

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



PHAN THỊ KHÁNH VY

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ LIÊN  
QUAN VỚI LỆCH BỘI NHIỆM SẮC THỂ  
CỦA PHÔI NGƯỜI TRƯỚC LÀM TỔ**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI - 2015**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

**PHAN THỊ KHÁNH VY**

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ LIÊN  
QUAN VỚI LỆCH BỘI NHIỆM SẮC THỂ  
CỦA PHÔI NGƯỜI TRƯỚC LÀM TỔ**

Chuyên ngành : Mô phôi thai học

Mã số : 62720103

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ HỌC**

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Nguyễn Thị Bình

2. PGS. Eva Littman

**HÀ NỘI - 2015**

## LỜI CẢM ƠN

*Trong quá trình hoàn thành luận án này, tôi đã nhận được sự giúp đỡ chân tình, hiệu quả của nhiều cá nhân, tập thể, các thầy cô giáo, các đồng nghiệp cùng gia đình và bạn bè.*

*Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới PGS.TS. Nguyễn Thị Bình và PGS. Eva Littman đã trực tiếp hướng dẫn khoa học cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án nghiên cứu sinh.*

*Xin cảm ơn các thầy (cô) trong Bộ môn Mô-Phôi và Di truyền trường Đại Học Y Hà nội và Học viện Quân Y đã cho tôi những lời khuyên và ý kiến quý báu để tôi hoàn thành luận án này.*

*Xin cảm ơn Bộ Môn Mô-Phôi, Phòng Sau Đại Học trường Đại học Y Hà nội, Trung tâm thụ tinh ống nghiệm Red Rock, Trung tâm di truyền Genesis Genetics đã giúp đỡ hỗ trợ và tạo điều kiện cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu thực hiện đề tài này. .*

*Đặc biệt bản luận án này là món quà tôi dành tặng các thành viên trong gia đình tôi, những người đã luôn ở bên tôi, cổ vũ và động viên tôi những lúc khó khăn để có thể vượt qua và hoàn thành luận văn này.*

*Tôi xin chân thành cảm ơn!*

*Tác giả luận án*

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Phan Thị Khánh Vy, nghiên cứu sinh khóa 31 Trường Đại Học Y Hà Nội, chuyên ngành Mô phôi - Thai học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Thị Bình và PGS. Eva Littman.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội, ngày tháng năm 2015*

Tác giả luận án

Phan Thị Khánh Vy

## CÁC THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

a-CGH	: Array Comparative Genomic Hybridization/lai so sánh/đối chiếu bộ gen dùng chip DNA
a-SNP	: Array Single Nucleotide Polymorphism/phân tích đa hình đơn dùng chip DNA
DNA	: DeoxyriboNucleic Acid
FISH	: Fluorescent In Situ Hybridization/lai huỳnh quang tại chỗ
FSH	: Follicle Stimulating Hormone
GnRH	: Gonadotropin Releasing Hormone
GnRH <sub>a</sub>	: GnRH agonist/chất đồng vận
GnRH anta	: GnRH antagonist/chất đối vận
hCG	: Human Chorionic Gonadotropin
ICM	: Inner Cell Mass/nguyên bào phôi-mầm phôi
ICSI	: IntraCytoplasmic Sperm Injection/tiêm tinh trùng vào bào tương của noãn
IU	: International Unit/đơn vị quốc tế
IUI	: Intra-Uterine Insemination/Bơm tinh trùng vào buồng tử cung
IVF	: In-Vitro Fertilization/thụ tinh trong ống nghiệm
LBNST	: Lệch bội nhiễm sắc thể
LH	: Luteinizing Hormone
LR	: Likelihood Ratio/tỷ số khả năng
NGS	: Next Generation Sequencing/giải trình tự gene thế hệ mới
NST	: Nhiễm sắc thể
PB	: Phôi bào
qPCR	: Quantitative Polymerase Chain Reaction/Phản ứng chuỗi định lượng
RNA	: RiboNucleic Acid
RR	: Relative Risk/nguy cơ tương đối
RRFC	: Red Rock Fertility Center/trung tâm thụ tinh ống nghiệm Red Rock
TE	: Trophectoderm/nguyên bào lá nuôi

## MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ .....	1
Chương 1: TỔNG QUAN .....	4
1.1 Sự phát triển của phôi trước khi làm tổ.....	4
1.1.1 Phôi ở giai đoạn tiền nhân. ....	4
1.1.2. Phôi ở giai đoạn phân chia (ngày 2-3 sau thụ tinh). ....	4
1.1.3 Phôi dâu (phôi ngày 4). ....	8
1.1.4 Phôi nang (phôi ngày 5-6). ....	9
1.1.5 Các phương pháp đánh giá chất lượng phôi.....	11
1.2. Hiện tượng lệch bội nhiễm sắc thể của noãn và phôi. ....	14
1.3. Phôi thể khảm.....	17
1.4. Các phương pháp phân tích nhiễm sắc thể của noãn và phôi.....	18
1.4.1. Phương pháp lai huỳnh quang tại chỗ (fluorescent in situ hybridization/FISH).....	19
1.4.2. Phương pháp lai so sánh bộ gen (comparative genomic hybridization/CGH). ....	20
1.4.3. Phương pháp lai so sánh bộ gen dùng chip DNA (array – comparative genomic hybridization/a-CGH).....	21
1.4.4. Phương pháp phân tích đa hình đơn nucleotide dùng chip DNA (array Single Nucleotide Polymorphism /a-SNP).....	21
1.4.5. Phương pháp phản ứng chuỗi Polymerase (Polymerase chain reaction/PCR). ....	21
1.4.6. Phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing/NGS).....	22
1.5. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở noãn, phôi và một số yếu tố liên quan. ...	22
1.5.1. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở noãn. ....	22
1.5.2. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở tiền nhân. ....	22

1.5.3. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi ngày 3. ....	23
1.5.4. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi nang. ....	24
1.6. Hiện tượng tự sửa chữa của phôi lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3. ....	25
1.7. Một số yếu tố liên quan đến tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể. ....	26
1.7.1. Sự phát triển của phôi và tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể. ....	26
1.7.2. Hình thái phôi và tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể. ....	29
1.7.3. Hormon kích thích buồng trứng, sự đáp ứng của buồng trứng và tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể. ....	34
1.7.4. Một số nguyên nhân gây vô sinh có liên quan đến tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể. ....	35
1.7.5. Kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm ảnh hưởng đến tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể. ....	36
1.7.6. Các cặp nhiễm sắc thể và tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể. ....	38
1.7.7. Tuổi mẹ và tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể. ....	39
1.7.8. Yếu tố môi trường ảnh hưởng đến lệch bội nhiễm sắc thể. ....	40
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU. ....	41
2.1. Đối tượng nghiên cứu. ....	41
2.1.1. Tiêu chuẩn chọn lọc đối tượng. ....	41
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ. ....	41
2.1.3. Số lượng đối tượng. ....	41
2.2. Phương pháp nghiên cứu và thu thập số liệu. ....	42
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu. ....	42
2.2.2. Phương pháp tiến hành và thu thập số liệu. ....	43
2.3. Phương tiện nghiên cứu. ....	48
2.4. Các chỉ số, biến số nghiên cứu. ....	48
2.4.1. Các chỉ số về đặc điểm mẫu nghiên cứu: ....	48
2.4.2. Các chỉ số về kết quả a-CGH: ....	49
2.4.3. Các tiêu chuẩn có liên quan đến nghiên cứu. ....	49

2.5. Xử lý số liệu.....	51
2.6. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu.....	53
Chương 3: KẾT QUẢ .....	54
3.1. Đặc điểm bệnh nhân được xét nghiệm phôi bằng phương pháp a-CGH ...	54
3.2. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi ngày 3 sau thụ tinh.....	55
3.2.1. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể và mức độ lệch bội nhiễm sắc thể. ...	55
3.2.2. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể phân bố theo cặp nhiễm sắc thể. ....	58
3.3. Khả năng tự sửa chữa của phôi ngày 3 bị lệch bội nhiễm sắc thể.....	59
3.3.1. Khả năng phát triển thành phôi nang của phôi lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3. ....	59
3.3.2. Khả năng tự sửa chữa của phôi ngày 3 bị lệch bội nhiễm sắc thể. ...	59
3.3.3. Mối liên quan giữa khả năng tự sửa chữa của phôi LBNST ngày 3 và tuổi mẹ. ....	60
3.4. Một số yếu tố liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể qua phân tích đơn biến.....	61
3.4.1. Tiền sử sảy thai, điều trị vô sinh và lệch bội nhiễm sắc thể.....	61
3.4.2. Nguyên nhân vô sinh và lệch bội nhiễm sắc thể.....	61
3.4.3. Tuổi mẹ liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.....	62
3.4.4. Nồng độ FSH cơ bản của mẹ liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể. ...	62
3.4.5. Tốc độ phát triển và hình thái của phôi ngày 3 và lệch bội nhiễm sắc thể. ....	63
3.4.6. Tốc độ phát triển thành phôi nang, hình thái của phôi nang và lệch bội nhiễm sắc thể.....	69
3.5. Một số yếu tố liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể qua phân tích đa biến.....	77
3.5.1. Phân tích đa biến 2 yếu tố: Số lượng phôi bào và tuổi mẹ.....	77



3.5.2. Phân tích đa biến 2 yếu tố: số lượng phôi bào và sự có mặt mảnh vụn.....	78
3.5.3. Phân tích đa biến 2 yếu tố: độ đồng đều về kích thước phôi bào và sự có mặt mảnh vụn. ....	79
3.5.4. Phân tích đa biến 3 yếu tố: Số phôi bào, độ đồng đều và sự có mặt mảnh vụn. ....	80
3.5.5. Phân tích đa biến 3 yếu tố: Số phôi bào, sự có mặt mảnh vụn, và vị trí mảnh vụn.....	83
<b>Chương 4: BÀN LUẬN</b> .....	<b>89</b>
4.1. Bàn luận về phương pháp phân tích di truyền.....	89
4.1.1. Bàn luận về việc sinh thiết phôi. ....	89
4.1.2. Bàn luận về phương pháp a-CGH. ....	92
4.2. Bàn luận về tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể của phôi ngày 3. ....	94
4.3. Bàn luận về khả năng tự sửa chữa của phôi lệch bội nhiễm sắc thể. ...	96
4.4. Bàn luận về một số yếu tố liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể qua phân tích đơn biến. ....	102
4.4.1. Tiền sử điều trị thụ tinh trong ống nghiệm thất bại liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.....	102
4.4.2. Nguyên nhân vô sinh liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.....	103
4.4.3. Tuổi mẹ liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.....	105
4.4.4. Nồng độ FSH cơ bản liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.....	107
4.4.5. Tốc độ phát triển của phôi ngày 3 sau thụ tinh (biểu thị qua số lượng phôi bào) liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể. ....	109
4.4.6. Hình thái của phôi ngày 3 liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.....	112
4.4.7. Sự phát triển của phôi từ ngày 3 đến giai đoạn phôi nang liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.....	116
4.4.8. Mức độ lệch bội nhiễm sắc thể và khả năng hình thành phôi nang....	119

4.4.9. Khả năng phát triển thành phôi nang vào ngày 5 và giới tính của phôi liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể. ....	119
4.4.10. Chất lượng của phôi nang (biểu thị qua chất lượng của mầm phôi và nguyên bào lá nuôi) liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể. ....	121
4.5. Bàn luận về một số yếu tố liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể qua phân tích đa biến. ....	122
4.5.1. Hai yếu tố: tuổi mẹ và tốc độ phát triển của phôi vào ngày 3 liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.....	123
4.5.2. Hai yếu tố: số lượng phôi bào và sự có mặt mảnh vụn liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể. ....	124
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 nhiễm sắc thể.....	125
4.5.4. Ba yếu tố: số lượng phôi bào, độ đồng đều và sự có mặt của mảnh vụn liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể. ....	126
4.5.5. Ba yếu tố: số lượng phôi bào, sự có mặt mảnh vụn và vị trí mảnh vụn liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể. ....	127
KẾT LUẬN.....	129
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA NGHIÊN CỨU.....	131
KIẾN NGHỊ.....	132
HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO.....	133
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1:	Đồng thuận về hệ thống đánh giá tiền nhân của tổ chức Alpha.....	11
Bảng 1.2:	Đồng thuận về hệ thống đánh giá phôi ở giai đoạn phân chia của tổ chức Alpha.....	12
Bảng 2.1:	Bảng tính thống kê liên quan giữa yếu tố chỉ báo và tỷ lệ LBNST.....	52
Bảng 3.1:	Đặc điểm tuổi mẹ.....	54
Bảng 3.2:	Đặc điểm về nguyên nhân vô sinh.....	54
Bảng 3.3:	Tiền sử sản khoa có liên quan.....	55
Bảng 3.4:	Tỷ LBNST thể phân bố theo các cặp nhiễm sắc thể từ thấp đến cao.....	58
Bảng 3.5:	Khả năng phát triển thành phôi nang của phôi LBNST ngày 3.....	59
Bảng 3.6:	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.....	60
Bảng 3.7:	Khả năng tự sửa chữa của phôi và tuổi mẹ.....	60
Bảng 3.8:	Tiền sử sảy thai, điều trị vô sinh và LBNST.....	61
Bảng 3.9:	Nguyên nhân vô sinh và LBNST.....	61
Bảng 3.10:	Tuổi mẹ và nguy cơ LBNST.....	62
Bảng 3.11:	Nồng độ FSH cơ bản và LBNST.....	62
Bảng 3.12:	Sự phát triển của phôi ngày 3 và LBNST.....	63
Bảng 3.13:	Sự đồng đều của các phôi bào và LBNST.....	65
Bảng 3.14:	Sự xuất hiện mảnh vụn trong phôi và LBNST.....	66
Bảng 3.15:	Sự phân bố mảnh vụn và LBNST.....	67
Bảng 3.16:	Sự phát triển thành phôi nang và LBNST.....	69

Bảng 3.17: So sánh giữa phôi phát triển chậm đến ngày 6 mới hình thành phôi nang và phôi phát triển nhanh đến ngày 5 đã thành phôi nang và LBNST.....	70
Bảng 3.18: Tốc độ phát triển của phôi vào ngày 5 và LBNST. ....	71
Bảng 3.19: Mức độ LBNST và khả năng hình thành phôi nang. ....	72
Bảng 3.20: Giới tính của phôi nang ngày 5 và LBNST.....	73
Bảng 3.21: Chất lượng của mầm phôi và LBNST.....	73
Bảng 3.22: Chất lượng của nguyên bào lá nuôi phôi và LBNST.....	74
Bảng 3.23: Chất lượng phôi nang nói chung và LBNST.....	74
Bảng 3.24: Chất lượng phôi nang ngày 5 và LBNST.....	75
Bảng 3.25: Chất lượng phôi nang ngày 6 và LBNST.....	76
Bảng 3.26: Liên quan giữa tuổi mẹ; số lượng phôi bào và LBNST.....	77
Bảng 3.27: Liên quan giữa số lượng phôi bào; tỷ lệ mảnh vụn và LBNST. ....	78
Bảng 3.28: Phôi bào không đều, mảnh vụn > 15% và LBNST.....	79
Bảng 3.29: Phôi bào không đều, mảnh vụn >5% và LBNST.....	80
Bảng 3.30: Phôi phát triển nhanh/chậm, kích thước phôi bào không đều, mảnh vụn >15% và LBNST.....	81
Bảng 3.31: Phôi phát triển nhanh/chậm, kích thước phôi bào không đều, mảnh vụn >5% và LBNST.....	82
Bảng 3.32: Phôi phát triển nhanh/chậm, mảnh vụn > 15%; phân bố rải rác và LBNST.....	83
Bảng 3.33: Phôi phát triển nhanh/chậm, mảnh vụn >5% phân bố rải rác và LBNST. ....	84
Bảng 3.34: Các yếu tố chỉ báo (CB) có giá trị dự đoán LBNST của phôi xếp từ cao xuống thấp.....	85

