array Single Nucleotide Polymorphism /a-SNP). (5) Next Generation Sequencing (NGS).

#### **1.5 Aneuploidy in human embryos**

More than 50% of human embryos created through IVF treatment are aneuploidy. Aneuploidy increases with maternal age. Aneuploidy rate is more than 80% in older women. Aneuploidy can be found in all chromosomes, especially chromosome 22, 16, 21, 15, 13, 18, 17 and XY (Al-Asma 2012, Rubio 2013). Some aneuploid embryos are arrested before blastocyst stage but most of them can still further develop to blastocysts. 40% of human blastocysts are aneuploid, this rate is also increased with maternal age (Fragouli 2010, Traversa 2011).

#### **1.6 Self correction capability of aneuploid embryos from day 3 to blastocyst stage**

Fewer Day 3 aneuploid embryos can develop to blastocyst in comparison with euploid embryos (Magli 2000, Sandalinas 2001, Li 2005, Rubio 2003). 40% of day 3 aneuploid embryos will have self correction to euploid at the blastocyst stage (Li 2005).

#### **1.7 Factors correlate to aneuploidy**

##### **1.7.1 Embryo development and aneuploidy**

###### *\*Cleavage-stage*

Prior studies using FISH method show that aneuploidy correlated with the rate of embryo development. Embryos cleaving either too fast or too slow likely have higher aneuploid rates in comparison with embryos cleave at optimal rate (Magli 2007, Finn 2010).

###### *\*Blastocyst stage*

The likelihood of aneuploidy at the blastocyst stage is founded less than at the cleavage stage (Fragouli 2008).

##### **1.7.2 Embryo morphology and aneuploidy**

*\*Uneven blastomeres and aneuploidy:* Prior studies using FISH method show that embryos with uneven blastomeres would have higher rate of aneuploidy (Hardason 2001, Finn 2010).

*\*Fragmentation and aneuploidy:* Prior studies using FISH method show that aneuploidy increases with the rate of embryo fragmentation (Magli 2007, Munne 2007).

*\*Distribution of embryo fragments and aneuploidy:* Prior studies using FISH show that the proportion of chromosomal abnormalities was significantly higher in embryos with fragmentation that had a scattered distribution of fragments versus those of concentrated fragments (Magli 2007).

*\*Blastocyst morphology and aneuploidy:* Aneuploidy has negative effects at the blastocysts stage resulting in decreasing blastocyst quality (inner cell mass and trophoctoderm quality) and development (Kroner 2012).

**1.7.3 Aneuploidy in low ovarian reserve patients:** Aneuploidy rate increases significantly in women less 40 years old with high FSH concentration ( $p < 0,02$ ) (Munne 1998). Rate of new born with trisomy 21 also increases significantly in young women with low ovarian reserve. High FSH concentration directly related to high aneuploidy rate in all age groups (Kline 2000, Van Montfrans 1999).

**1.7.4 Infertility diagnosis and aneuploidy:** Aneuploidy increases in cases of endometriosis, ovulation dysfunction, and spontaneous abortion history (Fasolino 1998, Weghofer 2007).

**Chapter 2: MATERIALS AND METHODS**

**2.1 Materials**

**2.1.1 Criteria of material selection**

Materials used in this study are day 3 embryos from infertility couples having IVF treatment package with preimplantation genetic screening at Red Rock Fertility Center. These embryos must meet the following requirement.

- A numbers of day 3 embryos are selected and accumulated to achieve an acceptable volume.
- Embryos must have a minimum of 4 cells
- Selected embryos must contain less than 30% fragments

**2.1.2 Elimination Criteria for the selected material**

Any embryo does not meet above selection criteria 2.1.1

**2.1.3 Sample size**

Sample size was calculated using below formula:

$$N = \frac{Z^2 (1-\alpha/2) .p .q}{\dots\dots\dots}$$

$$(p. \epsilon)^2$$

- N= minimal sample size
- Z (1- $\alpha/2$ ) CI =95%,  $\alpha$ = 5% so Z (1- $\alpha/2$ ) = 1,96
- $\epsilon$  = random error (systematic error) with interval limit from 0,01 to 0,1.
- p: expected proportion of study subject, identifying from previous study.
- q = 1-p

Applied in this study

- CI = 95% ,  $\alpha$  = 5% so Z<sup>2</sup> 1- $\alpha/2$  = 1,96
- p = 53% = 0,53 (aneuploidy rate of normal development embryos without fragment) (Magli 2007).
- q = 1- 0,53 = 0,47
- $\epsilon$  = 0,055

$$N = \frac{1,96^2 \times 0,53 \times 0,47}{(0,53 \times 0,055)^2} = 1126$$

**Minimum embryos tested in this study will be 1126**

**2.2 Methods**

**2.2.1 Study design**

This is a prospective observational study

**2.2.2. Materials collection**

*\*Study location:* Study was conducted at Red Rock Fertility Center or RRFC in the city of Las Vegas, Nevada, United States of America.

*\*Material collection*

All patients were tested and treated as follow:

-Hormone examination: On day 3 of the cycle, patients were tested for FSH, E2, LH, P4, prolactin, TSH and a hCG using Immuno assay method (411, Indiana, USA).

-Ovarian stimulation: using one of the protocols below

Using Lupron (Leuprolide acetate; TAP Pharmaceuticals, Lake Forest, IL) for pituitary down regulation for 14 days, start on day 21 of the previous menstrual cycle. Recombinant FSH (Gonal-F, EMD Serono or Follistim, Organon USA) combined with Menopur (Ferring Pharmaceuticals, Parsippany, NJ) were used from day 3 of the cycle.

Using GnRH antagonists (Cetrotide, EMD Serono, Rockland, MA or Ganirelix, Organon USA, Roseland, NJ): Recombinant FSH (Gonal-F

hay Follistim) combined with Menopur starting on day3 of cycle. Antagon was used after 5-6 day using FSH (follicle diameter 14mm)

HCG (5000-10000 IU Profasi, Serono; Pregnyl, Organon) was used when there are at least 2 follicles of more than 17mm.