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1:	Sự phát triển của phôi ngày 2 và 3 .....	7
Hình 1.2:	Phôi dâu ngày 4 .....	8
Hình 1.3:	Phôi giai đoạn tạo nang/ cavitation .....	9
Hình 1.4:	Phân loại phôi nang .....	14
Hình 2.1:	Phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn.....	44
Hình 2.2:	Phương pháp sinh thiết phôi bào ngày 3.....	45
Hình 2.3:	Kết quả a-CGH phôi 46,XX .....	46
Hình 2.4:	Kết quả a-CGH phôi 46,XY .....	46
Hình 2.5:	Phương pháp sinh thiết nguyên bào lá nuôi .....	47
Hình 3.1:	Kết quả a-CGH của 1257 phôi ngày 3.....	55
Hình 3.2:	Thế loại (mức độ LBNST) của 1257 phôi ngày 3.....	56
Hình 3.3:	Lệch bội NST thể phức tạp ( $\geq 4$ cặp NST). .....	56
Hình 3.4:	Lệch bội ở 3 cặp NST (45,XY;+15,-16,-19).....	57
Hình 3.5:	Lệch bội ở 2 cặp NST (44,XX;-17,-19).....	57
Hình 3.6:	Lệch bội ở NST 18 (47,XY; +18).....	57
Hình 3.7:	Lệch bội ở NST 22 (45,XX;-22). .....	57
Hình 3.8:	Phôi số 4 vào ngày 3 của bệnh nhân Zaic.S.....	64
Hình 3.9:	Phôi số 2 vào ngày 3 của bệnh nhân Garcia.A.....	64
Hình 3.10:	Phôi số 9 vào ngày 3 của bệnh nhân Borchardt.M.....	65
Hình 3.11:	Phôi số 7 vào ngày 3 của bệnh nhân Waner.T. ....	66
Hình 3.12:	Phôi số 4 vào ngày 3 của bệnh nhân Lucente.M.....	67
Hình 3.13:	Phôi số 5 vào ngày 3 của bệnh nhân Dacy.S. ....	68
Hình 3.14:	Phôi số 8 vào ngày 3 của bệnh nhân Dittrich.J. ....	68
Hình 3.15:	Phôi số 6 vào ngày 3 của bệnh nhân Shen.M.....	69
Hình 3.16:	Phôi số 7 và 8 vào ngày 5 của bệnh nhân Guarino.T. ....	76
Hình 3.17:	Phôi số 3 của vào ngày 6 của bệnh nhân Cherry.E. ....	77

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm (In-Vitro Fertilization/ IVF) đóng một vai trò quan trọng trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản, và ngày càng được phát triển rộng khắp trên thế giới. Để điều trị thụ tinh trong ống nghiệm đạt kết quả cao đảm bảo cho ra đời một thế 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 như: kích thước và số lượng các phôi bào, số lượng nhân của phôi bào và tỷ lệ các mảnh vụn tế bào trong phôi [1]. Chúng ta đều biết rằng đánh giá về hình thái không phản ánh đầy đủ chất lượng thực của phôi, đã hạn chế đến kết quả điều trị thụ tinh trong ống nghiệm. Nhiều khi phôi có chỉ số hình thái cao lại không làm tổ được hoặc không tạo ra trẻ khoẻ mạnh, ngược lại, một số lượng phôi có chỉ số hình thái thấp lại có thể tạo ra em bé bình thường. Trong nhiều trường hợp, phôi không phát triển và không làm tổ được hoặc bị sảy sớm là do phôi bị rối loạn về số lượng nhiễm sắc thể như: vô nhiễm (thiếu cả hai nhiễm sắc thể tương đồng), đơn nhiễm (thiếu một nhiễm sắc thể), tam nhiễm (thừa một nhiễm sắc thể). Hiện tượng thiếu, thừa nhiễm sắc thể nói trên gọi là lệch bội nhiễm sắc thể (LBNST/aneuploidy).

Lệch bội nhiễm sắc thể ở noãn và phôi người thu được trong quá trình điều trị thụ tinh trong ống nghiệm đã được nêu lên từ lâu và rất nhiều nghiên cứu cũng đã công nhận là hiện tượng lệch bội nhiễm sắc thể xảy ra ở giai đoạn trước khi làm tổ. Rối loạn lệch bội nhiễm sắc thể tăng theo tuổi, hơn một nửa số noãn thu được của phụ nữ trên bốn mươi tuổi có rối loạn lệch bội nhiễm sắc thể. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể càng tăng trên phôi của các cặp vợ chồng bị sảy thai liên tiếp hoặc đã từng điều trị thụ tinh trong ống nghiệm

hoặc bơm tinh trùng vào buồng tử cung (IUI/ Intra-Uterine Insemination) nhiều lần thất bại. Phần lớn các trường hợp, lệch bội nhiễm sắc thể gây ảnh hưởng đến sự sống và phát triển của phôi. Phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể có thể biểu hiện qua hình thái của phôi.

Nhiều nghiên cứu đã đề cập đến hình thái của phôi như phôi có nhiều mảnh vụn tế bào, phôi có kích thước các phôi bào không đồng đều, phôi bào đa nhân, phôi có số lượng phôi bào không điển hình đều có liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể [2]. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho rằng mối liên quan này không chặt chẽ do những giới hạn về mặt kỹ thuật, hoặc chưa có kỹ thuật kiểm tra toàn bộ nhiễm sắc thể của phôi.

Hầu hết các nghiên cứu cũng như thử nghiệm lâm sàng 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 nhiễm sắc thể của phôi (một số lượng lớn nhiễm sắc thể không được kiểm tra) để suy luận đánh giá toàn bộ phôi nên tỷ lệ chẩn đoán âm tính giả cao (phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể mà đánh giá là bình thường). Các sai lầm về đánh giá phôi nói trên sẽ làm cho tỷ lệ phôi chuyển bị lệch bội nhiễm sắc thể cao, làm giảm tỷ lệ có thai, và quan trọng hơn là cho ra đời những trẻ mang bộ nhiễm sắc thể bất thường, gây nỗi đau cho gia đình, giảm chất lượng dân số, thêm gánh nặng cho xã hội.

Trong vài năm gần đây, một số phương pháp xét nghiệm di truyền mới đã được áp dụng để xét nghiệm toàn bộ 23 cặp nhiễm sắc thể của phôi như phương pháp lai so sánh bộ gen dùng chip DNA (a-CGH/array-comparative genomic hybridization), phương pháp phân tích đa hình đơn dùng chip DNA (a-SNP/Single-nucleotide polymorphism), phương pháp phản ứng chuỗi định lượng (qPCR/quantitative polymerase chain reaction). Nhờ kết hợp những phương pháp mới này cùng với tiến bộ trong sinh thiết phôi nói chung và sinh

thiết phôi ở giai đoạn phôi nang mà các nhà lâm sàng có thể chọn lựa tương đối chính xác 1-2 phôi có số lượng nhiễm sắc thể bình thường, có khả năng làm tổ cao để chuyển phôi, góp phần làm tăng tỷ lệ làm tổ, giảm tỷ lệ sảy thai và đa thai.

Do vậy kỳ vọng của nghiên cứu này là áp dụng một kỹ thuật di truyền phân tử 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 46 nhiễm sắc thể của phôi, làm cơ sở để khuyến cáo ứng dụng một phương pháp chọn lọc phôi hữu hiệu, chính xác hơn góp phần làm tăng hiệu quả của kỹ thuật điều trị thụ tinh trong ống nghiệm, đồng thời có đủ dữ liệu chính xác hơn để nghiên cứu một số yếu tố liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể, làm cơ sở để phòng bệnh, dự đoán và tư vấn.

Để đáp ứng được yêu cầu trên, nghiên cứu cần có các mục tiêu sau:

- 1. Xác định tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể trên 23 đôi nhiễm sắc thể 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 lệch bội nhiễm sắc thể khi phát triển thành phôi nang.***
- 2. Nghiên cứu một số yếu tố liên quan với lệch bội nhiễm sắc thể của phôi ngày 3 trước làm tổ.***



## Chương 1

### TỔNG QUAN

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

##### 1.1.1 Phôi ở giai đoạn tiền nhân.

Noãn được thụ tinh tạo thành hợp tử và phát triển thành phôi qua nhiều giai đoạn, khởi đầu là giai đoạn tiền nhân. Tiền nhân đực và tiền nhân cái thường hình thành cùng một lúc. Tiền nhân đực hình thành gần vị trí tinh trùng thâm nhập và tiền nhân cái hình thành ở cực bào tương có thoi phân bào [3]. Khoảng 4 giờ sau khi tiêm tinh trùng vào bào tương của noãn hoặc 5-6 giờ sau cấy noãn với tinh trùng có thể nhìn thấy hình ảnh các tiền nhân có kích thước nhỏ và mờ. Khoảng 15 giờ sau khi thụ tinh, hai tiền nhân nằm sát nhau và có hình số 8, và phần tiếp xúc sát nhau tạo thành một mặt phẳng, đồng thời các hạt nhân (nucleoli) sẽ di chuyển và xếp hàng cạnh vùng tiếp xúc hai tiền nhân. Mỗi tiền nhân có khoảng 1 đến 9 hạt nhân. Tiền nhân nhỏ có ít hạt nhân hơn [4].

##### 1.1.2. Phôi ở giai đoạn phân chia (ngày 2-3 sau thụ tinh).

\* *Sự phân chia bào tương (cytokinesis.)*

Sự phân chia của phôi bao gồm một loạt các chu kỳ phân bào của bào tương, mặc dù kích thước phôi thay đổi không đáng kể. Trung thể của tinh trùng kiểm soát sự phân chia đầu tiên sau thụ tinh [5].

Trong chu kỳ phân bào đầu tiên ở giai đoạn cuối, bào tương của hợp tử kéo dài ra và thắt lại dần ở giữa cho đến khi hợp tử phân chia thành hai phôi bào. Quá trình này tiếp tục trong những chu kỳ phân bào tiếp theo và kích thước của phôi bào giảm khoảng 28,5% cho mỗi chu kỳ phân bào. Trong 3 chu kỳ phân bào đầu tiên, kích thước của phôi thường ít thay đổi. Phôi có 2

đến 8 phôi bào phụ thuộc chủ yếu vào sự dịch mã (translation) từ các chất liệu RNA của mẹ để phân chia [6].

*\* Hình thái bất thường của phôi xảy ra trong quá trình phát triển của phôi.*

Đánh giá hình thái của phôi tạo ra trong ống nghiệm đóng vai trò quan trọng làm tăng tỷ lệ làm tổ và có thai trong điều trị thụ tinh trong ống nghiệm. Phôi tạo ra trong ống nghiệm có các hình thái khác nhau. Ở hầu hết các trung tâm hỗ trợ sinh sản, để đánh giá chất lượng của phôi thường dựa vào các chỉ số hình thái như số lượng mảnh vụn tế bào, kích thước đồng nhất của phôi bào, số lượng nhân tế bào.

- Mảnh vụn tế bào.

Mảnh vụn được tạo ra là do các phôi bào luôn luôn thay đổi hình dạng, các phôi bào tiếp xúc hoặc không tiếp xúc với nhau trong quá trình phân chia, vì vậy tạo nên những mảnh vụn tế bào sau phân chia.

Phôi có số lượng mảnh vụn nhiều thường làm tổ kém hơn có thể là do giảm lượng bào tương sau chu kỳ phân bào bình thường và dẫn đến giảm số lượng phôi bào ở phôi nang. Nhiều mảnh vụn cũng làm ảnh hưởng tới quá trình phôi kết đặc lại do giảm tiếp xúc giữa các phôi bào với nhau. Các mảnh vụn xuất hiện sớm sau chu kỳ phân bào đầu tiên thường ảnh hưởng nhiều hơn đến sự phát triển của phôi. Mặt khác, những mảnh vụn nhỏ xuất hiện chậm sẽ ít hoặc không ảnh hưởng đến phôi.

- Phôi bào đa nhân (multinucleated blastomeres/MNB).

Phôi bào đa nhân có thể xuất hiện ở bất kỳ chu kỳ phân chia nào từ 2 phôi bào đến giai đoạn phôi nang, nhưng quan sát rõ ở giai đoạn 2 phôi bào. Ở các giai đoạn sau sẽ khó quan sát hơn do phôi có nhiều phôi bào và mảnh vụn. Phôi bào đa nhân có khả năng làm tổ kém do đó giảm tỷ lệ có thai và tỷ lệ sống sót [7].

- Kích thước phôi bào không đều.

Một trong những nguyên nhân làm kích thước phôi bào không đều là do sự phân chia không đồng bộ và thiếu cân đối (asynchronous and asymmetrical) hoặc 1 hay nhiều phôi bào ngừng phân chia. Phôi có kích thước phôi bào to nhỏ không đồng đều cũng có khả năng làm tổ thấp hơn phôi có kích thước phôi bào đồng đều [8].

- Phôi có kích thước lớn bất thường.

Phôi có kích thước lớn bất thường là kết quả của sự thụ tinh với noãn lớn bất thường (giant egg). Phôi hoặc noãn này có kích thước khoảng 200  $\mu\text{m}$  (bao gồm cả màng trong suốt). Phôi loại này thường là tam bội hoặc tam bội thể khảm và có thể phát triển thành phôi nang [9].

- Phôi có một phôi bào to nổi trội.

Phôi có một phôi bào to và xung quanh là các mảnh vụn tế bào có kích thước nhỏ hơn kích thước phôi bào thông thường và thường là đa bội hoàn toàn hoặc thể khảm. Phôi bào to nổi trội này thường là đa nhân [10] và không bao giờ được chọn để chuyển phôi.

- Phôi có bào tương bất thường không đều (irregularities).

Bào tương của phôi loại này thường có chứa không bào (vacuoles) hoặc thể vùi tối màu (dark inclusions) và liên quan nhiều đến rối loạn về nhiễm sắc thể nên khả năng phát triển và làm tổ kém [10].

- Phôi có hình thon dài (elongated shape embryos).

Phôi có hình thon dài thường phát triển và có khả năng làm tổ như phôi có hình dạng bình thường [10].

\* *Tốc độ phân chia của phôi.*

Tốc độ phân chia có liên quan đến khả năng sống của phôi. Phôi phân chia chậm thường có khả năng làm tổ kém hơn. Tốc độ nhân đôi tế bào ở phôi người từ ngày 2 đến 6 sau thụ tinh là khoảng 31 giờ, tốc độ nhân đôi này càng nhanh hơn sau hai lần phân chia đầu [6]. Phôi tạo ra trong ống nghiệm thường

có tốc độ nhân đôi dưới 24 giờ. Phôi khỏe mạnh có tốc độ phân chia vào khoảng 18-20 giờ (2 phôi bào sau 24 giờ thụ tinh, 4 phôi bào sau dưới 48 giờ và 8 phôi bào hoặc hơn trước 72 giờ).

Phôi phân chia chậm thường có khả năng làm tổ và sinh sống thấp hơn phôi phát triển bình thường. Vì vậy khi đánh giá lựa chọn phôi, chúng ta thường kết hợp các yếu tố: tốc độ phát triển phôi, hình thái của phôi như số lượng mảnh vụn, độ dày mỏng của màng trong suốt, độ phát triển của phôi bào, và số lượng nhân tế bào.

Trong thực tiễn, phôi có 2 phôi bào thường thấy ở thời điểm 24 giờ sau thụ tinh (có khi sớm hơn vào khoảng 20 giờ) và tồn tại cho đến 42 giờ. Phôi có 4 phôi bào ở thời điểm 36-60 giờ sau thụ tinh. Phôi có 8 phôi bào ở thời điểm sau 54 giờ và thường trước 72 giờ (hình 1.1). Ở người, còn thấy phôi có 3-5 và 7 phôi bào đó là do phôi được quan sát khi đang phân chia. Một số nghiên cứu thấy rằng phôi nam phát triển nhanh hơn phôi nữ [11],[12].

Đối với trứng thụ tinh bình thường, nếu không phân chia trong vòng 24 giờ thường dẫn đến giảm khả năng sống, nhưng nếu phân chia nhanh quá (phân chia trong vòng 12 giờ) cũng không phải là dấu hiệu phôi tốt [13].

Phôi có 3 tiền nhân có thể phân chia với tốc độ nhanh hơn cho đến giai đoạn phôi dâu và sau đó thường ngừng phát triển. Những hợp tử này có thoi phân bào có 3 cực phân chia thành 3 phôi bào ở giai đoạn phân chia đầu tiên dẫn đến phôi có nhiều phôi bào hơn sau phân chia chứ không phải là phôi phát triển nhanh hơn.



**Hình 1.1:** Sự phát triển của phôi ngày 2 và 3 (từ trái qua phải: phôi có 2 phôi bào, 4 phôi bào, 6 phôi bào và 8 phôi bào) (Nguồn: RRFC)

### 1.1.3 Phôi dâu (phôi ngày 4).

Ở người phôi dâu bắt đầu hình thành khi phôi ở giai đoạn 8 phôi bào và bắt đầu quá trình kết đặc (compaction). Quá trình phôi kết đặc là một quá trình hình thành các liên kết chặt chẽ giữa các phôi bào, phần phôi bào tiếp xúc với nhau tăng lên và dàn phẳng ra tạo thành một khối không nhìn rõ các ranh giới giữa các phôi bào, bề mặt của phôi được phủ một lớp vi nhung mao (microvilli). Các phôi bào hoặc mảnh vụn tế bào mà không hình thành liên kết với các phôi bào khác sẽ bị đẩy ra ngoài khối phôi nhưng vẫn ở phía trong màng trong suốt cho tới khi phôi thoát màng [14]. Khi phôi bắt đầu kết đặc lại, các phôi bào tương tác với nhau làm các phôi bào không còn đặc tính toàn năng (totipotency) nữa và đây là sự khởi đầu cho sự sao mã DNA của phôi.

Dưới kính hiển vi, hình thái của phôi dâu được thể hiện bằng sự tăng tiếp xúc giữa các phôi bào, nhưng ranh giới giữa các phôi bào còn nhìn thấy. Khi quá trình kết đặc tăng dần, ranh giới giữa các phôi bào trở nên khó phân biệt do các phôi bào dàn phẳng ra và kết liền với nhau. Phôi dâu lúc ở giai đoạn này hoàn toàn trông như một tế bào có nhiều nhân (hình 1.2). Phôi dâu ở người có thể xuất hiện sớm khoảng 65 giờ sau thụ tinh, nhưng thường xuất hiện giữa ngày thứ 3 và thứ 4 sau thụ tinh [15].



**Hình 1.2:** Phôi dâu ngày 4 (từ trái qua phải: các phôi bào bắt đầu kết đặc ở vài điểm nhưng vẫn nhìn rõ ranh giới giữa các phôi bào; các phôi bào kết đặc nhưng thấy ranh giới ở góc 9-12 giờ, có nhiều nhân; kết đặc hoàn toàn không rõ ranh giới các phôi bào) (Nguồn: RRFC)

### 1.1.4 Phôi nang (phôi ngày 5-6).

Sau khi phôi kết đặc, phôi bắt đầu lớn dần và tạo nang dịch bên trong (hình 1.3) tạo điều kiện cho sự phát triển để phôi bào biệt hóa thành nguyên bào lá nuôi và mầm phôi. Quá trình tạo nang bao gồm sự tích lũy dịch vận chuyển bởi các nguyên bào lá nuôi. Để hoàn thành quá trình này, nguyên bào lá nuôi đầu tiên phụ thuộc vào sự hoàn thành quá trình phân cực tế bào và hình thành mối liên kết chặt giữa các nguyên bào lá nuôi. Sự liên kết và vị trí các phôi bào trong phôi kiểm soát sự phân cực tế bào.



**Hình 1.3:** Phôi giai đoạn tạo nang/ cavitation (từ trái qua phải: xuất hiện khe dịch ở góc 2 giờ; các khe dịch lớn dần, nhiều lên, khe dịch chiếm dưới 1/2 thể tích phôi) (Nguồn: RRFC)

Sự hình thành và phát triển phôi nang phụ thuộc vào một số yếu tố liên quan đến bệnh nhân như: chất lượng tinh trùng, tuổi của mẹ cũng như các yếu tố khác liên quan đến sự phát triển của phôi ở giai đoạn trước đó. Số lượng noãn thu được, số lượng trứng thụ tinh, số lượng hợp tử, và số lượng phôi phát triển đến giai đoạn 8 phôi bào vào ngày 3 cũng ảnh hưởng đến sự hình thành phôi nang.

Phôi nang thường hình thành khoảng 100 giờ sau khi thụ tinh. Sau 5-6 ngày nuôi cấy, 26-65% phôi sẽ phát triển đến giai đoạn này. Sự phát triển còn tùy thuộc vào phương pháp nuôi cấy và thành phần của môi trường nuôi cấy.

\* *Sự biệt hóa tế bào.*

Ở người, phôi ở giai đoạn 8 phôi bào vẫn có đặc tính toàn năng (totipotent), bằng chứng là khi tiến hành chẩn đoán trước làm tổ, nếu sinh

thiết một hoặc hai phôi bào thì phôi vẫn có khả năng phát triển bình thường. Tuy nhiên, nếu sinh thiết một phôi bào ở giai đoạn  $\leq 4$  phôi bào sẽ ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi và giảm số lượng nguyên bào phôi (mầm phôi) [16]. Trong quá trình hình thành phôi nang, 2 loại phôi bào được hình thành là nguyên bào phôi (Inner Cell Mass/ICM) và nguyên bào lá nuôi (Trophectoderm/TE). Nguyên bào lá nuôi là loại phôi bào được biệt hóa đầu tiên trong quá trình hình thành thai. Hai loại phôi bào này ngày càng khác nhau khi chúng di chuyển tới các vị trí mới trong quá trình tạo nang. Nguyên bào lá nuôi có hình bầu dục và phân cực (polarization) trong khi đó nguyên bào phôi có vẫn giữ hình tròn và hình thái không thay đổi. Các nguyên bào lá nuôi nối với nhau qua những phần tiếp xúc bề mặt nhỏ, trong khi đó nguyên bào phôi tiếp xúc chặt chẽ với nhau tạo thành một khối. Vị trí và sự phát triển của nguyên bào lá nuôi và nguyên bào phôi phụ thuộc vào sự phân cực và sự hình thành trục phân bào của phôi được hình thành từ khi trứng mới bắt đầu được thụ tinh. Các nguyên bào phôi di chuyển về phía một cực của phôi gọi là cực phôi (embryonic pole), các phôi bào này liên kết chặt với nhau và có đặc tính đa năng (pluripotent). Các nguyên bào lá nuôi tạo thành hàng rào bên ngoài bảo vệ mầm phôi và được biệt hóa để thực hiện chức năng này [17].

*\* Số lượng phôi bào của phôi nang.*

Để đảm bảo phôi phát triển và làm tổ, số lượng phôi bào của phôi nang và tỷ lệ giữa số lượng nguyên bào phôi và số lượng nguyên bào lá nuôi được chi phối và điều hòa bởi hệ thống gen. Ở người, tốc độ phân chia của nguyên bào lá nuôi nhanh hơn so với tốc độ phân chia của nguyên bào phôi. Nguyên bào lá nuôi nhân đôi khi bắt đầu quá trình tạo nang vào ngày thứ 4 để tạo thành phôi nang vào ngày thứ 5, trong khi đó nguyên bào phôi nhân lên vào ngày thứ 5 và 6. Khi phôi nang lớn dần, tốc độ nhân lên của nguyên bào lá nuôi là 1.5 chu kỳ/ 24 giờ nhanh hơn so với nguyên bào phôi [18]. Thông

thường tổng số phôi bào của phôi nang là trên 60 phôi bào. Ở người, phôi nang ngày 5 có khoảng 60 phôi bào, tăng đến 160 vào ngày 6 và trên 200 sau khi thoát màng vào ngày 7; 40% số phôi bào tạo mầm phôi [18].

### **1.1.5 Các phương pháp đánh giá chất lượng phôi.**

Sự phân chia phôi bào xảy ra đồng thời với hiện tượng sao lại các chất liệu di truyền, nếu sự phân chia bất thường sẽ làm thay đổi số lượng phôi bào, hình dạng phôi bào, rối loạn các nhiễm sắc thể ảnh hưởng đến chất liệu di truyền nằm trong ổ gen trên các nhánh của nhiễm sắc thể. Hậu quả là phôi không phát triển được và phôi chết, hoặc thụ thai chất lượng kém sinh ra những đứa trẻ tật nguyền. Vì vậy đánh giá phôi để chọn lọc phôi mang ý nghĩa nhân văn, cần được nghiên cứu thận trọng để áp dụng có hiệu quả. Sau đây là các phương pháp đánh giá phôi đã được công bố và áp dụng.

*\* Đánh giá tiền nhân.*

Đánh giá tiền nhân phụ thuộc vào kích thước của tiền nhân và vị trí của tiền nhân. Có nhiều hệ thống thang điểm để đánh giá tiền nhân. Hệ thống được sử dụng phổ biến ở Việt Nam là đồng thuận về hệ thống đánh giá tiền nhân của tổ chức Alpha (bảng 1.1) [19].

**Bảng 1.1:** Đồng thuận về hệ thống đánh giá tiền nhân của tổ chức Alpha.

Thang điểm	Phân loại	Mô tả
1	Đối xứng	2 tiền nhân có kích thước tương đối đều; kích thước và số hạt nhân như nhau (3-7); các hạt nhân nằm song song với đường tiếp xúc giữa 2 tiền nhân hay phân bố rải rác
2	Không đối xứng	Những cách sắp xếp khác của tiền nhân như nằm ở vùng ngoại vi của trứng
3	Bất thường	Tiền nhân với 1 hoặc không có hạt nhân



\* *Đánh giá phôi vào thời điểm ngày thứ 3 kể từ khi thụ tinh.*

- Đánh giá dựa vào quan sát các đặc điểm phôi bào.

Phôi bào phân chia theo quy luật nhân 2, như vậy số lượng phôi bào thường là chẵn. Số lượng phôi bào có thể là số lẻ 3, 5, 7 khi quan sát ở giai đoạn phân chia hay khi xuất hiện sự phân chia không đồng bộ. Hiện tượng này xảy ra còn có thể do một phần bào tương ở trong phôi bị vỡ ra tạo thành mảnh vụn tế bào không có nhân, không tạo thành một phôi bào trong quá trình phân chia (tạo ra số phôi bào lẻ). Bình thường, phôi gồm các phôi bào có kích thước gần như bằng nhau sắp xếp cạnh nhau tạo thành hình cái bánh tròn, kích thước phôi hầu như không thay đổi mặc dầu số phôi bào tăng sau phân chia. Có nhiều hệ thống điểm đánh giá phôi. Hệ thống được dùng phổ biến ở Việt Nam và châu Âu gọi là đánh giá phôi đồng thuận của tổ chức Alpha (bảng 1.2) [19].

**Bảng 1.2:** Đồng thuận về hệ thống đánh giá phôi ở giai đoạn phân chia của tổ chức Alpha.

Thang điểm	Đánh giá	Mô tả
1	Tốt	<10% mảnh vụn tế bào Kích thước phôi bào phù hợp theo giai đoạn phát triển Không có phôi bào đa nhân
2	Trung bình	10-25% mảnh vụn tế bào Phần lớn phôi bào có kích thước phù hợp với giai đoạn phát triển Không có phôi bào đa nhân
3	Xấu	>25% mảnh vụn tế bào Kích thước phôi bào không phù hợp giai đoạn phát triển Có phôi bào đa nhân

\* *Đánh giá phôi nang ngày 5 và 6.*

Đánh giá phôi nang dựa vào độ phát triển rộng của khoang phôi nang và hiện tượng thoát màng (hình 1.4). Phôi nang được đánh giá dựa vào tiêu chuẩn của Gardner [20].

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

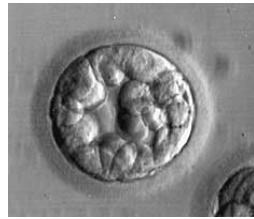
- Giai đoạn 1: phôi nang giai đoạn sớm (early blastocyst) khi khoang dịch chiếm dưới ½ tổng thể tích của phôi.
- Giai đoạn 2: phôi nang (blastocyst) khi khoang dịch chiếm trên ½ tổng thể tích của phôi.
- Giai đoạn 3: phôi nang đầy (full blastocyst) khi khoang dịch chiếm hầu hết thể tích của phôi.
- Giai đoạn 4: phôi nang rộng (expanded blastocyst) khi khoang dịch phát triển rộng làm cho màng trong suốt bắt đầu mỏng dần.
- Giai đoạn 5: phôi nang đang thoát màng (hatching blastocyst) khi nguyên bào lá nuôi bắt đầu thoát ra khỏi màng trong suốt.
- Giai đoạn 6: phôi nang đã thoát màng (hatched blastocyst) khi 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 dưới kính hiển vi đảo ngược về đặc điểm mầm phôi (inner cell mass/ICM) và nguyên bào lá nuôi (trophectoderm cells /TE ) như sau:

- Đánh giá mầm phôi (inner cell mass /ICM):
  - Loại A =khi có rất nhiều tế bào liên kết chặt chẽ.
  - Loại B =khi vài tế bào liên kết lỏng lẻo.
  - Loại C =khi có rất ít tế bào.
  - Loại D =không nhìn thấy mầm phôi.

- Đánh giá nguyên bào lá nuôi (trophectoderm cell /TE ):
  - Loại A = nhiều tế bào liên kết tạo thành biểu mô kết.
  - Loại B = vài tế bào tạo thành biểu mô rời rạc.
  - Loại C = có vài tế bào lớn.



Phôi nang giai đoạn sớm



Phôi nang



Phôi nang đầy



Phôi nang rộng



Phôi nang đang thoát màng



Phôi nang đã thoát màng

**Hình 1.4:** Phân loại phôi nang (Nguồn: RRFC).

## 1.2. Hiện tượng lệch bội nhiễm sắc thể của noãn và phôi.

Lệch bội nhiễm sắc thể là hiện tượng số lượng nhiễm sắc thể của tế bào tăng lên hoặc giảm đi một hoặc vài nhiễm sắc thể so với bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội. Mất cân bằng về nhiễm sắc thể sẽ dẫn đến tình trạng phôi ngừng phát triển trước khi làm tổ, sảy hoặc thai chết lưu, tuy nhiên phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể có thể sống nhưng phát triển thành thai bất thường như trong trường hợp hội chứng Down hoặc hội chứng Klinefelter. Lệch bội nhiễm sắc thể là yếu tố quan trọng làm cho tỷ lệ sinh sản ở người thấp.

Hơn 50 năm trôi qua kể từ những ca đầu tiên phát hiện tình trạng lệch bội nhiễm sắc thể, các nhà khoa học trên thế giới đã thu thập được nhiều thông tin về nguồn gốc cũng như nguyên nhân gây ra tình trạng lệch bội

nhiễm sắc thể. Nhiều nghiên cứu đã thấy rằng phôi người ở giai đoạn sớm thường có lệch bội nhiễm sắc thể và trên 50% phôi tạo ra trong ống nghiệm có chứa phôi bào bị lệch bội nhiễm sắc thể. Bất thường về nhiễm sắc thể dẫn đến kết quả không tốt như phôi không làm tổ được, sảy thai và sinh ra những đứa trẻ bị tam thể. Những hiểu biết về cơ chế, nguồn gốc cũng như những yếu tố ảnh hưởng đến hiện tượng lệch bội nhiễm sắc thể sẽ góp phần làm tăng hiệu quả của việc điều trị thụ tinh trong ống nghiệm một cách đáng kể.

Lệch bội nhiễm sắc thể là hiện tượng đặc biệt hay gặp ở giao tử và phôi người do sự sai lệch trong phân ly của nhiễm sắc thể. Cơ chế được bàn đến nhiều nhất là hiện tượng không phân ly (non-disjunction) tuy nhiên, trong những năm gần đây vấn đề này được nghiên cứu nhiều và các cơ chế mới đã được đề xuất.

Một số nghiên cứu cho rằng gần một nửa noãn người là bị lệch bội nhiễm sắc thể, tỷ lệ này tăng lên đáng kể khi người phụ nữ trên 35 tuổi [21],[22]. Ngược lại, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở tinh trùng của nam giới có khả năng sinh sản bình thường là tương đối thấp 4-7% [23],[24]. Tuy nhiên, tỷ lệ này có thể tăng đáng kể trong một số trường hợp vô sinh nam nặng.

Tình trạng lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi tạo ra trong ống nghiệm hoặc phôi tạo ra tự nhiên trong cơ thể chủ yếu xảy ra trong 3 giai đoạn phát triển đầu tiên: giai đoạn trước phân bào giảm nhiễm tạo giao tử; trong quá trình phân bào giảm nhiễm tạo giao tử và trong giai đoạn phân bào sớm của phôi. Những hiểu biết về cơ chế gây nên hiện tượng lệch bội nhiễm sắc thể ở những giai đoạn này giúp chúng ta hiểu thêm về những hạn chế của phương pháp sàng lọc trước làm tổ khi ứng dụng trên lâm sàng và tìm ra các biện pháp cải tiến.

*\* Lệch bội nhiễm sắc thể do yếu tố nội tại, tế bào sinh dục gốc thể khảm:*  
Những sai lệch trong quá trình tế bào sinh dục gốc (germ cell) phân chia dẫn

đến tình trạng lệch bội nhiễm sắc thể thể khảm ở tế bào gốc dẫn đến hình thành lệch bội nhiễm sắc thể ở giao tử. Đây là giai đoạn ít được quan tâm và nghiên cứu nhất. Trong tất cả các trường hợp, kết quả là tạo ra giao tử có nhiều hoặc ít hơn về số lượng nhiễm sắc thể.

\* *Lệch bội nhiễm sắc thể sinh ra trong quá trình phân bào*: Trong trường hợp này tế bào gốc bình thường nhưng nhiễm sắc thể bị thay đổi xảy ra trong quá trình phân bào. Trong phân bào giảm nhiễm, những sai lệch trong việc phân ly nhiễm sắc thể trong giai đoạn này sẽ tạo ra giao tử bị lệch bội nhiễm sắc thể và sự hợp nhất giao tử bị lệch bội nhiễm sắc thể sẽ tạo ra phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể. Ở người, những sai lệch trong quá trình phân bào nguyên nhiễm thường xảy ra khi phôi ở giai đoạn phân chia sớm, các phôi bào còn có xu hướng phân chia sai lệch. Hầu hết sự sai lệch trong phân bào nguyên nhiễm ở phôi giai đoạn đầu sẽ dẫn đến tạo ra phôi thể khảm nghĩa là phôi có  $\geq 2$  dòng phôi bào có thành phần nhiễm sắc thể khác nhau. Có ba giả thiết về cơ chế gây nên lệch bội nhiễm sắc thể trong phân bào nguyên nhiễm: (1) thiếu nhiễm sắc thể do sự chậm trễ của kỳ sau (anaphase); (2) sự nhân lên của một nhiễm sắc thể (cơ chế vẫn chưa được hiểu rõ); (3) nhiễm sắc thể thiếu, thừa tương ứng (reciprocal chromosome loss and gain) do nhiễm sắc thể không phân ly hoặc giai đoạn kỳ sau bị ngừng trệ tạo nên một phôi bào thiếu nhiễm sắc thể và một phôi bào thừa nhiễm sắc thể tương ứng.