-Egg retrieval: Eggl retrieval was conducted under the guidance of transvaginal ultrasound 36 hours after hCG injection. Eggs were cultured in Global medium (LifeGlobal, USA) supplemented with 10% SSS (Serum Substitute Supplement, Irvine Scientific, USA) in incubators with CO<sub>2</sub> 6,5 %, O<sub>2</sub> 5%, N<sub>2</sub> 88,5 % at 37<sup>o</sup>C.

-Intracytoplasmic sperm injection (ICSI): All mature eggs are fertilized by ICSI technique with sperms of respective partner or donor.

-Fertilization evaluation: 16-18 hour after ICSI, fertilization was evaluated. Normal fertilization presents 2 pronuclear and 2 polar bodies. Embryos were assessed at 40, 68 and 112 hour after ICSI. Number and morphology of pronuclear, number of blastomeres, diameter of the blastomeres, fragmentation rate and location of fragment... were examined to evaluate the quality of the embryos.

-Day 3 embryo biopsy: one blastomere was aspirated using biopsy pipette on day 3 (66-68 after ICSI) when embryos have at least blastomeres and fragmentation <30%. After biopsy, embryos were put back to culture in incubators until day 5 or 6.

-Chromosome evaluation using a-CGH: Blastomeres were transferred to PCR tube then sent to Genesis Genetics (Detroit, Michigan, USA) for evaluating 23 pairs of chromosomes using a-CGH method. At genetic center, blastomeres were lysed. Tested embryo DNA and control DNA were amplified using SurePlex method (BlueGnome, UK). Tested DNA and control DNA were labeled using fluorochrome following manufacturer instructions (BlueGnome, UK) for 3 hours. Labelled DNA were cultured over night with DNA array (24Sure-BlueGnome). The following morning, array DNA was soaked in SSC/0,05% Tween-20 for 10 minutes at 25 degree Celsius, and 10 minutes in 1x SSC at 25 degree Celsius, then 5 minutes in 0,1x SSC 59 degree Celsius, and finally 1 minute in 0,1 x SSC at 25 degree Celsius. Array DNA was dried for 3 minutes and was scanned. Images from scanning machine were analyzed using Bluefuse software (BlueGnome, UK). Chromosome gain or loss was determined if  $\geq 15$  probes deviated from normal limit according to 24Sure method.

-Embryo Transfer: only 1 or 2 euploid embryos were transferred to the uterus or euploid embryos were frozen for future FET.

-Monitoring aneuploid embryos: Aneuploid embryos were cultured to blastocyst stage until day 5 or 6. If patients consent, trophectoderm were biopsied. 2-6 cells were biopsied and transferred to PCR tube and sent to Genetic Genesis for reevaluating chromosome using aCGH method.

### 2.3 Study variables

Blastomere number, the evenness of blastomere diameters, fragmentation rate, blastocyst formation rate, blastocyst development rate (stage 1-6), blastocyst quality, self correction rate, maternal age, infertility diagnosis, obstetrics history, FSH concentration, aneuploidy rate, euploidy rate, aneuploidy rate on 1, 2, 3 or >3 chromosomes.

#### 2.3.3 Criteria used in this study

\* *Baseline FSH*: Baseline FSH 10 mIU/ml was chosen as a threshold between patients with reduced ovarian reserve and patient with normal ovarian reserve.

\* *Cleavage stage embryo assessment (3 days after fertilization)*.

- Cleavage stage embryo assessment depends on the observation of the embryos such as: numbers of blastomeres: 4-6 blastomeres = slow development, 7-9 blastomeres = normal development, and  $\geq 10$  blastomeres = fast development.

- % of fragmentation:  $\leq 5\%$  = low; 6-15% = moderate; 16-30% = high;

- Distribution of fragment: Concentrate = fragment in one area; Scattered = fragment scatter in between blastomeres.

- Diameters of the blastomeres: even = blastomeres have pretty much the same size, uneven = blastomeres have different sizes ( $\geq 25\%$ ).

\* *Blastocyst day 5 and day 6 assessment*.

- Based on cavity expansion:

- Grade 1: early blastocyst = cavity is less than  $\frac{1}{2}$  of embryo volume.
- Grade 2: blastocyst = cavity is more than  $\frac{1}{2}$  of embryo volume
- Grade 3: full blastocyst = cavity occupies most of embryo volume.
- Grade 4: expanded blastocyst = cavity expanded resulting in thinning of the zona pellucida.
- Grade 5: hatching blastocyst = trophectoderm is herniating



- Grade 6: hatched blastocyst = whole embryo hatched out of the zona pellucida.
- From grade 2 to grade 6, grading Inner Cell Mass/ICM and Trophectoderm/TE.
  - Grading ICM: A = easily discernible, with many cells that are compacted and tightly adhered together, B = easily discernible with many cells that are loosely grouped together, C = difficult to discern with few cells, D = no ICM
  - Grading TE: A = many cells forming a cohesive epithelium, B = Few cells forming a cohesive epithelium, C = very few cells forming a cohesive epithelium.

**2.5 Data analysis**

Collected data was analyzed using statistic methods as below:

**\* Chi square**

Chi square  $\geq 3,84$  and  $p < 0,05$  statistic significant.

$$(ad - bc)^2 \cdot N$$

$$\text{Chi square} = \frac{(ad - bc)^2 \cdot N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

**\* Relative Risk/RR**

**Table 2.1:** Statistic table showing the correlation between risk factors and risk of aneuploidy.

Risk factors	Embryo's chromosomal status		
	Aneuploid	Euploid	Total
Yes present (+)	a (+ true)	b (+ false)	a + b
No present (-)	c (- false)	d (- true)	c + d
Total	a + c	b + d	a+b+c+d = N

Relative risk/ RR= (a/a+b) / (c/c+d)

**\* Likelihood ratio/ LR**

LR+ is the ratio of real positive /false positive.

$$LR(+) = (a/a+c) / (b/b+d)$$

LR(+) > 1 means when there risk factor presents, there is risk of aneuploidy. LR (+) high = more valuable.

LR- is the ratio of false negative/ real negative.

$$LR(-) = (c/a+c) / (d/b+d)$$
 usually < 1, low = more valuable.

**2.6 Ethical issues of the study**

This study was conducted after receiving the approval of Hanoi Medical University scientific and ethical review board. Patients

voluntarily join the study after being advised with all information about the study. Patients are required to sign off on study consents.

**Chapter 3: RESULTS**

**3.1 Criteria of patients whose embryos were tested using a-CGH.**

**Table 3.1:** Maternal age

Age	Number of patients	Number of embryos tested
<35	93 (45,8 %)	640 (51 %)
35-40	83 (40,9 %)	481 (38,3 %)
>40	27 (13,3%)	136 (10,7 %)
<b>Total</b>	<b>203 (100%)</b>	<b>1257 (100 %)</b>

*Comments:* Nearly half of patients whose embryos tested were under 35 years old (45,8 %) with more than half of the total embryos tested. More than 13% patients were older 40 years old with >10% of total embryos.

**3.2 Aneuploidy of day 3 embryos.**

**3.2.1 Rate and degree (level) of Aneuploid in 1257 day 3 embryos**

**Table 3.2:** Rate and Degree of Aneuploidy

# embryo tested	Aneuploid = 783 (62,3%)				# embryos with detail results of each pair of chromosomes = 877		
	Degree of aneuploidy				Aneuploid	Euploid	
				Complex aneuploidy (no detail results of which chromosomes affected)			
				Aneuploidy in 1 pair of chromosomes	Aneuploidy in 2 pairs of chromosomes	Aneuploidy in 3 pairs of chromosomes	Aneuploidy in >3 pairs of chromosomes
1257	231	127	45	380	403	474 (37,7%)	

*Commentst:* Day 3 embryos have high rate of aneuploidy (62,3%), complex aneuploidy is widely detected.

**3.2.2 Aneuploidy rates of each chromosome.**

**Table 3.3:** Rate of aneuploidy in each chromosome from low to high

Chromosome pair #	#	Aneuploid	Euploid	RR
5	877	10 (1,1%)	867 (98,9%)	1,0
10	877	10 (1,1%)	867 (98,9%)	1,0
8	877	11 (1,3%)	866 (98,7%)	1,18
7	877	12 (1,4%)	865 (98,6%)	1,27
17	877	12 (1,4%)	865 (98,6%)	1,27

3	877	13 (1,5%)	864 (98,5%)	1,36
6	877	15 (1,7%)	862 (98,3%)	1,55
2	877	17 (1,9%)	860 (98,1%)	1,73
12	877	17 (1,9%)	860 (98,1%)	1,73
4	877	18 (2,1%)	859 (97,9%)	1,91
11	877	18 (2,1%)	859 (97,9%)	1,91
14	877	19 (2,2%)	858 (97,8%)	2,0
20	877	24 (2,7%)	853 (97,3%)	2,45
1	877	25 (2,9%)	852 (97,1%)	2,64
18	877	28 (3,2%)	849 (96,8%)	2,91
13	877	29 (3,3%)	848 (96,7%)	3,0
9	877	30 (3,4%)	847 (96,6%)	3,09
XY	877	35 (4%)	842 (96%)	3,64
21	877	44 (5,0%)	833 (95%)	4,55
15	877	49 (5,6%)	828 (94,4%)	5,09
16	877	54 (6,2%)	823 (93,8%)	5,64
19	877	56 (6,4%)	821 (93,6%)	5,82
22	877	74 (8,4%)	803 (91,6%)	7,64

(Notes: 380 embryos of multiple aneuploidy having no detail result of what pair of chromosome and therefore were excluded from this table).

Comments: Aneuploidy is found in every pair of chromosomes at different rates, highest in chromosome 22.

### 3.3 Self-correction of aneuploid embryos

#### 3.3.1 Rate of self-correction at blastocyst stage

253 aneuploid embryos from 1257 tested embryos can develop to blastocyst stage. 112/253 embryos consented by the patients to do rebiopsy at the blastocyst stage (trophectoderm biopsy). The result of rebiopsy as below (table 3.4):

**Table 3.4:** Trophectoderm biopsy results of day 3 aneuploid embryos develop to blastocyst stage

# blastocysts growth from day 3 aneuploid embryos	Aneuploid	Euploid (self correction)
112	79 (70,5%)	33 (29,5%)

Comments: 29,5% of day 3 aneuploid embryos was self corrected to be euploid when rebiopsy at the blastocyst stage (trophectoderm biopsy).

#### 3.3.2 Correlation between self correction capability and maternal age.

**Table 3.5:** Self correction and maternal age.

Age	# tested	Euploid	Aneuploid	RR
-----	----------	---------	-----------	----

	embryos	(self corrected)		
< 35	46	22 (47,8%) <sup>a</sup>	24 (52,2%)	1
35-40	50	11 (22%) <sup>b</sup>	39 (78%)	2,17
>40	16	0 (0%) <sup>c</sup>	16 (100%)	
Total	112	33 (29,5%)	79 (70,5%)	

P<sup>a,b</sup><0,025; P<sup>a,c</sup><0,005

Comments: Self correction (aneuploid on day 3 becomes euploid on day 5-6) correlated with maternal ages: \* in women less than 35 years old the correction rate was double in comparison with women 35-40 years old, \* In women more than 40 years old, aneuploid embryos can develop to blastocyst stage but can not be corrected.