\* *Lệch bội thể sinh ra do những bất thường trong thụ tinh*: Khoảng 1% thai có bộ nhiễm sắc thể lớn hơn  $2n$  do bộ nhiễm sắc thể được tăng một số chẵn hoặc lẻ lần và được gọi là đa bội. Có 3 cơ chế dẫn đến hiện tượng đa bội (1) tinh trùng hoặc noãn lưỡng bội tham gia vào quá trình thụ tinh; (2) hai hay nhiều tinh trùng tham gia vào quá trình thụ tinh; (3) sự tồn tại của cực cầu 2 (second polar body retention). 60% các trường hợp đa bội là do thụ tinh với nhiều tinh trùng [25].

### 1.3. Phôi thể khảm.

Nhờ có kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm mà các bất thường về nhiễm sắc thể của phôi người giai đoạn tiền làm tổ đã được phát hiện. Vào năm 1993, Delhanty và cộng sự lần đầu tiên công bố hiện tượng phôi thể khảm giai đoạn trước làm tổ [26]. Phôi thể khảm là phôi có 2 hay nhiều dòng phôi bào có số lượng nhiễm sắc thể khác nhau có trong một phôi.

Phôi thể khảm có thể chứa dòng phôi bào bình thường với dòng phôi bào bất thường, hoặc có thể chứa các dòng phôi bào bất thường khác nhau. Tỷ lệ phôi thể khảm thay đổi từ 15% [27] lên đến trên 90% [28]. Một trong những lý do khiến tỷ lệ phôi thể khảm chênh lệch khá nhiều ở các nghiên cứu khác nhau là do tiêu chuẩn xác định phôi thể khảm được sử dụng khác nhau. Ví dụ, trong nghiên cứu của Baart và cộng sự (2006), và nghiên cứu của Ziebe và cộng sự (2003), phôi được cho là bình thường mặc dù vẫn có mặt một số lượng nhỏ phôi bào bất thường trong phôi [29],[30]. Các tác giả này cho rằng những phôi này vẫn có khả năng phát triển bình thường.

Một nguyên nhân khác là nhiều nghiên cứu về phôi thể khảm được tiến hành trên những phôi thừa, không được sử dụng để chuyển phôi hoặc dự trữ đông lạnh, những phôi này thường có chất lượng kém hơn. Van Echten-Arends năm 2011 phân tích tổng hợp (meta-analysis) 36 nghiên cứu riêng lẻ về hiện tượng phôi thể khảm ở ngày 3, thấy rằng trong tổng số 815 phôi thừa, chỉ có 177 (22%) phôi là bình thường, 599 (73%) phôi thể khảm và 39 (5%) phôi có chứa các bất thường nhiễm sắc thể khác. Trong số các phôi thể khảm, 480 phôi (59% tổng số 815 phôi nghiên cứu) có chứa cả dòng phôi bào bình thường và dòng phôi bào bất thường [31].

Đồng thời phương pháp nghiên cứu di truyền, số lượng nhiễm sắc thể được đánh giá cũng ảnh hưởng đến tỷ lệ phôi thể khảm. Tỷ lệ phôi bình thường thấp hơn và tỷ lệ phôi thể khảm có chứa dòng phôi bào bình thường

và bất thường cao hơn khi nhiều nhiễm sắc thể được đánh giá. Đánh giá toàn bộ 23 cặp nhiễm sắc thể bằng phương pháp a-CGH sẽ có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể và thể khảm cao hơn khi dùng phương pháp FISH. Tỷ lệ phôi thể khảm cao ở hầu hết các nghiên cứu chỉ ra rằng những sai sót trong phân bào rất thường gặp ở phôi người giai đoạn trước làm tổ.

Quá trình kích thích buồng trứng và điều kiện nuôi cấy phôi có thể gây hiện tượng phôi thể khảm. Kết quả nghiên cứu của Bean và cộng sự (2002) và của Baart và cộng sự (2007) thấy rằng kích thích buồng trứng quá mạnh cũng như nuôi cấy phôi trong điều kiện nồng độ oxygen cao có ảnh hưởng đến tỷ lệ phôi thể khảm [32],[33].

Phôi thể khảm thường phát triển chỉ đến giai đoạn phôi dâu và ngừng không phát triển đến giai đoạn phôi nang [34],[35]. Baart và cộng sự nghiên cứu 12 phôi dâu tan đông thấy là cả 12 phôi đều là phôi thể khảm [34]. Santos và cộng sự nghiên cứu 18 phôi dâu, và công bố là tỷ lệ phôi thể khảm giảm từ 83% trong ngày 4 xuống còn 42% ở phôi nang ngày 8 [35].

#### **1.4. Các phương pháp phân tích nhiễm sắc thể của noãn và phôi.**

Chẩn đoán phôi trước làm tổ (PGD/ preimplantation genetic diagnosis) là một kỹ thuật dùng để phát hiện những bất thường về chất liệu di truyền của phôi tạo ra trong ống nghiệm trước khi chuyển phôi vào buồng tử cung. Chẩn đoán trước làm tổ được chỉ định khi hoặc bố mẹ hoặc cả hai đã biết là có bất thường về di truyền và xét nghiệm được tiến hành trên phôi để xem phôi có mang bất thường về di truyền hay không.

Ngược lại, sàng lọc trước làm tổ (PGS/ preimplantation genetic screening) được chỉ định khi phôi tạo ra từ cặp vợ chồng được xem là bình thường về nhiễm sắc thể được kiểm tra xem có bị lệch bội nhiễm sắc thể hay không.

Hiện nay có rất nhiều phương pháp di truyền học phân tử để đánh giá nhiễm sắc thể của con người, dưới đây là những kỹ thuật đã được kiểm chứng và được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực điều trị hỗ trợ sinh sản.

***1.4.1. Phương pháp lai huỳnh quang tại chỗ (fluorescent in situ hybridization/FISH).***

Phương pháp này được dùng để phát hiện hoặc định vị sự có mặt hay không của một đoạn DNA nào đó trên nhiễm sắc thể. Trong phương pháp FISH người ta sử dụng đầu dò huỳnh quang đặc hiệu cho trạng thái của nhiễm sắc thể gắn kết với một đoạn nhiễm sắc thể có tần suất diễn biến cao.

Kính hiển vi huỳnh quang được sử dụng để xem đầu dò huỳnh quang đó bám vào nhiễm sắc thể nào sẽ là chỉ báo trạng thái của nhiễm sắc thể đó.

Phương pháp FISH được sử dụng lần đầu tiên để xét nghiệm phôi người vào năm 1992 [36]. Từ đó, hàng trăm ngàn bệnh nhân làm thụ tinh trong ống nghiệm đã được sàng lọc phôi bằng phương pháp này. Sau một thời gian ứng dụng nhiều nghiên cứu đã cho thấy giảm tỷ lệ sảy thai, tăng tỷ lệ thai làm tổ và tỷ lệ sinh sống khi chuyển các phôi được sàng lọc bằng phương pháp này.

Mặc dù phương pháp FISH đã được cải tiến và góp phần làm tăng hiệu quả điều trị thụ tinh trong ống nghiệm nhưng còn khiếm khuyết quan trọng trong chẩn đoán là chỉ kiểm tra được một lượng giới hạn nhiễm sắc thể (tối đa là 12 cặp nhiễm sắc thể) nên tỷ lệ chẩn đoán âm tính giả cao.

Một điểm hạn chế nữa của phương pháp này là kỹ thuật thực hiện khó, đòi hỏi kinh nghiệm khi cố định và dàn trải một phôi bào ra phiến kính. Điều này không phải ở bất kỳ trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm nào cũng có người thực hiện được kỹ năng thao tác nói trên [37].



#### ***1.4.2. Phương pháp lai so sánh bộ gen (comparative genomic hybridization/CGH).***

Phương pháp lai so sánh bộ gen là một phương pháp di truyền tế bào phân tử dùng để phân tích đánh giá những thay đổi trong quá trình sao chép về số lượng (nhiều/ít) trong thành phần DNA của mẫu được xét nghiệm.

Cùng một lúc phương pháp có thể kiểm tra được toàn bộ nhiễm sắc thể trong một tế bào ở bất cứ giai đoạn phân chia nào mà không cần kỹ thuật cố định tế bào. Trong phương pháp này, sử dụng kỹ thuật lai so sánh/đối chiếu của DNA cần xét nghiệm đã được đánh dấu màu xanh với DNA của nhiễm sắc thể bình thường sử dụng làm chứng được đánh dấu màu đỏ. Tỷ lệ giữa phần huỳnh quang xanh/ phần huỳnh quang đỏ dọc theo nhiễm sắc thể thể hiện số lượng nhiễm sắc thể của mẫu thử với mẫu chứng. Nếu màu huỳnh quang xanh đặc hiệu cho nhiễm sắc thể tăng dư ra chứng tỏ có tăng thêm nhiễm sắc thể (thể tam nhiễm), trái lại nếu màu huỳnh quang đỏ tăng dư ra là biểu hiện thiếu nhiễm sắc thể. Phương pháp này được áp dụng lần đầu tiên trên phôi người vào năm 1996 [38].

Ứng dụng phương pháp CGH để tầm soát phôi đã phát hiện ra sự đa dạng và tần suất rối loạn nhiễm sắc thể của phôi, đã khẳng định rằng tất cả các nhiễm sắc thể của phôi đều có thể bị rối loạn trong giai đoạn trước khi làm tổ. Một số rối loạn chưa từng được phát hiện trong chẩn đoán trước sinh nay đã phần nào sáng tỏ và được coi là nguyên nhân dẫn đến phôi ngừng phát triển, không làm tổ hoặc sảy ở giai đoạn rất sớm.

Phương pháp CGH cũng có thể phát hiện được những bất thường mà phương pháp FISH không thể phát hiện được, ví dụ như đứt đoạn nhiễm sắc thể [39]. Một điểm hạn chế về lâm sàng của phương pháp CGH là độ phức tạp của kỹ thuật và trả lời kết quả chậm phải sau 4 ngày.

#### ***1.4.3. Phương pháp lai so sánh bộ gen dùng chip DNA (array –comparative genomic hybridization/a-CGH).***

Gần đây, một phương pháp đơn giản hơn và cho kết quả nhanh hơn đã được phát triển từ phương pháp CGH là phương pháp lai so sánh bộ gen dùng chip DNA (a-CGH). Nguyên lý của phương pháp này cũng gần giống như phương pháp CGH nhưng có độ nhạy cao hơn, kỹ thuật thao tác đơn giản và nhanh hơn.

Phương pháp này đã được áp dụng thành công trong chẩn đoán tiền làm tổ từ năm 2004 [40]. Năm 2010, phương pháp này đã được kiểm chứng xác minh và được ứng dụng trong điều trị lâm sàng phục vụ chẩn đoán tiền làm tổ ở một số nước tiên tiến như Hoa kỳ và châu âu [41],[42].

#### ***1.4.4. Phương pháp phân tích đa hình đơn nucleotide dùng chip DNA (array Single Nucleotide Polymorphism /a-SNP).***

Phương pháp này cũng có thể đánh giá được cả 23 cặp nhiễm sắc thể dựa trên việc phân tích đa hình đơn nucleotide (single nucleotide polymorphism /SNP). Đa hình đơn nucleotide (SNP) là một chuỗi DNA biến đổi xảy ra khi nucleotide đơn A, T, C hoặc G - trong bộ gen khác nhau giữa các thành viên của một loài sinh học hoặc cặp nhiễm sắc thể trong một cá thể. Chip SNP được tạo bởi các đoạn DNA gọi là oligonucleotide, nó có khả năng phân biệt sự thay đổi của các SNP và vì vậy đem lại thông tin về di truyền của một tế bào.

#### ***1.4.5. Phương pháp phản ứng chuỗi Polymerase (Polymerase chain reaction/PCR).***

Phương pháp phản ứng chuỗi Polymerase (PCR) được dùng để chẩn đoán rối loạn của một gen, bao gồm cả rối loạn gen lặn và gen trội. Phương pháp phản ứng chuỗi polymerase còn được gọi là phương pháp nhân lên DNA (DNA amplification). Khi cần phân tích một đoạn DNA nào đó, người ta

dùng kỹ thuật này để nhân lên đoạn DNA đó, tạo ra nhiều bản sao của phân tử ADN đó rất nhanh chóng để phân tích được dễ dàng và chính xác.

#### ***1.4.6. Phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing/NGS).***

Công nghệ này thực tế là phương thức giải trình tự đồng thời và lượng lớn các đoạn ngắn nucleotide. Phương pháp này được kỳ vọng là làm giảm giá thành chi phí sàng lọc trước làm tổ và có độ chính xác cao. Phương pháp này bắt đầu được áp dụng rộng rãi ở một số nước châu Âu và Mỹ từ năm 2014 để phân tích nhiễm sắc thể của phôi nang.

### **1.5. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở noãn, phôi và một số yếu tố liên quan.**

#### ***1.5.1. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở noãn.***

Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở noãn tương đối cao và tăng dần ở phụ nữ lớn tuổi. Munne và cộng sự sử dụng phương pháp FISH cho 7 cặp nhiễm sắc thể (13, 15, 16, 18, 21, 22, XY) để nghiên cứu cực câu I ở 226 bệnh nhân (26-47 tuổi, trung bình 38,2 tuổi) thấy là tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở nhóm dưới 35 tuổi là 50%; 35-39 tuổi là 60% và trên 40 tuổi là 66,7%) [22].

Sher và cộng sự khi sử dụng phương pháp CGH cho noãn của phụ nữ dưới 35 tuổi thấy 64% bị lệch bội nhiễm sắc thể. Noãn bị lệch bội nhiễm sắc thể sẽ dẫn tới phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể. 80% noãn bình thường sau thụ tinh sẽ dẫn tới phôi bình thường và 87% phôi không phát triển thành phôi nang là bị lệch bội nhiễm sắc thể [21].

#### ***1.5.2. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở tiền nhân.***

Giannaroli và cộng sự 2003, dùng phương pháp FISH 8 đầu dò (X, Y, 13, 15, 16, 18, 21, 22) kiểm tra 496 phôi thấy tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 70%. Các phôi có tiền nhân nằm cách xa nhau, có kích thước khác nhau nhiều hoặc có hạt nhân nhỏ nằm rải rác có liên quan đến tốc độ phát triển chậm, và tăng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể [43].

Chen và cộng sự 2003 sử dụng phương pháp FISH cho nhiễm sắc thể 18, X, Y đánh giá hình thái của tiền nhân theo tiêu chuẩn của Scott thấy là tỷ lệ phôi ngày 3 bình thường ở Z1=71%; Z2=54%, Z3-4=35%. Đánh giá tiền nhân có giá trị chọn lọc hiệu quả phôi có số lượng nhiễm sắc thể bình thường, đặc biệt là phôi có điểm Z1 (phôi tốt nhất) [44].

Balaban và cộng sự năm 2004 sử dụng phương pháp FISH 5 đầu dò (13, 18, 21, X, Y) kiểm tra 267 phôi thấy tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể nói chung là 69,2% và kết luận hình thái của tiền nhân có giá trị tiên lượng khả năng phát triển của phôi và là chỉ báo lệch bội nhiễm sắc thể. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi có tiền nhân bình thường là 25,6%, tỷ lệ này là 73% và 83% tương ứng lần lượt với phôi có 1 tiền nhân bất thường và phôi có hai tiền nhân bất thường [45].

### ***1.5.3. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi ngày 3.***

Sau khi thụ tinh phôi thường được nuôi cấy thêm khoảng 3 ngày (giai đoạn phân chia) đến 5-6 ngày (giai đoạn phôi nang). Trên 50% phôi tạo ra trong ống nghiệm ở giai đoạn phân chia có lệch bội nhiễm sắc thể, tỷ lệ này tăng lên đến trên 80% ở phụ nữ lớn tuổi. Năm 2012 Al-Asma và cộng sự dùng phương pháp FISH 9 đầu dò (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, XY) đánh giá 393 phôi ngày 3 của 70 bệnh nhân có tuổi trung bình 34,6 có tiền sử sảy thai bị lệch bội nhiễm sắc thể (thai tự nhiên hay thai tạo ra trong thụ tinh ống nghiệm), tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 67,8%. Nhiễm sắc thể có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao là 16 và 22 [46].

Rabinowitz và cộng sự năm 2012 sử dụng phương pháp a-SNP đánh giá 274 phôi ngày 3 của 32 phụ nữ (tuổi từ 26-47, trung bình 38) nêu tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 72,3%, tỷ lệ này là 65,7% và 76,2% tương ứng lần lượt với phụ nữ  $\leq 36$  tuổi và trên 36 trong đó 19,7% một nhiễm sắc thể bị ảnh hưởng, 52,5% nhiều nhiễm sắc thể bị ảnh hưởng [47].