### 3.4 Factors related to aneuploidy through 1 variable analysis.

#### 3.4.1 History of spontaneous abortion and infertility treatment related to aneuloidy .

**Table 3.6:** History of spontaneous abortion, fertility treatment and aneuploidy.

Medical History	Aneuploid	Euploid	Total	RR
Spontaneous abortion/ hcg (+)	48 (60%)	32	80	1,04
Failed IUI	175 (66%)	90	265	1,15
Failed IVF	146 (76%)	46	192	1,32
Have not treated yet	414 (57,5%)	306	720	1
Total	783	474	1257	

Comments: Patients with history of failed IVF have highest aneuploidy rates.

#### 3.4.2 Infertility diagnosis and aneuploidy

**Table 3.7:** Infertility diagnosis and aneuploidy

Infertility Diagnosis	Aneuploid	Euploid	Total	RR
Ovulation dysfunction	14 (66,7%)	7 (33,3%)	21	2,44
Unexplained	359 (65,9%)	186 (34,1%)	545	2,41
Male factor(s)	258 (61,7%)	160 (38,3%)	418	2,26
PCO/PCOS	73 (60,3%)	48 (39,7%)	121	2,21
Tubal factor	29 (54,7%)	24 (45,3%)	53	2
Endometriosis	47 (53,4%)	41 (46,6%)	88	1,96
Uterus factors	3 (27,3%)	8 (72,7%)	11	1
Total	783	474	1257	

*Comments:* factors such as ovulation dysfunction, PCO(S), male factor and unexplained infertility result an aneuploidy rate of more than 60%.

### 3.4.3 Maternal age and aneuploidy

**Table 3.8:** Maternal age and aneuploidy

Age	Aneuploidy		Euploid		Total	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	#	%	#	%				
>40	125	<b>91,9<sup>a</sup></b>	11	8,1	136	1,85	8,5	0,74
35-40	340	<b>70,7<sup>b</sup></b>	141	29,3	481	1,42	1,7	0,69
<35	318	<b>49,7<sup>c</sup></b>	322	50,3	640	1		
Total	783		474		1257			

*(Notes: RR and LR compared aneuploidy rates with the rate in group less than 35)*

P<sup>a,b</sup> <0,001; P<sup>a,c</sup> <0,001; P<sup>b,c</sup> <0,001

*Comments:* Aneuploidy rates increased with maternal ages.

### 3.4.4 Baseline FSH and aneuploidy

**Table 3.9:** Baseline FSH and aneuploidy

FSH	Aneuploidy		Euploid		Total	RR	P	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	#	%	#	%					
>15	106	<b>76,3</b>	33	23,7	139	1,3	<0,001	1,93	0,93
≤15	677	<b>60,5</b>	441	39,5	1118	1			
Total	783		474		1257				

*Comments:* Baseline FSH high >15 mIU/ml related to high aneuploidy rate of 76,3%.

### 3.4.5 Day 3 embryo development and morphology related to aneuploidy rate.

\* Number of blastomeres and aneuploidy rate

**Table 3.10:** Day 3 embryo development and aneuploidy

# blastomeres	Aneuploid		Euploid		Total	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	#	%	#	%				
4-6	148	<b>83,1<sup>a</sup></b>	30	16,9	178	1,48	3,1	0,82
7-9	445	<b>56,3<sup>b</sup></b>	345	43,7	790	1		
≥10	190	<b>65,7<sup>c</sup></b>	99	34,3	289	1,17		
Total	783				1257			

*(Notes: RR and LR were compared with embryos having 7-9 blastomeres)*

P<sup>a,b</sup> <0,001; P<sup>b,c</sup> <0,001; P<sup>a,c</sup> <0,001

*Comments:* Slow or fast cleavage embryos reflected higher aneuploidy rates in comparison with normal cleavage embryos (P<0,001); Aneuploidy rate of slow growth embryos (4-6 PB blastomeres on day 3) were higher than in fast growth embryos (≥ 10 blastomeres on day 3) (P < 0,001).

\* Day 3 Blastomeres' size and aneuploidy

**Table 3.11:** The evenness of blastomeres' size and aneuploidy

Size	Aneuploid		Euploid		Total	RR	P	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	#	%	#	%					
Uneven	497	<b>81,6</b>	112	18,4	609	1,85	<0,001	2,69	0,48
Even	286	<b>44,1</b>	362	55,9	648	1			
Total	783		474		1257				

*Comments:* day 3 embryos with uneven blastomeres have more chance to be aneuploidy.

\* Embryo fragmentation and aneuploidy.

**Table 3.12:** % fragment and aneuploidy.

% fragment	Aneuploid		Euploid		Total	RR	LR (+)	LR (-)
	#	%	#	%				
16-30%	193	75,1 <sup>a</sup>	64	24,9	257	1,39	1,96	0,77
6-15%	276	65,7 <sup>b</sup>	144	34,3	420	1,21	1,33	0,82
0-5%	314	54,1 <sup>c</sup>	266	45,9	580	1		
Total	783		474		1257			

(Notes: RR LR compared with embryos which have 0-5% fragment)

P<sup>a,b</sup> <0,025; P<sup>a,c</sup> <0,001; P<sup>a,d</sup> <0,001; P<sup>b,c</sup> <0,001

Comments: Aneuploidy increased with the % of fragmentation (P<0,025).

\* Distribution of fragment and aneuploidy.

**Table 3.13:** Distribution of fragment and aneuploidy.

Location	Aneuploid		Euploid		Total	RR	P	LR(+)	LR (-)
	#	%	#	%					
Scatter	584	77,6	169	22,4	753	1,94	<0,001	2	0,39
Concentrate	191	40,1	285	59,9	476	1			
Total	775		454		1229				

(Notes: 28 embryos without fragment were excluded from this table)

Comments: When fragment scattered between blastomeres, the aneuploidy rates were higher.

### 3.4.6 Blastocyst development and morphology related to aneuploidy

\* Blastocyst formation from day 3 embryos and aneuploidy

**Table 3.14:** Blastocyst formation and aneuploidy.

Blastocyst formation	Aneuploid		Euploid		Total	RR	P	LR(+)	LR (-)
	#	%	#	%					
Arrested/ Slow	530	77,4	155	22,6	685	1,75	<0,001	2,1	0,48
Blastocyst	253	44,2	319	55,8	572	1			
Total	783		474		1257				

Comments: Aneuploidy affects the blastocyst formation.