Trong thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên của Rubio và cộng sự năm 2013 sử dụng phương pháp FISH với 9 đầu dò 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22 và XY nghiên cứu 265 phôi ngày 3 của 91 phụ nữ có phôi không làm tổ liên tiếp (tuổi trung bình 35,2), và 485 phôi của 93 phụ nữ lớn tuổi (41-44 với tuổi trung bình là 41,8), tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tương ứng là 57,3% và 69,2%. Trong nghiên cứu này nhiễm sắc thể bị ảnh hưởng nhiều nhất ở phụ nữ bị phôi không làm tổ liên tiếp lần lượt là 22, 13, 16, 21, 18, XY, 15 và 17, và ở nhóm phụ nữ lớn tuổi là 22, 16, 21, 15, 13, 18, 17 và XY [48].

Trong một nghiên cứu khác của Rubio và cộng sự năm 2013 sử dụng phương pháp a-CGH kiểm tra phôi của 556 bệnh nhân có tiền sử sảy thai liên tiếp, phôi không làm tổ liên tiếp, vô sinh nam, và phụ nữ lớn tuổi, thấy tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 73,5% [49].

Ở Việt Nam sàng lọc phôi trước làm tổ đang bắt đầu phát triển, trong một nghiên cứu sơ bộ bước đầu đánh giá kết quả sàng lọc trước làm tổ, Nguyễn Việt Tiến và cộng sự năm 2014 sử dụng phương pháp FISH đánh giá 5 nhiễm sắc thể 13, 18, 21, XY đã công bố tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể của 37 phôi ngày 3 là 45,9%, hay gặp nhất ở nhiễm sắc thể 21, thấp nhất ở nhiễm sắc thể giới tính và nhiễm sắc thể 13 [50]. Trong một nghiên cứu khác của Hoàng Thị Hương và cộng sự năm 2014, cũng sử dụng phương pháp FISH 5 đầu dò cho 127 phôi ngày 3 có 6-8 phôi bào, thấy tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 46,4%, hay gặp nhất là nhiễm sắc thể 21, sau đó là 13 và thấp nhất là nhiễm sắc thể giới tính [51].

#### ***1.5.4. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi nang.***

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 bị lệch bội nhiễm sắc thể, tỷ lệ này tăng cùng với tuổi mẹ.

Schoolcraft và cộng sự năm 2010, sử dụng phương pháp CGH trên 269 phôi nang của 45 bệnh nhân có tuổi trung bình là 37 tuổi thấy tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 51,3% [52].

Fragouli và cộng sự năm 2010 cũng sử dụng phương pháp CGH ở nhóm bệnh nhân tuổi trung bình 39,8 thấy tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi nang là 45,2% [53].

Traversa và cộng sự năm 2011, sử dụng phương pháp a-CGH thấy 43% phôi nang bị lệch bội nhiễm sắc thể trong đó 55% lệch bội nhiễm sắc thể ở 1 cặp nhiễm sắc thể, 41% ở 2 cặp và 7% phức tạp ( $\geq 3$  cặp nhiễm sắc thể) [54].

### **1.6. Hiện tượng tự sửa chữa của phôi lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3.**

Phôi ngày 3 có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể và phôi ở thể khảm khá cao [55] nhưng đến giai đoạn phôi nang tỷ lệ này giảm đáng kể [56]. Một số phôi lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3 có thể tự sửa chữa thành phôi bình thường khi phát triển thành phôi nang. Năm 2001, Sandalinas sử dụng phương pháp FISH cho 8 cặp nhiễm sắc thể (1, 13, 15, 16, 18, 21, 22 và XY) để nghiên cứu lại những phôi được kết luận là bất bình thường theo kết quả của FISH ngày 3 thấy rằng 15% (32/216) có kết quả bình thường sau khi phân tích lại. 66% phôi sửa chữa thành bình thường phát triển đến giai đoạn phôi nang trong khi đó 19% phôi có lệch bội thể phát triển đến giai đoạn phôi nang [57]. Li và cộng sự (năm 2005) sử dụng phương pháp FISH theo dõi 5 cặp nhiễm sắc thể 13, 18, 21, X và Y của phôi nang (ngày 5-6) phát triển từ phôi mà ngày 3 đã chẩn đoán là lệch bội nhiễm sắc thể đã kết luận: 19,6% phôi lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3 phát triển đến giai đoạn phôi nang trong số đó 40% được chẩn đoán lại bình thường [58].

Để giải thích cho hiện tượng phôi tự sửa chữa này, một số nhà nghiên cứu đã lý giải như sau:

\* Ở những phôi này thì các phôi bào có số lượng nhiễm sắc thể bình thường có khả năng phân chia tốt hơn, các phôi bào bất thường bị ngừng phát triển; đồng thời những phôi bào bình thường này sẽ có xu hướng di chuyển và biệt hóa thành mầm phôi [59],[60].

\* Hệ thống gen của phôi chưa hoàn toàn hoạt hóa vào ngày thứ 3 của giai đoạn phân chia [61]. Chất lượng của noãn và các protein, các chất sao chép gen của noãn bị giảm đi theo thời gian do sự tích tụ của các tia xạ, các chất độc hại, các tác động oxy hóa gây tổn thương ty thể, các telomere ngắn lại dẫn đến mất kiểm soát chu kỳ tế bào tạo ra những sai lệch về nhiễm sắc thể. Hiện tượng này đặc biệt nghiêm trọng ở những phụ nữ lớn tuổi, tạo nên những sai sót trong sự phân ly của nhiễm sắc thể trong lần phân chia đầu tiên, tạo nên phôi bị thể khảm. Sau khi gen của phôi được hoạt hóa, cơ chế chết theo chương trình (apoptosis) và các điểm kiểm soát trong chu kỳ tế bào trở nên hoạt hóa, làm giảm số lượng các phôi bào bất thường nhiễm sắc thể ở giai đoạn phôi nang.

## **1.7. Một số yếu tố liên quan đến tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể.**

### **1.7.1. Sự phát triển của phôi và tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể.**

\* *Phôi ở giai đoạn phân chia.*

Lệch bội nhiễm sắc thể có liên quan với tốc độ phát triển của phôi. Năm 1995 Munne và cộng sự sử dụng phương pháp FISH nghiên cứu nhiễm sắc thể của phôi thấy rằng phôi ngừng phát triển có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao hơn phôi phát triển bình thường (71% so với 29%), những rối loạn nhiễm sắc thể này sẽ làm cho phôi bào ngừng phân chia hoặc phân chia chậm, ảnh hưởng trực tiếp tới sự phát triển của phôi [62].

Dựa vào tốc độ phát triển, phôi ngày 3 liên quan đến số lượng phôi bào được phân thành 4 loại [62]:

- Phôi ngừng phát triển là phôi không phân chia trong giai đoạn 24 giờ.

- Phôi chậm phát triển là phôi không đạt được 7 phôi bào vào ngày thứ 3 nhưng vẫn phân chia trong vòng 24 giờ.
- Phôi bình thường là phôi có từ 7 đến 9 phôi bào, không có đa nhân, phân chia trong vòng 24 giờ, có dưới 15% mảnh vụn tế bào.
- Phôi phát triển quá nhanh là phôi có trên 9 phôi bào ở ngày thứ 3.

Một số nghiên cứu đã chứng minh chuyển phôi chậm phát triển hoặc phát triển quá nhanh có tỷ lệ có thai thấp hơn so với chuyển phôi phát triển bình thường [63],[64].

Theo Alikani và cộng sự thì 13,8% phôi có dưới 7 phôi bào, 41,9% phôi có 7-9 phôi bào và 27,5% phôi có trên 9 phôi bào ở ngày 3 sẽ phát triển được thành phôi nang [63]. Tương tự như vậy, Rakowsky và cộng sự nghiên cứu thấy rằng , phôi có 8 phôi bào, 7 phôi bào, và < 7 phôi bào được chuyển vào ngày 3 có tỷ lệ sinh sống tương ứng lần lượt là 25%, 18% và 3% [64].

Năm 2001, Magli và cộng sự sử dụng phương pháp FISH nghiên cứu về mối liên quan giữa bất thường nhiễm sắc thể và số lượng phôi bào và đã so sánh phôi bình thường ở ngày 3 có 7 hoặc 8 phôi bào, phôi chậm phát triển có số lượng phôi bào là  $\leq 4$ , và phôi phát triển quá nhanh trên 9 phôi bào có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tương ứng là 55%, 74%, và 79% [10].

Năm 2007, Magli và cộng sự sử dụng phương pháp FISH cho 7 cặp nhiễm sắc thể (13, 15, 16, 18, 21, 22 và XY) thấy tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao đáng kể ở những phôi ngừng hoặc chậm phát triển hay phát triển quá nhanh:

- Phôi ngày 3 có dưới 4 phôi bào có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 85%.
- Phôi ngày 3 có 4 phôi bào có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 74%.
- Phôi ngày 3 có 5-6 phôi bào có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 73%.
- Phôi ngày 3 có 7-8 phôi bào có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 50%.



- Phôi ngày 3 phát triển quá nhanh có  $\geq 9$  phôi bào có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 78% [2].

Finn 2010, cũng sử dụng phương pháp FISH kiểm tra cho 7 cặp nhiễm sắc thể (13, 15, 16, 18, 21, 22 và XY) trên 2244 phôi cho kết quả:

- Phôi ngày 3 có 7-8 phôi bào có tỷ lệ nhiễm sắc thể bình thường là 31% và chiếm 66% tổng số phôi bình thường
- Phôi có  $\leq 6$  phôi bào có tỷ lệ bình thường về nhiễm sắc thể là 17% và chỉ chiếm 27% tổng số phôi bình thường.
- Phôi có trên 8 phôi bào có tỷ lệ bình thường về nhiễm sắc thể là 23% và chỉ chiếm 7% tổng số phôi bình thường [65].

\* *Phôi ở giai đoạn phôi nang.*

Nhiều nghiên cứu nêu lên tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở giai đoạn phân chia và giai đoạn phôi nang như nhau khi dùng phương pháp FISH [66],[67],[68],[69]. Tuy nhiên, một số nhà nghiên cứu khác lại thấy rằng lệch bội nhiễm sắc thể cũng như tình trạng phôi thể khảm đều xuất hiện ở giai đoạn phôi nang nhưng tỷ lệ thấp hơn so với phôi ở giai đoạn phân chia [68],[70]. Đặc biệt khi nghiên cứu sử dụng phương pháp a-CGH thấy tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở giai đoạn phôi nang thấp hơn so với giai đoạn phân chia [56],[59],[71]. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở giai đoạn phôi nang thấp hơn là do phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể ở giai đoạn phân chia đã bị dừng phát triển trước khi đến được ngày 5.

Năm 2008, Fragouli và cộng sự tiến hành CGH trên 64 phôi nang thấy rằng: 42% phôi nang xét nghiệm là bình thường ở tất cả các phôi bào, 30% là bị lệch bội nhiễm sắc thể ở tất cả các phôi bào; 15,4% phôi thể khảm gồm các dòng phôi bào bị lệch bội nhiễm sắc thể khác nhau (mosaic aneuploidy) và 17% phôi thể khảm bao gồm phôi bào bình thường và phôi bào bị lệch bội

nhiễm sắc thể. Hơn nữa không có khác biệt về tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể giữa các tế bào mầm phôi và tế bào lá nuôi [59].

*\* Khả năng phát triển thành phôi nang của phôi lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3.*

Phôi lệch bội nhiễm sắc thể có khả năng phát triển thành phôi nang kém hơn phôi bình thường. Năm 2000, Magli dùng phương pháp FISH kiểm tra 5 cặp nhiễm sắc thể (13, 18, 21, 22 và XY) thấy rằng 34,3 % phôi có số lượng nhiễm sắc thể bình thường phát triển đến giai đoạn phôi nang trong khi 21,9 % phôi lệch bội nhiễm sắc thể phát triển đến giai đoạn phôi nang. khoảng 59% phôi bất thường ngày 3 ngừng phát triển so với 36% phôi bình thường ( $P < 0,001$ ) [72].

Năm 2003, Rubio cũng sử dụng phương pháp trên cho 6 cặp nhiễm sắc thể (13,16, 18, 21, 22 và XY) trên những bệnh nhân có tiền sử sảy thai liên tiếp thấy rằng phôi bình thường phát triển đến giai đoạn phôi nang cao hơn phôi bất thường (61,7% so với 24,9%;  $P < 0,0001$ ) [73].

Li và cộng sự (năm 2005) sử dụng phương pháp FISH theo dõi 5 cặp nhiễm sắc thể 13, 18, 21, X và Y của phôi thấy là 73,7% phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3 và 37,2% phôi bình thường ngày 3 đều ngừng phát triển thành phôi nang [58].

### ***1.7.2. Hình thái phôi và tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể.***

*\* Hình thái phôi bào không đồng đều.*

Phôi bào không đồng đều có liên quan đến khả năng sống và phát triển của phôi. Racowsky và cộng sự vào năm 2003 thấy rằng phôi ngày 3 có các phôi bào không đồng đều thì kết quả thai sống là 13,3%, tỷ lệ này là 22,4% khi phôi có các phôi bào đồng đều ( $p < 0,0001$ ) [64]. Tuy nhiên nếu phôi có 8 phôi bào ở ngày 3 và phát triển đến phôi nang rộng vào ngày 5 thì hiện tượng các phôi bào không đồng đều ở ngày 3 không ảnh hưởng tới sự làm tổ của

phôi. Theo quan sát của Hardarson và cộng sự (2001), những phôi bào không đồng đều có liên quan với tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể [74].

Finn 2010, sử dụng phương pháp FISH kiểm tra 7 cặp nhiễm sắc thể (13, 15, 16, 18, 21, 22 và XY) trên 2244 phôi ngày 3 thấy rằng phôi có kích thước phôi bào đồng nhất vào ngày 2 có 31% là bình thường về số lượng nhiễm sắc thể và chiếm 73% tổng số phôi bình thường. Phôi có kích thước phôi bào không đồng đều chỉ có 19% là bình thường và chiếm 18% tổng số phôi bình thường [65].

*\* Số lượng, tỷ lệ mảnh vụn tế bào trong phôi.*

Số lượng mảnh vụn của phôi càng nhiều thì tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể càng cao, khả năng phát triển và sống của phôi càng giảm. Tỷ lệ mảnh vụn có liên quan với lệch bội nhiễm sắc thể. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng từ 50-60% ở phôi không có mảnh vụn lên đến 70-90% ở phôi có trên 35% mảnh vụn [2],[10],[75].

Năm 2000, Alikani và cộng sự đã công bố rằng phôi có mảnh vụn trên 15% phát triển thành phôi nang với tần suất thấp hơn phôi có tỷ lệ mảnh vụn dưới 15% (16,5 so với 33,3%,  $p < 0,001$ ). Phôi ngày 3 với trên 15% mảnh vụn tế bào có khả năng làm tổ là 18%. Phôi không có bất thường về hình thái và có tốc độ phát triển bình thường có khả năng làm tổ cao (40,1 và 49%) [63].

Trong một nghiên cứu khác của Racowsky 2003, khi phôi có tỷ lệ mảnh vụn dưới 10% thì khả năng tạo ra trẻ sinh sống là 23% so với 11% nếu phôi có 10-25% mảnh vụn và 0,8% nếu phôi có trên 25% mảnh vụn [64].

Magli 2007 sử dụng phương pháp FISH cho 7 cặp nhiễm sắc thể (13, 15, 16, 18, 21, 22, và XY) ở phôi 62 giờ sau khi thụ tinh để phân tích nghiên cứu trên phôi có 7 phôi bào, đối với phôi không có mảnh vụn tế bào, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 53%; tỷ lệ này là 55%, 58%, 67% và 66% tương ứng lần lượt với phôi có 1-10%, 11-20%, 11-20%, 31-40% mảnh vụn tế bào. Phân

tích các phôi 8 phôi bào có tỷ lệ mảnh vụn lần lượt là dưới 10%, 11-20%, 21-30%, 31-40% mảnh vụn thì có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tương ứng là 47%, 49%, 56%, 60% [2].

Theo Munne 2007, trong tổng số phôi có tốc độ phát triển và hình thái tốt nhất (trên 6 phôi bào vào ngày 3, có mảnh vụn dưới 20%,) thì 44% có số lượng nhiễm sắc thể bình thường trên bệnh nhân dưới 35 tuổi, tỷ lệ này giảm xuống còn 42% trên bệnh nhân 35-37 tuổi, 30% trên bệnh nhân 38-40 tuổi và 21% ở bệnh nhân trên 41 tuổi. Ngược lại, đối với phôi có chất lượng kém (dưới 6 phôi bào vào ngày 3 và có mảnh vụn trên 20%) chỉ có 30% phôi có số lượng nhiễm sắc thể bình thường ở bệnh nhân dưới 35 tuổi và 12% ở bệnh nhân trên 41 tuổi [69].

*\* Sự phân bố mảnh vụn tế bào trong phôi.*

Magli 2007 phân tích về sự phân bố của nhiều mảnh vụn tế bào nằm rải rác có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao hơn so với phôi có các mảnh vụn nằm tập trung tại một vị trí, cụ thể phôi 7 phôi bào có 21-40% mảnh vụn tế bào nằm rải rác có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 80% so với phôi có tỷ lệ mảnh vụn như vậy nhưng nằm tập trung có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 57% , sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ( $p < 0.03$ ) [2].

Tóm lại phần lớn nghiên cứu đều thống nhất là hình thái của phôi bất thường về kích thước, về số lượng phôi bào, đặc biệt có mảnh vụn càng tăng thì tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng từ 60 đến 80%. Lệch bội nhiễm sắc thể liên quan chặt chẽ với mảnh vụn tế bào là nguyên nhân làm cho tỷ lệ phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang giảm, hoặc hình thành phôi nang kém chất lượng bất thường về hình thái phôi nang, kết quả là khả năng làm tổ của phôi và tỷ lệ có thai bình thường giảm.

*\* Phôi bào đa nhân.*

Có thể thấy phôi bào có nhiều nhân ở bất kỳ giai đoạn nào từ lần phân chia đầu tiên cho đến giai đoạn phôi nang, nhưng thường gặp nhiều ở phôi có hai phôi bào. Tần suất chu kỳ có phôi có nhiều nhân đã được công bố là từ 14-79% và tần số phôi có nhiều nhân cho từng bệnh nhân là từ 15-33,6% [76],[77],[78]. Tần suất khác nhau giữa các trung tâm thụ tinh ống nghiệm có thể do cách kích thích hormone và điều kiện môi trường nuôi cấy khác nhau [79]. Trong nghiên cứu của Walmsley năm 2007 thấy rằng 12,5 % của 55612 hợp tử ngày 1 có phôi bào nhiều nhân vào ngày 2 và 5% có phôi bào nhiều nhân vào ngày 3, vì vậy khoảng 17,6% phôi có phôi bào nhiều nhân ở các mức độ khác nhau [80]. Van Royen và cộng sự cũng thấy rằng phôi bào có nhiều nhân thấy nhiều hơn ở ngày 2 (27%) so với ngày 3 (15%) [78].

Alikani và cộng sự đã công bố rằng 16% phôi có phôi bào nhiều nhân có thể phát triển thành phôi nang so với tỷ lệ của phôi bình thường là 32% [63]. Tuy nhiên tỷ lệ phôi có phôi bào hai nhân sẽ phát triển thành phôi nang cao hơn so với phôi có phôi bào có nhiều hơn hai nhân (38% so với 9%) [77]. Tuy nhiên, chuyển phôi có phôi bào nhiều nhân sẽ dẫn đến tỷ lệ sẩy thai cao hơn 6 lần (19% so với 3%) [81].

Sử dụng phương pháp FISH trên phôi có phôi bào nhiều nhân thấy rằng tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể cao từ 55-100%. Tỷ lệ khác nhau là do số lượng nhiễm sắc thể được nghiên cứu [10],[82],[83],[84]. Phôi có phôi bào hai nhân ở ngày 3 có tỷ lệ bất thường ít hơn phôi có phôi bào nhiều hơn hai nhân (68% so với 96%) [85]. Phôi có phôi bào nhiều nhân thường liên quan với sự hình thành mảnh vụn tế bào và những bất thường hình thái khác [62].

*\* Noãn và phôi khổng lồ/có kích thước lớn (Giant eggs and embryos).*

Noãn khổng lồ thường có kích thước bao gồm cả màng trong suốt trung bình khoảng 200  $\mu\text{m}$  và tần suất gặp khoảng 0,3% [86]. Phôi phát triển từ

noãn không lồ thường là tam bội hoặc tam bội thể khảm dạng XXX hoặc XXY và gợi ý là có nguồn gốc từ mẹ [87]. Theo Balakier thì phôi tạo ra từ noãn không lồ có thể phát triển thành phôi nang và có thể tạo nên thai tam bội có nguồn gốc từ mẹ (digynic triploid fetuses) [86].

*\* Phôi có một phôi bào to nổi trội.*

Những phôi có một phôi bào to bao quanh là những phôi bào nhỏ như những mảnh vụn, hay phát triển thành đa bội (polyploidy) hoặc đa bội thể khảm, phôi bào to thường có nhiều nhân [87]. Theo nghiên cứu của Magli và cộng sự năm 2001 nghiên cứu trên 20 phôi có phôi bào nổi trội thì 14/20 phôi có phôi bào nổi trội có nhiều nhân. Trong đó 12 phôi là đa bội, 8 phôi có bất thường phức tạp [10].

*\* Phôi có bào tương không đồng nhất (cytoplasm irregularities).*

Theo Magli và cộng sự, bào tương của noãn có không bào (vacuole) hoặc các điểm vùi sẫm màu (dark inclusion) không có liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể. Tuy nhiên ở phôi mà bào tương có những vùng đậm gồ gề (cytoplasm concentration) có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao hơn những phôi có bào tương bình thường (86% so với 63%) [10].

*\* Phôi có hình bầu dục, kéo dài.*

Magli và cộng sự nghiên cứu thành phần nhiễm sắc thể của 18 phôi có hình bầu dục và thấy rằng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể không khác so với phôi có hình cầu bình thường [10]. Những phôi này có thể phát triển thành thai sống [88].

*\* Hình thái phôi nang và lệch bội nhiễm sắc thể.*

Lệch bội nhiễm sắc thể 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 [89]. Trong nghiên cứu của Alfarawati và Kroener sử dụng phương pháp a-CGH trên phôi nang cũng thấy

tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng khi chất lượng của mầm phôi và nguyên bào lá nuôi giảm dần [90],[91].

### ***1.7.3. Hormon kích thích buồng trứng, sự đáp ứng của buồng trứng và tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể.***

Mặc dù lệch bội nhiễm sắc thể xuất phát từ quá trình tạo giao tử, tuy nhiên quá trình kích thích hormone và đáp ứng của bệnh nhân có thể ảnh hưởng tới sự hình thành lệch bội nhiễm sắc thể.

*\* Bệnh nhân có đáp ứng kém với kích thích buồng trứng (low responders).*

Gianaroli năm 2001 thấy rằng đối với bệnh nhân mà buồng trứng đáp ứng kém với hormone kích thích thì phôi tạo ra có lệch bội nhiễm sắc thể là 68% [92]. Một số tác giả khác thấy rằng, ở bệnh nhân có đáp ứng buồng trứng kém, sẽ giảm số lượng phôi để chuyển vào buồng tử cung nên tỷ lệ có thai giảm [93].

*\* Bệnh nhân có dự trữ buồng trứng giảm (Reduced ovarian reserve).*

Khả năng dự trữ của buồng trứng được đánh giá dựa vào nồng độ FSH vào ngày thứ 3 của chu kỳ kinh. Tăng nồng độ FSH là chỉ báo giảm khả năng dự trữ buồng trứng [94], dẫn đến giảm số lượng noãn thu được sau khi kích thích và giảm tỷ lệ có thai. Tăng nồng độ FSH không những thấy ở phụ nữ lớn tuổi mà còn gặp ở phụ nữ bị cắt một bên buồng trứng và phụ nữ trẻ bị mãn kinh sớm (premature menopause).

Trong nghiên cứu của Munne (1998) thấy là đối với phụ nữ dưới 40 tuổi nồng độ FSH cao, có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng đáng kể ( $p < 0,02$ ), nhưng phụ nữ trên 40 tuổi, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng cao không phụ thuộc vào nồng độ FSH và tăng nồng độ FSH là chỉ báo bất thường muộn về mất khả năng dự trữ buồng trứng và phù hợp với tỷ lệ có thai thấp ở nhóm bệnh nhân này [75].

Một số nghiên cứu khác thấy rằng 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 lệch bội nhiễm sắc thể ở mọi lứa tuổi [95],[96].

\* *Bệnh nhân có quá mẫn buồng trứng (high ovarian response).*

Reis và cộng sự năm 2003, nghiên cứu trên những bệnh nhân có quá mẫn buồng trứng, tạo ra nhiều noãn, thấy rằng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao hơn so với nhóm chứng [97]. Hơn nữa, quá mẫn buồng trứng thường tạo ra phôi có nhiều nhân [81] và tiền nhân không cân xứng [98]. Cả 2 hiện tượng này đều có liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.

#### ***1.7.4. Một số nguyên nhân gây vô sinh có liên quan đến tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể.***

Theo Fasolino và cộng sự, nguyên nhân gây vô sinh có liên quan đáng kể với những rối loạn phân bào giảm phân dẫn đến lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi [99].

Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng đáng kể trong 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. Lạc nội mạc tử cung làm ảnh hưởng đến chất lượng của noãn do làm thay đổi thành phần khung tế bào (cytoskeleton) [100]. Tác giả cho rằng, lạc nội mạc tử cung ảnh hưởng xấu tới thoi phân bào và nhiễm sắc thể và điều này phù hợp với những ý kiến cho rằng có mối liên quan giữa lạc nội mạc tử cung và sự hình thành giao tử bị lệch bội nhiễm sắc thể.

Weghofer và cộng sự thấy có mối quan hệ âm tính giữa các yếu tố gây phóng noãn và số lượng noãn bị lệch bội nhiễm sắc thể, chứng tỏ buồng trứng đã trải qua quá trình già hóa sinh học [101].



Ở phụ nữ có tiền sử bị sẩy thai, khả năng phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể cao hơn. Điều này có thể giải thích là do ở những phụ nữ này, buồng trứng có xu hướng bị già hóa, dẫn đến giảm số lượng noãn ở giai đoạn trưởng thành [95]. Điều này phù hợp với kết quả của Warburton [102] là phụ nữ có thai bị thể tam nhiễm sẽ mãn kinh sớm hơn so với phụ nữ sinh ra trẻ bình thường, và cũng phù hợp với kết quả của Munne [103] là tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi cao hơn ở phụ nữ có tiền sử sinh con bị rối loạn nhiễm sắc thể.

#### ***1.7.5. Kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm ảnh hưởng đến tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể.***

Ở giai đoạn phân chia, có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến bộ nhiễm sắc thể của phôi, đặc biệt tỷ lệ phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể khác nhau giữa các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm, nhưng đến nay có rất ít các nghiên cứu đi sâu về vấn đề này. Trong phần này sẽ tóm tắt một số yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể như phương pháp kích thích trứng, độ sáng, nhiệt độ, chất lượng nước dùng trong phòng thí nghiệm, phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương của noãn (IntraCytoplasmic Sperm Injection/ICSI), nồng độ FSH cơ bản và sự lựa chọn bệnh nhân ảnh hưởng đến tình trạng nhiễm sắc thể của phôi.

##### ***\* Phương pháp sử dụng hormon kích thích.***

Tần suất nhiễm sắc thể co ngắn sớm ở noãn người phụ thuộc vào phác đồ sử dụng hormon. Munne sử dụng phương pháp FISH để đánh giá nhiễm sắc thể của phôi thấy rằng khi dùng thuốc kích thích là clomiphene citrate hoặc gonadotrophin, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi tăng so với dùng phương pháp điều hoà xuống (agonist) ( $p < 0,05$ ) [79].

Liều lượng hormone FSH cũng ảnh hưởng đến tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể. Fragouli và cộng sự 2009 thấy rằng khi sử dụng liều FSH thấp thì nguy cơ bị lệch bội nhiễm sắc thể giảm [104]. Nguyên nhân có thể chỉ những noãn

có chất lượng tốt, có khả năng phát triển và trưởng thành được thu nạp sau đáp ứng với hormone kích thích liều thấp. Ngược lại, ở một số nghiên cứu khác, các tác giả lại thấy rằng nếu kích thích liều cao, thậm chí ở cả bệnh nhân trẻ tuổi, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng cao [21]. Vì vậy, Baart và cộng sự đã thúc đẩy việc kích thích buồng trứng nhẹ (mild stimulation) để giảm số lượng phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể [33].

*\* Nhiệt độ và chất lượng của nước dùng trong phòng thí nghiệm.*

Thoi phân bào của noãn rất nhạy cảm với sự thay đổi nhiệt độ. Pickering và cộng sự năm 1990 nhận thấy ở noãn người khoảng 50% trường hợp thoi phân bào bị phân rã ở nhiệt độ phòng (24-25<sup>0</sup>C) trong khoảng 10 phút, và tan rã 100% sau 30 phút, gây nên những rối loạn nhiễm sắc thể [105].

Năm 1997, Cohen và cộng sự nghiên cứu thấy tỷ lệ phôi làm tổ giảm có liên quan đến chất lượng của nước và hệ thống lọc khí trong phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, việc nghiên cứu về nhiễm sắc thể chưa được tiến hành trên các phôi đó. Một số chất hoá học gây tổn thương ở mức độ gen chứ không chỉ ở mức độ nhiễm sắc thể, là nguyên nhân làm giảm tỷ lệ phôi làm tổ [106].

*\* Những yếu tố từ tinh trùng và phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn.*

Nghiên cứu so sánh giữa phương pháp cấy tinh trùng với noãn trong thụ tinh trong ống nghiệm và phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn thấy rằng tỷ lệ lệch bội thể ở phôi tạo ra từ 2 phương pháp trên như nhau. Tuy nhiên, tỷ lệ bất thường cao hơn một ít ở nhóm bệnh nhân dùng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn, khi những bệnh nhân này là người mang những rối loạn về nhiễm sắc thể, có tinh trùng ít, yếu và dị dạng [107].

Năm 2007, Adams và cộng sự nghiên cứu trên 23 chu kỳ sử dụng noãn của người cho, thấy rằng tuổi của bố không ảnh hưởng đến tỷ lệ lệch bội

nhiễm sắc thể ở phôi. Tuy nhiên, ở bệnh nhân có chất lượng tinh trùng kém, giảm khả năng chuyển động và tăng các mảnh vụn DNA, thì khả năng phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể cao. Phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn không thể chọn lựa tinh trùng có chất lượng cao nhất. Điều này có thể giải thích là những yếu tố từ tinh trùng ảnh hưởng đến chất lượng của phôi thông qua những sai sót của trung thể, rối loạn hoạt động của các ty thể và khả năng hoạt hóa noãn bị rối loạn [108].

#### ***1.7.6. Các cặp nhiễm sắc thể và tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể.***

Tần suất lệch bội nhiễm sắc thể khác nhau tùy từng cặp nhiễm sắc thể. Tần suất lệch bội nhiễm sắc thể cũng khác nhau tùy thuộc vào phương pháp đánh giá phôi. Các phương pháp cũ thường có độ nhạy thấp nên có tỷ lệ chẩn đoán âm tính giả cao, vì vậy các nghiên cứu trước đây đều nêu tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể thấp và tần suất lệch bội nhiễm sắc thể trên các cặp nhiễm sắc thể sai khác nhiều so với kết quả của các phương pháp hiện đại.

Sử dụng phương pháp FISH, người ta nhận thấy rằng những nhiễm sắc thể thường bị lệch bội ở giai đoạn trước khi làm tổ là 16, 22, 21 và 15 [109].

Năm 2003, Rubio cũng dùng phương pháp FISH kiểm tra 6 cặp nhiễm sắc thể (13, 16, 18, 21, 22 và XY) ở những bệnh nhân có tiền sử sảy thai liên tiếp thấy lệch bội nhiễm sắc thể 16 và 22 là thường gặp nhất [73].

Sử dụng phương pháp CGH, Gutierrez thấy lệch bội nhiễm sắc thể ít xảy ra ở nhiễm sắc thể 4 và 6. Hiện tượng tăng số lượng nhiễm sắc thể gặp nhiều hơn là giảm số lượng nhiễm sắc thể [41].

Cũng bằng phương pháp a-CGH, năm 2011, Mariona công bố nhiễm sắc thể 16 bị lệch bội nhiều nhất sau đó lần lượt đến các nhiễm sắc thể 22, 15, 21, 18, 20, 19, 13, 6, X, Y, 3, 17, 4, 11, 14, 2, 8, 7, 5, 12, 1 và 9; chỉ có nhiễm sắc thể 10 là không bị lệch bội [42].

### ***1.7.7. Tuổi mẹ và tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể.***

Một số nghiên cứu cho rằng ít nhất 20% noãn người là bị lệch bội nhiễm sắc thể, tỷ lệ này tăng lên đáng kể khi người phụ nữ trên 35 tuổi [110]. Nghiên cứu về di truyền trên noãn và cực cầu thứ nhất tạo ra trong ống nghiệm thấy rằng trên 20% noãn của bệnh nhân dưới 35 tuổi là bị lệch bội nhiễm sắc thể [111],[112]. Tỷ lệ noãn bị lệch bội nhiễm sắc thể tăng đáng kể cùng với tuổi của người phụ nữ. Đối với phụ nữ lớn tuổi, tỷ lệ này trung bình khoảng 70% [113],[114],[115], tuy nhiên các tác giả này cho rằng bất thường loại thể khảm thường không phụ thuộc vào tuổi, trong khi Munne lại cho rằng thể khảm là do cơ chế không phân ly và có thể tăng lên cùng với tuổi mẹ tăng [67].