\* Blastocyst development rate (slow/normal) and aneuploidy.

**Table 3.15:** Aneuploidy rates of day 5 and day 6 blastocysts.

Blastocyst	Aneuploid		Euploid		Total	RR	P	LR(+)	LR (-)
	#	%	#	%					
Day 6	156	66,7	78	33,3	234	2,3	<0,001	2,52	0,51
Day 5	97	28,7	241	71,3	338	1			
Total	253		319		572				

(Notes: 685 embryos were excluded from this table due to not meeting the criteria.)

Comments: Day 6 blastocysts have higher chance to be aneuploidy than day 5 blastocysts.

\* Embryo development on day 5 and aneuploidy.

**Table 3.16:** Embryo development on day 5 and aneuploidy.

Embryo development	Aneuploid		Euploid		Total	RR	LR(+)	LR(-)
	#	%	#	%				
Arrested	274	91,6 <sup>a</sup>	25	8,4	299	4,2	6,58	0,16
Slow: morular	97	80,8 <sup>b</sup>	23	19,2	120	3,7	5,6	0,37
Slow: grade 1 blastocyst	315	63 <sup>c</sup>	185	37	500	2,9	1,67	0,27
Grade 2 blastocyst	33	43,4 <sup>d</sup>	43	56,6	76	2	2,04	0,73
Grade 3-4 blastocyst	18	36,7 <sup>e</sup>	31	63,3	49	1,7	1,8	0,85
Grade 5-6 blastocyst	46	21,6 <sup>f</sup>	167	78,4	213	1		
Total	783		474		1257			

(Notes: RR and LR compared with grade 5-6 blastocyst).

P<sup>a,b</sup><0,005; P<sup>a,c</sup><0,001; P<sup>a,d</sup><0,001; P<sup>a,e</sup><0,001; P<sup>a,f</sup><0,001; P<sup>b,c</sup><0,001; P<sup>b,d</sup><0,001; P<sup>b,e</sup><0,001; P<sup>b,f</sup><0,001; P<sup>c,d</sup><0,005; P<sup>c,e</sup><0,001; P<sup>c,f</sup><0,001; P<sup>d,e</sup>>0,05; P<sup>d,f</sup><0,001; P<sup>e,f</sup><0,05

Comments: embryo development related to aneuploidy rate on day 5.

\* Aneuploidy degree or level of multiple complexity and blastocyst formation.

**Table 3.17:** Aneuploidy degree and blastocyst formation.

Aneuploidy degree	Blastocyst		Arrested/slow		RR1	RR2	Total
	#	%	#	%			
Euploid	319	67,3 <sup>a</sup>	155	32,7	1		474
Aneuploid in 1 pair	121	52,4 <sup>b</sup>	110	47,6	0,78	1	231
Aneuploid in 2 pairs	53	41,7 <sup>c</sup>	74	58,3	0,62	0,8	127
Aneuploid in 3 pairs	14	31,1 <sup>d</sup>	31	68,9	0,46	0,59	45
Aneuploid in > pairs	65	17,1 <sup>e</sup>	315	82,9	0,25	0,33	380
Total	572		685				1257

$P^{a,b} < 0,001$ ;  $P^{a,c} < 0,001$ ;  $P^{a,d} < 0,001$ ;  $P^{a,e} < 0,001$ ;  $P^{b,c} > 0,05$ ;  $P^{b,d} < 0,025$ ;  $P^{b,e} < 0,001$ ;  $P^{c,d} > 0,05$ ;  $P^{c,e} < 0,001$ ;  $P^{d,e} < 0,05$

*Comments:* Capability to develop to blastocyst decreases when more chromosomes affected by aneuploidy.

\* *The sex of the embryos (normal blastocyst grade 2-6 on day 5) and aneuploidy.*

Among 1257 tested embryos, 685 embryos were arrested, 572 embryos developed to blastocyst stage on day 5 and 6 of which 338 embryos develop to blastocys on day 5. 317 out of 338 embryos have normal sex chromosomes.

**Table 3.18:** The sex of the blastocysts day 5 and aneuploidy.

Sex	Aneuploid		Euploid		P	Total
	#	%	#	%		
XX	41	25,8	118	74,2	>0,05	159
XY	35	22,2	123	77,8		158
Total	76		241			317

*Comments:* Normal developing blastocysts on day 5 have the sex ratio 1:1, aneuploidy rate is not depend on the sex of the blastocysts.

\* *Inner cell mass quality (ICM) and aneuploidy.*

**Table 3.19:** Inner cell mass quality and aneuploidy

ICM quality	Aneuploid		Euploid		Total	RR	LR(+)	LR(-)
	#	%	#	%				
C-D	58	80,6 <sup>a</sup>	14	19,4	72	2,74	6	0,57
B	131	46,3 <sup>b</sup>	152	53,7	283	1,57	1,34	0,66
A	64	29,5 <sup>c</sup>	153	70,5	217	1		
Total	253		319		572			

*(RR and LR used to compared with ICM grade A)*

$P^{a,b} < 0,001$ ;  $P^{a,c} < 0,001$ ;  $P^{b,c} < 0,001$

*Comments:* ICM quality decreases when aneuploidy rate increases ( $P < 0,001$ ).

3.3.6.7 *Trophectoderm (TE) quality and aneuploidy.*

**Table 3.20:** Trophectoderm quality and aneuploidy

TE quality	Aneuploid		Euploid		Total	RR	LR(+)	LR(-)
	#	%	#	%				
C	67	79,8 <sup>a</sup>	17	20,2	84	2,1	2,69	0,41
B	157	38,1 <sup>b</sup>	255	61,9	412	0,99	0,99	1
A	29	38,2 <sup>c</sup>	47	61,8	76	1		
Total	253		319		572			

*(Notes: RR and LR used to compared with TE grade A)*

$P^{a,b} < 0,001$ ;  $P^{a,c} < 0,001$ ;  $P^{b,c} > 0,05$

*Comments:* Blastocysts with TE grade C have higher aneuploidy rate.

### 3.5 Factors relating to aneuploidy through multivariable analysis.

#### 3.5.1 Two factors: number of blastomeres and maternal age.

**Table 3.21:** Correlation between maternal age, number of blastomeres and aneuploidy.

2 factors	Aneuploid		Euploid		Total	RR	P	LR(+)	LR(-)
	#	%	#	%					
4-6 blastomeres Age >35	98	87,5	14	12,5	112	2,02	<0,001	6,3	0,69
≥10 blastomeres Age >35	107	75,9	34	24,1	141	1,75	<0,001	2,95	0,72
7-9 blastomeres Age <35	185	43,4	241	56,6	426	1			
Total	390		289		679				

*(Notes: RR and LR used to compared with control group (embryo with 7-9 blastomeres of <35 year old women); 427 embryos excluded from this table due to not meeting the criteria).*

*Comments:* When compared with control group (embryos with 7-9 blastomeres from young women <35 years of age), combined 2 factors: (old age and fast/slow cleavage), the aneuploidy rate increased 1,75 to 2 times.

#### 3.5.2 Two factors: number of blastomeres and fragmentation.

**Table 3.22:** Correlation between number of blastomeres, fragmentation > 5% and aneuploidy rate.

2 factors	Aneuploid		Euploid		Total	RR	P	LR(+)	LR(-)
	#	%	#	%					
4-6 blastomeres MV >5%	129	83,2	26	16,8	155	1,69	<0,001	3,5	0,69
≥10 blastomeres Fragment >5%	101	66,9	50	33,1	151	1,36	<0,001	1,73	0,83
7-9 blastomeres fragment <5%	206	49,2	213	50,8	419	1			
Total	436		289		725				

*(Notes: RR and LR used to compared with control group (embryos with 7-9 blastomeres and less than 5% fragment).*

*Comments:* When compared with control group (embryos with 7-9 blastomeres and less than 5% fragment), combined 2 factors: fragment >5% and fast/slow cleavage, the aneuploidy rates increase 1,36 to 1,69 times.

### 3.5.3 Two factors: size of blastomeres and fragmentation.

**Table 3.23:** Uneven blastomeres, fragment > 15% and aneuploidy.

2 factors	Aneuploid		Euploid		Total	RR	P	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	#	%	#	%					
Uneven fragment >15%	157	<b>86,3</b>	25	13,7	182	1,98	<0,001	5,36	0,66
Even fragment ≤ 15%	250	<b>43,6</b>	323	56,4	573	1			
Total	407		348		755				

*Comments:* When compared with control group (embryos with even blastomeres and fragment ≤ 15%), combined 2 factors: uneven blastomeres and fragment >15%, the aneuploidy rate increased 1,98 times.

### 3.5.4 Three factors: Cleavage rate (fast/slow), uneven blastomeres and fragment >15%

**Table 3.24:** Cleavage (fast/slow), uneven blastomeres, fragment > 15% and aneuploidy.

3 factors	Aneuploid		Euploid		Total	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	#	%	#	%				
≥ 10 blastomeres Uneven Fragment >15%	26	<b>89,7<sup>a</sup></b>	3	10,3	29	2,3	12	0,88
7-9 blastomeres Even Fragment ≤ 15%	168	<b>39<sup>b</sup></b>	263	61	431	1		
≤ 6 blastomeres Uneven Fragment >15%	62	<b>84,9<sup>c</sup></b>	11	15,1	73	2,2	6,75	0,76
Total	256		277		533			

P<sup>a,b</sup><0,001; P<sup>b,c</sup><0,001; P<sup>a,c</sup>>0,05

*Comments:* When compared with control group (embryos with 7-9 even blastomeres and fragment ≤15%), combined 3 factors: fast/slow cleavage, uneven blastomeres, fragment >15%, the aneuploidy rates increased 2,3-2,3 times.

### 3.5.5 Three factors: number of blastomeres, % and distribution of fragment.

**Table 3.25:** Fast/slow cleavage, fragment > 15% and scattered

3 factors	Aneuploid		Euploid		Total	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	#	%	#	%				
≥10 blastomeres fragment >15% scatter	34	<b>79,1<sup>a</sup></b>	9	20,9	43	2,3	5,61	0,8
7-9 blastomeres fragment ≤ 15% concentrate	114	<b>35<sup>b</sup></b>	212	65	326	1		
≤ 6 blastomeres fragment >15% scatter	77	<b>86,5<sup>c</sup></b>	12	13,5	89	2,5	7,5	0,63
Total	225		233		458			

P<sup>a,b</sup><0,001; P<sup>b,c</sup><0,001; P<sup>a,c</sup>>0,05

*Comments:* in comparison with control group (embryos with 7-9 blastomeres, fragment ≤15% and concentrate), combined 3 factors: fast/slow cleavage, fragment >15% and scatter, the aneuploidy rates increased 2,3-2,5 times.

## Chapter 4: DISCUSSION

### 4.1 Genetics analysis discussion.

#### 4.1.1 Impact of embryo biopsy to the development of fetus

\* Day 3 embryo biopsy: There are 2 opposite opinions about the impact of day 3 biopsy on embryo development.

- Day 3 embryo biopsy did not affect embryo development (Vũ et al 2012, Nguyễn et al 2013).

- Day 3 embryo biopsy had negative impact on embryo development (Scott 2013).

- Cleavage stage embryos have high percentage of mosaicism. Analyzing blastomere does not represent the whole embryo. Therefore, the results were not completely reliable.

\* Trophoctoderm biopsy: more genetic materials were evaluated so the results were more accurate. It is a safer technique due to a small portion of embryo was biopsied and it allows normal developing, aneuploid embryos to possibly become normal when transitioning into blastocyst stage.