Năm 1995, sử dụng phương pháp FISH, Munne nhận thấy rằng tỷ lệ phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể tăng dần theo tuổi của người mẹ: 16% trên phụ nữ 20 đến 34 tuổi; 37% trên phụ nữ từ 35 đến 39 tuổi và cao nhất 53% ở phụ nữ trên 40 tuổi [62]. Tác giả này năm 2002 nghiên cứu dựa trên 1 phôi bào sinh thiết (94 phôi) và 2 phôi bào sinh thiết (304 phôi) thấy rằng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng theo tuổi mẹ, từ 12,2% ở lứa tuổi dưới 35, đến 31% ở lứa tuổi trên 40 [67].

Cũng bằng phương pháp này Rubio đánh giá 7 cặp nhiễm sắc thể thấy rằng ở phụ nữ dưới 37 tuổi điều trị thụ tinh ống nghiệm có 33% số phôi tạo bị lệch bội nhiễm sắc thể, trong khi đó đối với phụ nữ trên 37 tuổi, tỷ lệ này tăng lên gấp đôi [73].

Năm 2007, Munne và cộng sự sử dụng phương pháp FISH để kiểm tra 8 cặp nhiễm sắc thể (13, 16, 18, 21, 22, X,Y, 15, 17) đã nhận thấy rằng tuổi mẹ, tốc độ phát triển và hình thái của phôi là 3 yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến số lượng phôi bình thường, sự tác động của 3 yếu tố mang tính độc lập, đặc

biệt tuổi của mẹ ảnh hưởng đến tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể rất rõ ràng ( $P < 0,001$ ) [69].

Năm 2011, Alfarawati sử dụng phương pháp a-CGH kiểm tra 500 phôi nang và thấy 283 (56,7%) có lệch bội nhiễm sắc thể với nhiều thể loại khác nhau. Các bất thường trên liên quan chặt chẽ với tuổi của người mẹ, tỷ lệ này tăng từ 51% đến 60,7% tương ứng với nhóm tuổi mẹ từ 31-37 và 38-47 tuổi. Phụ nữ trên 37 tuổi có nguy cơ cao so với phụ nữ dưới 37 tuổi, cụ thể là: tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể 21 tăng gấp 10 lần, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể 12, 14 và 18 tăng gấp 5 đến 6 lần, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể 1, 2, 11, 15, 17, 20 và 22 tăng gấp 2 lần [90].

#### ***1.7.8. Yếu tố môi trường ảnh hưởng đến lệch bội nhiễm sắc thể.***

Yếu tố môi trường bao gồm các tác nhân tạo ra rối loạn nhiễm sắc thể và đột biến gen của tế bào trong đó có lệch bội nhiễm sắc thể. Các tác nhân quan trọng bao gồm:

\* *Hút thuốc lá*: Năm 2001, Shi và cộng sự công bố là các chất trong thuốc lá làm tăng tổn thương DNA của tinh trùng và làm giảm chất lượng tinh trùng [116]. Ở người mẹ hút thuốc lá, các tế bào sinh dục gốc có xu hướng bị nhiễm sắc thể không phân ly dẫn đến hình thành phôi thể khảm và lệch bội nhiễm sắc thể ở bào thai và gây sẩy thai sớm [117].

\* *Cocain*: Có mối liên quan giữa thai phụ sử dụng cocain và thai bị dị tật về tim phổi và thần kinh do đột biến gen và rối loạn nhiễm sắc thể [118].

\* *Phóng xạ; tia X; tia  $\alpha$ , tia tử ngoại*: cũng liên quan đến dị tật bẩm sinh và rối loạn nhiễm sắc thể.

## 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 tạo ra bằng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn của các cặp vợ chồng làm thụ tinh trong ống nghiệm tại trung tâm thụ tinh ống nghiệm 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 khả năng sống (ít nhất 4 phôi bào và số lượng mảnh vụn trong phôi không quá 30%).
- Tinh trùng được chọn để thụ tinh phải có tiêu chuẩn là có khả năng chuyển động.
- Bệnh nhân được kích thích buồng trứng để lấy noãn đều tự nguyện đến trung tâm thụ tinh ống nghiệm để điều trị, không có bệnh lý di truyền, nội khoa cấp tính hay mạn tính khác. Noãn được lấy sau khi kích thích buồng trứng trên bệnh nhân có ít nhất 4 noãn trưởng thành (nhìn rõ thể cực 1).

##### 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 (vì khi nghiên cứu chỉ là kết quả của một quần thể  $=N$  mà không phải toàn thể cộng đồng nên khi áp dụng cho cộng đồng sẽ có sai lệch  $\epsilon$ . 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 nghiên cứu (tỷ lệ bệnh, tỷ lệ rối loạn nhiễm sắc thể) được xác định ở mục tiêu nghiên cứu và liên quan đến độ sâu của nghiên cứu.

$q = 1-p$  biểu thị tỷ lệ bình thường.

Áp dụng vào nghiên cứu này:

- Độ tin cậy = 95% tương ứng  $\alpha = 5\%$  thì  $Z^2_{1-\alpha/2} = 1,96$
- $p = 53\% = 0,53$  (tỷ lệ phôi phát triển bình thường không có mảnh vụn mà bị lệch bội thể, trích dẫn tài liệu của Magli 2007 [2]).
- $q = 1 - 0,53 = 0,47$
- $\epsilon = 0,055$  (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 thụ tinh ống nghiệm 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.**

Chọn ngẫu nhiên trong số đối tượng được chọn lọc để áp dụng phương pháp 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.

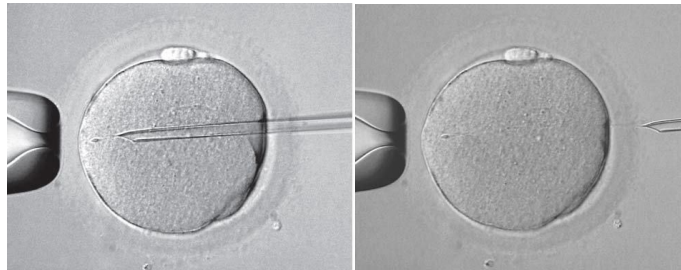


- Chọc lấy noãn.

Noãn được lấy qua đường âm đạo dưới sự chỉ dẫn của siêu âm 36 giờ sau khi dùng hCG. Noãn lấy ra được nuôi cấy 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 nhiệt độ 37<sup>0</sup>C.

- Tiêm tinh trùng vào bào tương của noãn (ICSI).

Tất cả noãn trưởng thành được thụ tinh bằng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương của noãn với tinh trùng của chồng hoặc của người hiến tinh trùng (hình 2.1).



**Hình 2.1:** Phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (Nguồn: RRF<sup>C</sup>).

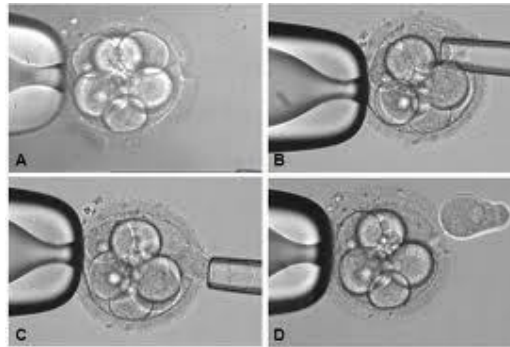
- Đánh giá thụ tinh và quá trình nuôi cấy phôi.

Khoảng 16-18 giờ sau khi tiêm tinh trùng vào noãn, 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.

Phôi ngày 3 được sinh thiết trong môi trường không có Mg và Ca. Sử dụng laser không tiếp xúc 1,48 micron (Saturn active, Research Instruments) để mở lỗ ở màng trong suốt. Tránh để tia laser tiếp xúc với phôi bào. Khi màng trong suốt đã được mở, dùng kim sinh thiết có đường kính 30-35mm hút nhẹ nhàng 1 phôi bào vào ngày thứ 3 (66-68 giờ sau tiêm tinh trùng) (hình

2.2) 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. Phôi bào được chọn để sinh thiết phải còn nguyên vẹn và nhìn rõ nhân.



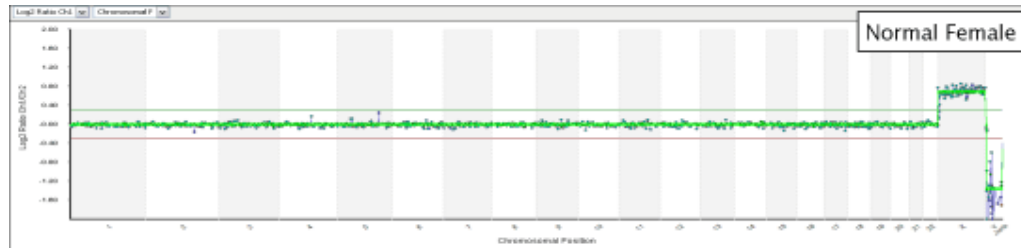
**Hình 2.2:** Phương pháp sinh thiết phôi bào ngày 3 (Nguồn: RRFC).

- Phân tích di truyền bằng phương pháp a-CGH.

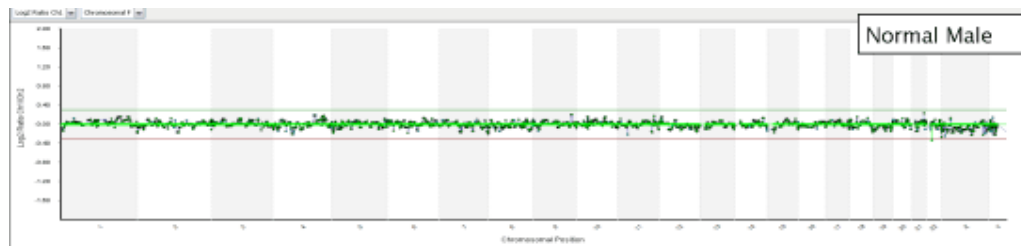
Phôi bào lấy ra được rửa sạch rồi cho vào PCR tube có chứa 2  $\mu$ l môi trường (cung cấp bởi genesis genetics). Các PCR tube được làm đông lạnh ít nhất 1 giờ trước khi được gửi tới phòng xét nghiệm di truyền *Genesis Genetics* (Detroit, Michigan, USA) để đánh giá 23 cặp nhiễm sắc thể của phôi bằng phương pháp a-CGH. Trong quá trình di chuyển, các PCR tube được giữ lạnh nhờ đá khô (dry ice).

Tại phòng xét nghiệm di truyền, phôi bào được làm phân rã (lysed). 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. Chíp 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) (hình 2.3 và 2.4). Chẩn đoán thừa thiếu nhiễm sắc thể nếu 15 hay hơn 15 đầu dò bị lệch khỏi giới hạn bình thường theo phương pháp 24Sure.



**Hình 2.3:** Kết quả a-CGH phôi 46,XX (Nguồn: RRFC).



**Hình 2.4:** Kết quả a-CGH phôi 46,XY (Nguồn: RRFC).

- Chuyển phôi vào buồng tử cung.

Phôi bình thường (sau xét nghiệm) sẽ được chuyển vào buồng tử cung của người mẹ hoặc được dự trữ đông lạnh khi phát triển thành phôi nang vào ngày thứ 5 hoặc 6.

- Theo dõi các phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể (sau khi xét nghiệm).

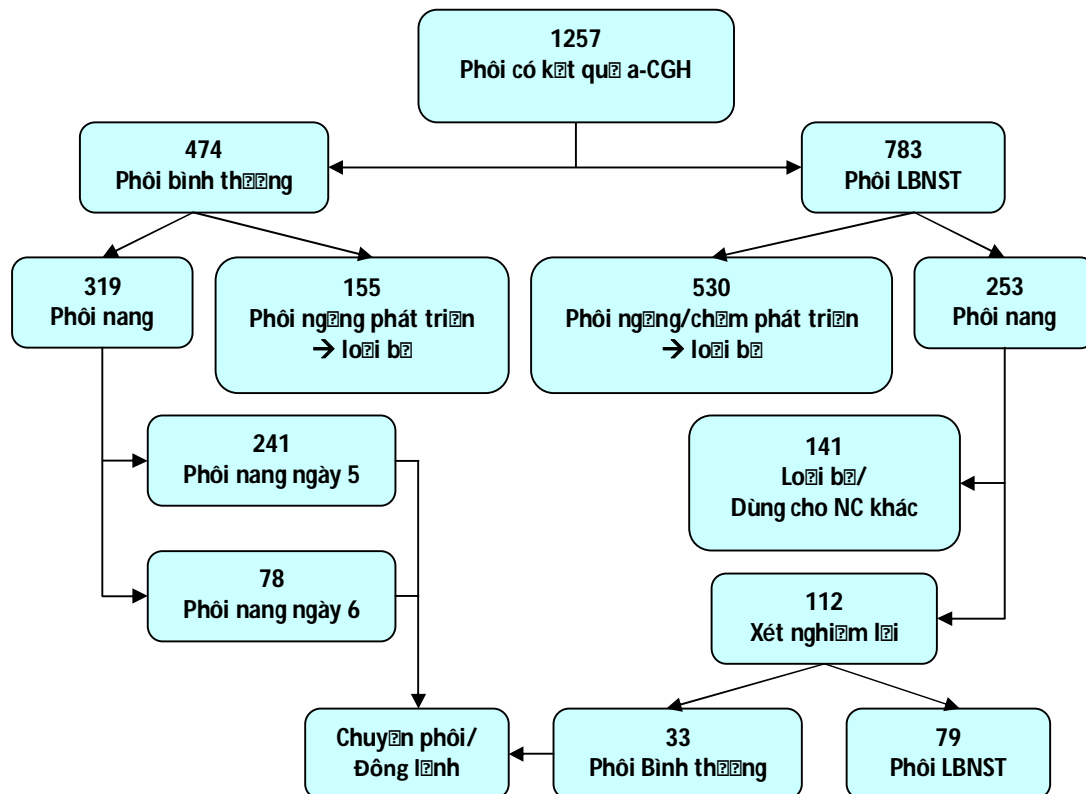
Phôi có kết quả bất thường lệch bội nhiễm sắc thể vẫn được nuôi cấy trong tủ cấy để theo dõi sự phát triển thành phôi nang vào ngày 5 hoặc 6. Những phôi này nếu phát triển thành phôi nang và nếu được sự chấp thuận của bệnh nhân sẽ được sinh thiết lần 2 bằng phương pháp sinh thiết nguyên bào lá nuôi. Từ 2 đến 6 nguyên bào lá nuôi được sinh thiết ra từ mỗi phôi, sau đó sẽ được chuyển vào ống xét nghiệm PCR để gửi đi xét nghiệm ở

phòng xét nghiệm di truyền *Genesis Genetics* để xét nghiệm sử dụng phương pháp a-CGH như mô tả ở trên. Kết quả xét nghiệm được thu thập để xử lý và phân tích.



**Hình 2.5:** Phương pháp sinh thiết nguyên bào lá nuôi (Nguồn: RRFC).

### Sơ đồ tóm tắt quy trình nghiên cứu



### 2.3. Phương tiện nghiên cứu.

- Kính hiển vi các loại: đảo ngược, nổi... (Olympus và Nikon, Nhật bản)
- Tủ cấy CO<sub>2</sub> (Sanyo, Nhật bản).
- Buồng lọc khí (K-system, Đan mạch).
- Hệ thống vi điều khiển để tiêm tinh trùng và sinh thiết phôi (Narashige)
- Máy hút để lấy noãn (Cook, Úc).
- Máy li tâm (Eppendorg, Mỹ).
- Tủ lạnh (Sanyo, Nhật bản).
- Kim tiêm tinh trùng và sinh thiết tế bào (Humagen, Mỹ).
- Các vật dụng dùng trong quá trình nuôi cấy noãn, tinh trùng và phôi như đĩa cấy phôi, ống, chai, pipet... (Origio, Mỹ).
- Môi trường nuôi cấy noãn, tinh trùng, phôi (Vitrolife, Irvine, Global IVF, Mỹ).

### 2.4. Các chỉ số, biến số nghiên cứu.

#### 2.4.1. Các chỉ số về đặc điểm mẫu nghiên cứu:

- Số lượng phôi bào.
- Độ đồng đều của phôi bào.
- 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.

#### 2.4.2. Các chỉ số về kết quả a-CGH:

- Tỷ lệ lệch bội thể.
- Tỷ lệ phôi bình thường.
- Tỷ lệ lệch bội thể trên 1 cặp, 2 cặp, 3 cặp và  $\geq 3$  cặp nhiễm sắc thể.

#### 2.4.3. Các tiêu chuẩn có liên quan đến nghiên cứu.

\* *Nồng độ FSH trong máu.*

Nồng độ FSH trong huyết thanh của bệnh nhân được xét nghiệm vào ngày thứ 2 hay 3 của chu kỳ kinh bằng phương pháp Immuno assay (ROCHE E411, Indiana, USA) và được tính bằng đơn vị mIU/ml. 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 [122].