#### 4.2.2 A-CGH method.

\* Benefits: A-CGH evaluated 23 pair of chromosomes so the results were more reliable.

\* Limitation: Can not detect some balance chromosome structure abnormalities, or some polyploidy such as triploid 69, XXX; tetraploidies 92, XXXX.

#### 4.2 Aneuploidy rates in human day 3 embryos.

Aneuploidy rate is 62,3% in our study. It is pretty much matching the results from prior studies concluding that human preimplantation embryos have high rate of aneuploidy. Our numbers (ratios) were higher than the results of studies using FISH technique because FISH technique only detects abnormalities in 5-12 pairs of chromosomes (the false negative rate was high with FISH). This study's results were lower than other studies where their participating patients were part of high risk group.

Our results show aneuploidy can happen in all 23 pairs of chromosomes, in 1 or more than 1 pair of chromosomes at the same embryo. Complex aneuploidy was frequently detected. This is different from Traversa study (2011) evaluating chromosomes of the blastocyst where they saw that complex aneuploidy is least happened due to complex abnormal embryos usually arrested before transitioning to blastocyst stage. Our findings were the same with other studies that the aneuploidy rates were highest in chromosomes 22, 19, 16, 15, 21, XY, 9, 13, 18 (Al-Asma 2012, Rubio 2013, Guitierrez 2011, Franasiak 2014).

#### 4.5 Aneuploidy embryo self correction

As prior studies using FISH technique, our study proved that out of 112 aneuploid blastocysts, 29,5% has euploid results when retested using trophoctoderm biopsy. Our correction rate was lower compared to 40% of Li et al and 70% of Munne et al both using FISH. The discrepancy is due to FISH technique only evaluates a limited number of chromosomes as some abnormal embryos were diagnosed as normal (Li 2005, Munne 2007).

There are 2 mechanisms explaining the embryo self correction: preimplantation embryo mosaicism and trisomy rescue.

Our study also shows that aneuploid embryos can develop to the blastocyst stage in all age groups. However, the correction rate was reduced when maternal age increased at 35 years or older. In older

women, aneuploidy in eggs was very high and aneuploidy from meiosis division resulted in homogenous aneuploidy which can be found in all blastomeres of the embryos.

#### 4.4 Factors affecting aneuploidy rate through single variable analysis.

**4.4.1 History of failed IVF treatment related to aneuploidy.** In our study, patients with history of failed IVF treatment have highest chance of aneuploidy (76%), higher than those from studies using FISH.

**4.4.2 Infertility with known diagnosis and aneuploidy.** Ovulation dysfunction, PCOS patients has aneuploidy rate >60% or the same as results of Giannaroli et al 2010. Ovulation dysfunction related to error in meiosis or ovarian aging. Infertility due to male factors also related to high aneuploidy rate >60%, matching Magli results (2009) due to higher sperm aneuploidy in these cases.

**4.4.3 Maternal age and aneuploidy:** embryos from women younger than 35 years old have the aneuploidy rate of 49,7%. This rate increased to 91,9% in women of more than 40 years old. Maternal age of more than 40 is a foreseeable risk factor to predict embryo aneuploidy.

**4.4.4 Baseline FSH related to aneuploidy.** Embryos of women with high FSH >15mIU/ml have higher aneuploidy rate (1,3 times) compares to women with lower FSH ≤ 15 mIU/ml. Our result was the same with Nasser and very close to Nasser (1999) and El-Touky (2002).

**4.4.5 Day 3 embryo development related to aneuploid.** There is a strong correlation between aneuploidy and embryo development represented by the number of blastomeres. Aneuploidy has negative effect on embryo growth. Fast or slow cleavage related to higher aneuploidy rates. These results were consistent with Magli et al 2007.

#### 4.4.6 Day 3 embryo morphology related to aneuploidy.

\* *Fragmentation and distribution of fragment related to aneuploidy:* Aneuploidy accelerates with the increase of fragmentation. We have matching results with Magli et al 2007, aneuploidy increased when fragment was scattered between blastomeres (1,94 times). Fragment related to embryo mosaicism is the result of containing lagging chromosome or fragment of chromosome originated from meiosis errors. Scattered fragment may be originated from many cells.

\* *Size of the blastomeres and aneuploidy;* Embryos with uneven blastomeres have higher aneuploidy rates than even blastomeres (2

times). Our study results are consistent with Magli et al (2007). This explained why embryos with uneven blastomeres have low implantation and pregnancy rates.

**4.4.7 The development of embryo from day 3 to blastocyst related to aneuploidy.** This study confirms the previous results of FISH studies that euploid embryos more likely grow to blastocyst than aneuploid embryos. Blastocyst formation ratios from our study correlated with aneuploidy as in Alfarawati (2011). On day 5 of development, if embryos arrested or at morular stage, it is the reliable predictor for aneuploidy. Blastocysts formed on day 6 have aneuploidy rate higher than blastocysts formed on day 5 (2,3 times). Outcome of our study also indicated that blastocysts formed on day 5 have better implant capability than blastocysts formed on day 6.

**4.4.8 Aneuploid degree and capability to form blastocyst.** Similar to the results from Alfarawati (2011), and Vegas (2014), we found that aneuploidy can happen in all chromosomes and the capability to develop to blastocysts (grade 2 to 6) decreased when more chromosomes were affected.

**4.4.9 Capability to develop to blastocyst on day 5 and sex of the embryos with relations to aneuploidy.** Our data proved that capability to grow into blastocysts stage and aneuploidy were not affected by the sex of the embryos. Culture to the blastocyst stage is not favor the chosen of male embryos.

**4.4.10 Blastocyst quality related to aneuploidy.** Prior studies proved that aneuploidy has negative impacts on blastocyst development resulting in poor ICM and TE quality and the rate of blastocyst formation. From our study, the possibility of transferring aneuploidy blastocyst decreased from 44,2% to 31,1% when only good quality blastocysts were selected. Our results are consistent with Alfarawati and Kroener results. Poor ICM quality (grade C-D) is a good predictor for aneuploidy.

**4.5 Multiple factors affecting aneuploidy through multivariable analysis.**

**4.5.1 Two factors of maternal age and day 3 embryos development rate in relation with aneuploidy.** Slow cleavage embryos in older women is good predictor for aneuploidy. Combined factors of normal cleavage embryos in young women (<35) can predict more 6,3% - 12,9% euploid embryos in comparison with 1 factor.

**4.5.2 Two factors of number of blastomere and fragmentation in relation with aneuploidy.** Like Magli (2007) results, our study shows that nearly 50% normal developing embryos with less fragmentation are aneuploidy (49,2%). Combination of these two factors can predict more 4,9% - 7,1% euploid embryos using only in comparison with 1 factor.

**4.5.3 Two factors of size of the blastomeres and fragmentation in relation with aneuploidy.** In combination of 2 factors in embryos with uneven blastomeres and fragment >15%, the aneuploidy rate was high. Combining two factors: even blastomeres and fragment less than 15% can predict more 0,5-14,4% euploid embryos in comparison with scenario of 1 factor.

**4.5.4 Three factors of number of blastomeres, size of the blastomeres, and fragmentation in relation with aneuploidy.** Combination of fast/slow cleavage, embryos with uneven blastomeres, and fragment >15% would cause higher rate of aneuploidy. Combined 3 factors: normal cleavage embryos with even blastomeres and fragmentation ≤15% can predict more 6,1% - 18,1% euploid embryos in comparison with scenario of 1 factor.

**4.5.5 Three factors of number of blastomeres, fragmentation and distribution of fragment in relation with aneuploidy.** Fast/slow cleavage embryos with fragment >15% scattered between blastomeres have high aneuploidy rate. Combination of 3 factors of normal cleavage, fragmentation ≤15% and concentrate fragment can predict more 21,5-23% euploid embryos compared with scenario of 1 factor.

In short, using combinations of more than one factor can result more euploid embryos. Some factors such as maternal age > 40, slow development embryo on day 5, or poor quality ICM alone are good indicators of aneuploidy.

## CONCLUSION

Using a-CGH in the evaluation of the entire 23 pairs of chromosomes in 1257 embryos, we conclude the followings:

1. Day 3 embryos with aneuploidy are detected at a high rate of 62.3% among which most frequently found aneuploidities are chromosome number 22, 19, 16, 15, 21 và XY. Day 3 embryos with aneuploidy can develop to blastocyst with 29.5% having self correction capabilities. Self correction decreases with the increase of mothers' ages (47.8% in



mother's age of less than 35, 22% in mothers between 35 and 40, and 0% in mothers of 40 or older)

## 2. Some factors correlated with embryos aneuploidy

- Patients with IVF treatment failure, infertility due to ovulation dysfunction, PCOS, male factors or unexplained infertility have higher chances of embryo aneuploidy.

- Aneuploidy accelerates in mothers of higher ages. Ratio of aneuploidy is 90% or higher in mothers of 40 years or older.

- FSH >15mIU/ml has correlation with Aneuploidy (76,3%).

- Embryos with slow or fast cleavage have higher ratios of Aneuploidy compared to embryos of normal growth (83,1% , 65,7% and 56,3% respectively)

- Embryos with uneven blastomeres, more fragment distributed scattered between blastomeres have higher possibility of aneuploidy

- Embryos with Aneuploidy have significantly less chances to develop to blastocysts in comparison with normal embryos. Complexity of Aneuploidy is also a part of the cause. Blastocysts formed on day 6 have higher chance of aneuploidy than blastocysts formed on day 5.

- ICM and TE quality has negative correlation with aneuploidy. Poor quality ICM and TE blastocysts have 80% of aneuploidy.

- Combined 2 or 3 factors can predict more aneuploidy in embryos.

- \* Maternal age and day 3 embryo development: slow cleavage embryos in maternal age of 35-40 and >40 have aneuploidy rate of 87,2% and 88,2%; fast cleavage embryos in maternal age of 35-40 and >40 have aneuploidy rates 69,6% and 100% respectively.

- \* Slow cleavage embryos with fragment >5 % have high aneuploidy rate of 86,2%.

- \* Embryos with uneven blastomeres and fragment >15 % have high aneuploidy rate of 86,3%.

- \* Fast/slow cleavage embryos with uneven blastomeres, and fragment >5% have high aneuploidy rate of 80,6 and 86,1% , respectively.

- \* Fast/slow cleavage embryos with fragment >15%, scattered distribution between blastomeres have high aneuploidy rates of 79,1% and 86,5% respectively.

## RECOMMENDATION

Medical practitioners at IVF facilities without PGD capability need to pay close attentions to risk factors related to aneuploidy, evaluate all aforementioned indicators from this study to select embryos with less possibility of aneuploidy.

Blastocysts (day 5, 6 embryos) transfer would reduce fetus with aneuploidy.

IVF clinicians should consult high risk patients about the possibility of having no transferable embryos, its causes, and other alternative treatment solutions.

Embryos with good morphology and development can still carry a relatively high possibility of aneuploidy. Therefore, PGS is still the most accurate solution in finding embryos with aneuploidy at the present time.

## FUTURE RELATED STUDY SUGGESTION

To evaluate embryos in various stages of development from 24 hours to day 2, day 3, day 4 and blastocysts to study factors related to embryo aneuploidy to detect an optimal method of embryo selection with least aneuploidy.

To evaluate and monitor embryos using timelapse method besides PGS

To research embryos' chromosomes at the blastocyst stage to minimize limitations of analysis one blastomeres.

To examine other related factors including AMH, ovary's volume...

To further investigate self-correction capability of day 3 aneuploidy in embryos such as correlation with embryo morphology, type of abnormality, monosomy or trisomy in details.