\* *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 phôi bào:
  - Phôi có 4-6 phôi bào = phôi chậm phát triển.
  - Phôi có 7-9 phôi bào = phôi phát triển bình thường.
  - Phôi có  $\geq 10$  phôi bào = phôi phát triển nhanh.
- Số lượng mảnh vụn trong phôi: % mảnh vụn so với tổng thể tích phôi:
  - $\leq 5\%$  mảnh vụn = số lượng mảnh vụn ít.
  - 6-15% mảnh vụn = số lượng mảnh vụn trung bình.
  - 16-30% mảnh vụn = số lượng mảnh vụn nhiều.
  - $>30\%$  mảnh vụn = số lượng mảnh vụn rất nhiều.
- Sự phân bố mảnh vụn trong phôi:
  - Tập trung: các mảnh vụn nằm tập trung tại một vị trí trong phôi thường ở vùng ngoại vi.
  - Rải rác: các mảnh vụn nằm rải rác trong phôi giữa các phôi bào.

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

\* *Đánh giá phôi nang ngày 5 và 6.*

Phôi nang được đánh giá phần lớn dựa vào tiêu chuẩn của Gardner [20] (theo thang điểm từ 1 đến 6 phụ thuộc vào độ phát triển rộng của khoang phôi nang và hiện tượng thoát màng (Hình 1.4).

- Đánh giá bước 1 dựa vào khoang phôi nang và hiện tượng thoát màng.
  - Giai đoạn 1: phôi nang giai đoạn sớm (early blastocyst) khi khoang dịch chiếm dưới  $\frac{1}{2}$  tổng thể tích của phôi.
  - Giai đoạn 2: phôi nang (blastocyst) khi khoang dịch chiếm trên  $\frac{1}{2}$  tổng thể tích của phôi.
  - Giai đoạn 3: phôi nang đầy (full blastocyst) khi khoang dịch chiếm hầu hết thể tích của phôi.
  - Giai đoạn 4: phôi nang rộng (expanded blastocyst) khi khoang dịch phát triển rộng làm cho màng trong suốt (zona pellucida/ZP) bắt đầu mỏng dần.
  - Giai đoạn 5: phôi nang đang thoát màng (hatching blastocyst) khi nguyên bào lá nuôi (trophectoderm cell /TE) bắt đầu thoát ra khỏi màng trong suốt.
  - Giai đoạn 6: phôi nang đã thoát màng (hatched blastocyst) khi 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 dưới kính hiển vi đảo ngược về đặc điểm nguyên bào phôi (inner cell mass/ICM) và nguyên bào lá nuôi (trophectoderm cells /TE) như sau:

- *Đánh giá nguyên bào phôi (inner cell mass /ICM):*
  - Loại A =khi có rất nhiều tế bào liên kết chặt chẽ.
  - Loại B =khi vài tế bào liên kết lỏng lẻo.
  - Loại C =khi có rất ít tế bào.
  - Loại D =khi không thấy ICM.
- *Đánh giá tế bào lá nuôi (trophectoderm cell /TE )*
  - Loại A = nhiều tế bào liên kết tạo thành biểu mô kết.
  - Loại B = vài tế bào tạo thành biểu mô rời rạc.
  - Loại C = có vài tế bào lớn.

## 2.5. Xử lý số liệu.

Các số liệu thu được sẽ được xử lý bằng phương pháp tính thống kê như sau:

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

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

$$(ad - bc)^2. N$$

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

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

**RR** biểu thị cụ thể cách đo lường hướng định lượng về hậu quả (lệch bội nhiễm sắc thể) 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 liên quan giữa yếu tố chỉ báo và tỷ lệ LBNST.

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:

*Tỷ số khả năng khi xét nghiệm dương tính ( $LR^+$ )* là tỷ số của tỷ lệ dương tính thật (có mặt yếu tố chỉ báo thì phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể) và tỷ lệ dương tính giả (có yếu tố chỉ báo, nhưng phôi bình thường). Nói cách khác,  $LR^+$  là tỷ số giữa xác suất phôi có một đặc điểm nào đó (+) (yếu tố chỉ báo) thì bị lệch bội nhiễm sắc thể và xác suất phôi có một đặc điểm nào đó (+) mà không bị lệch bội nhiễm sắc thể.

$$LR^{(+)} = (a/a+c) / (b/b+d)$$

$LR^{(+)}$  có ý nghĩa khi  $>1$ .  $LR^+$  càng cao càng có giá trị.

Mức độ  $LR^{(+)}$  và ảnh hưởng đến khả năng lệch bội nhiễm sắc thể:

$LR >5$  : khả năng LBNST khá cao

$LR = 2-5$  : khả năng LBNST trung bình

$LR <2$  : khả năng LBNST thấp

$LR = 1$  : Xét nghiệm vô dụng

*Tỷ số khả năng khi xét nghiệm âm tính ( $LR^-$ )* là tỷ số của tỷ lệ âm tính giả (phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể khi không có yếu tố chỉ báo) và tỷ lệ âm tính thật (không có yếu tố chỉ báo thì phôi bình thường). Nói cách khác,  $LR^{(-)}$

là tỷ số giữa xác suất phôi không có một đặc điểm nào đó (-) (không có yếu tố chỉ báo) mà bị lệch bội nhiễm sắc thể và xác suất phôi không có một đặc điểm nào đó mà không bị lệch bội nhiễm sắc thể.

$LR^{(-)} = (c/a+c) / (d/b+d)$  thường dưới 1, càng thấp càng có giá trị.

Mức độ  $LR^{(-)}$  và ảnh hưởng tới khả năng không lệch bội nhiễm sắc thể:

$LR < 0,2$  : khả năng không LBNST khá cao

$LR = 0,2-0,5$  : khả năng không LBNST trung bình

$LR > 0,5$  : khả năng không LBNST thấp

$LR = 1$  : xét nghiệm vô dụng

## 2.6. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu.

Trong một nghiên cứu lớn nhất mới được công bố năm 2010 về ảnh hưởng của việc sinh thiết phôi bào lên sức khỏe của trẻ được sinh ra nhờ phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương của noãn và sàng lọc phôi trước làm tổ, các tác giả đã nêu lên rằng không gây ảnh hưởng gì đến sức khỏe của trẻ sơ sinh [119].

Rất nhiều các nghiên cứu đã công bố là việc áp dụng sàng lọc tiền làm tổ làm tổ góp phần làm tăng tỷ lệ thai làm tổ và tăng tỷ lệ sinh đáng kể [104],[120],[121].

Nghiên cứu này chỉ nhằm mục đích nâng cao hiệu quả điều trị trong thụ tinh ống nghiệm mà không nhằm bất cứ một mục đích nào khác.

Nghiên cứu này được tiến hành sau khi đề cương nghiên cứu 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 và họ tự quyết định tham gia vào nghiên cứu. Nghiên cứu chỉ được tiến hành khi có sự cam kết giữa bệnh nhân và cơ quan chủ quản là Red Rock Fertility Center.

Các thông tin cá nhân do bệnh nhân cung cấp được đảm bảo bí mật.

### Chương 3

## KẾT QUẢ

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

Tổng cộng có 203 bệnh nhân với tổng số 1257 phôi được sinh thiết để chẩn đoán lệch bội NST có một số đặc điểm sau:

**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 %)
Cộng	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%. Tuy nhiên có khoảng trên 1/3 (37%) bệnh nhân lớn tuổi từ > 38 tuổi. Đặc biệt trên 13% bệnh nhân trên 40 tuổi với tổng số phôi chiếm hơn 10%.

**Bảng 3.2:** Đặc điểm về nguyên nhân vô sinh.

Nguyên nhân vô sinh	Số bệnh nhân	Số lượng phôi
Do yếu tố tinh trùng	67 (33 %)	418 (33,25 %)
Rối loạn phóng noãn	4 (1,97 %)	21 (1,67 %)
Buồng trứng đa nang	17 (8,38 %)	121 (9,63 %)
Do vòi trứng	8 (3,94 %)	53 (4,22 %)
Do lạc nội mạc tử cung	16 (7,88 %)	88 (7 %)
Do tử cung	2 (0,99 %)	11 (0,87 %)
Không rõ nguyên nhân	89 (43,84 %)	545 (43,36 %)
Cộng	203 (100%)	1257 (100 %)

**Nhận xét:** Đối tượng đến làm thụ tinh trong ống nghiệm phần lớn là không rõ nguyên nhân hoặc do yếu tố tinh trùng.

**Bảng 3.3:** Tiền sử sản khoa có liên quan.

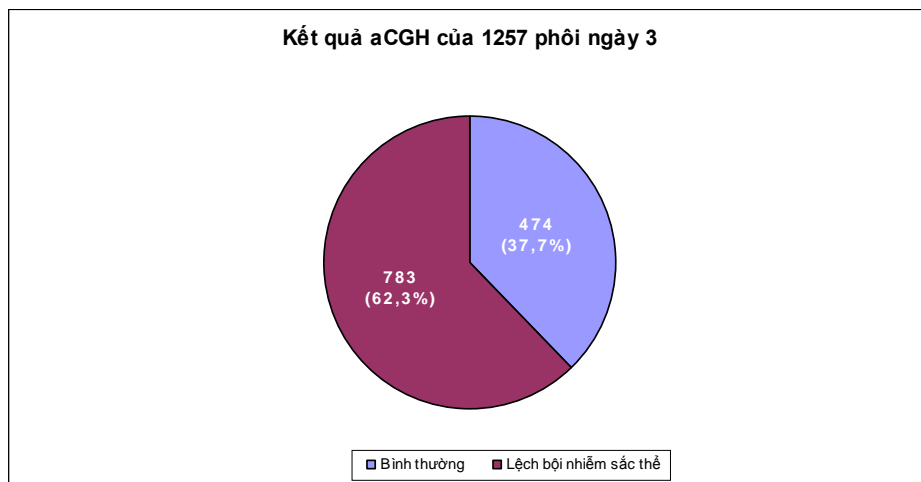
Tiền sử	Số bệnh nhân	Số lượng phôi
Đã bị sảy thai/ hcg (+)	15 (7,39 %)	80 (6,36 %)
Sau kỹ thuật IUI bị thất bại	24 (11,82 %)	172 (13,68 %)
Sau kỹ thuật IVF bị thất bại	10 (4,93 %)	66 (5,25 %)
Đã bị sảy thai + IUI thất bại	18 (8,87 %)	93 (7,4 %)
Đã bị sảy thai + IVF thất bại	9 (4,43 %)	59 (4,69 %)
IUI + IVF thất bại	5 (2,46 %)	26 (2,07 %)
Đã bị sảy thai + IUI + IVF thất bại	6 (2,96 %)	41 (3,26 %)
Chưa can thiệp gì	116 (57,14 %)	720 (57,29 %)
Cộng	203 (100 %)	1257 (100%)

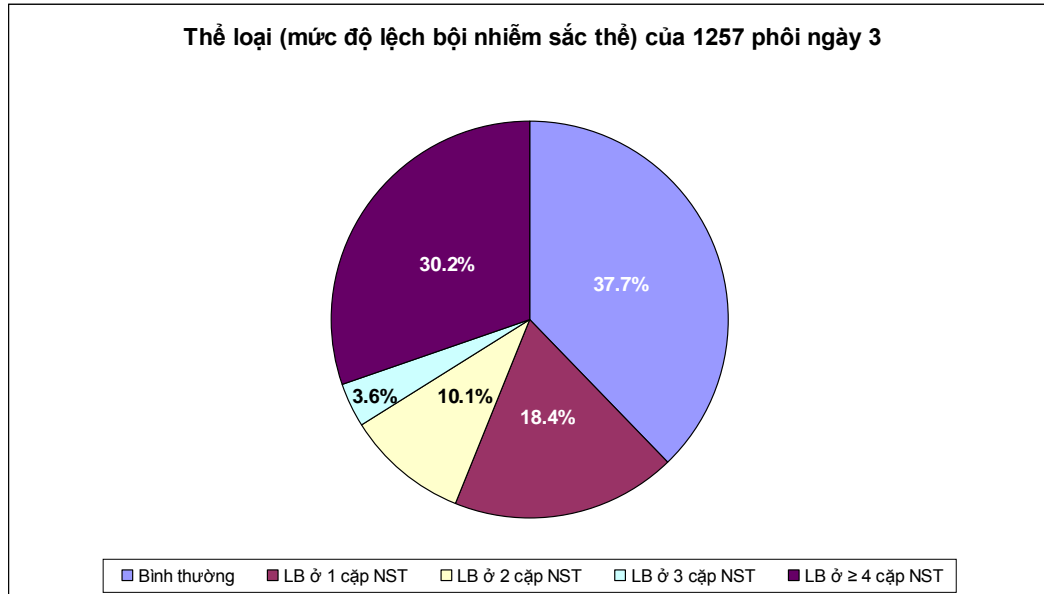
**Nhận xét:** Hơn 35% bệnh nhân đến điều trị thụ tinh ống nghiệm kết hợp với sàng lọc LBNST sau khi đã áp dụng kỹ thuật bơm tinh trùng vào buồng tử cung (IUI) hoặc điều trị thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) bị thất bại.

### 3.2. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi ngày 3 sau thụ tinh.

1257 phôi được chọn lọc đúng theo tiêu chuẩn lựa chọn áp dụng đúng theo quy trình kỹ thuật đã nêu trong phần phương pháp nghiên cứu, có đủ xét nghiệm các NST (23 đôi) cho kết quả sau:

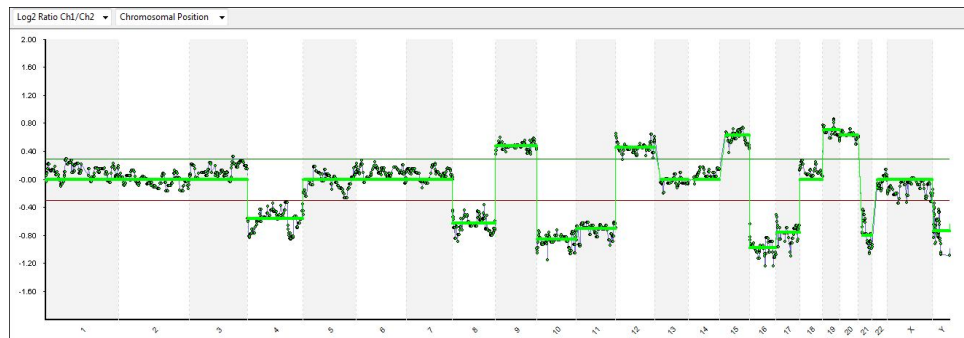
#### 3.2.1. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể và mức độ lệch bội nhiễm sắc thể.

**Hình 3.1:** Kết quả a-CGH của 1257 phôi ngày 3.



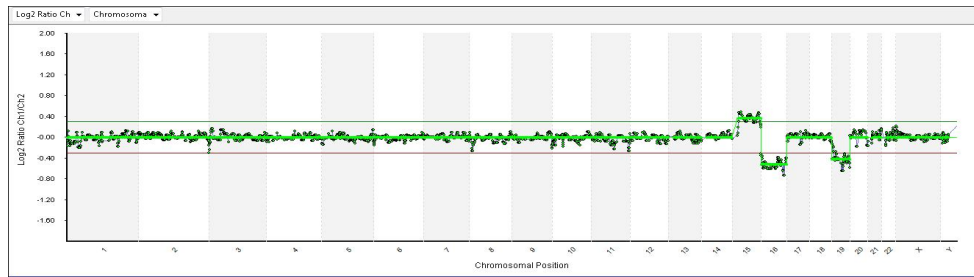
**Hình 3.2:** Thể loại (mức độ LBNST) của 1257 phôi ngày 3 sau xét nghiệm a-CGH.

**Nhận xét:** Trong tổng số 1257 phôi ngày 3 được xét nghiệm a-CGH, 474 (37,7%) phôi có số lượng NST bình thường và 783 phôi (62,3%) bị LBNST (Hình 3.1) trong đó 380 phôi (48%) bị LBNST phức tạp không xác định rõ lệch bội ở đôi NST nào (Hình 3.2, 3.3). 877 phôi có xác định rõ tình trạng của các cặp NST (Hình 3.4, 3.5, 3.6, 3.7) . Kết quả xét nghiệm của 877 phôi theo từng cặp NST được ghi trong bảng 3.4.

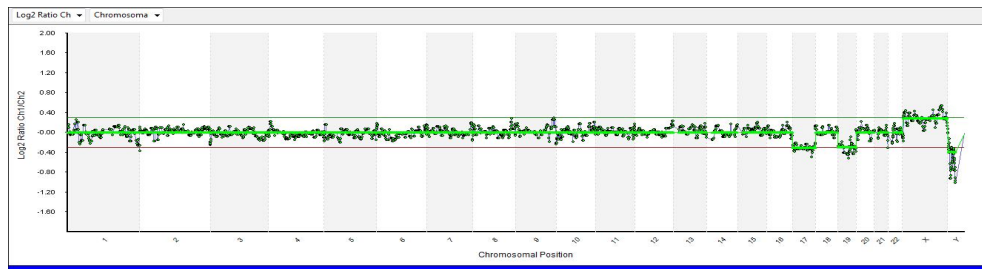


**Hình 3.3:** Lệch bội NST thể phức tạp ( $\geq 4$  cặp NST).

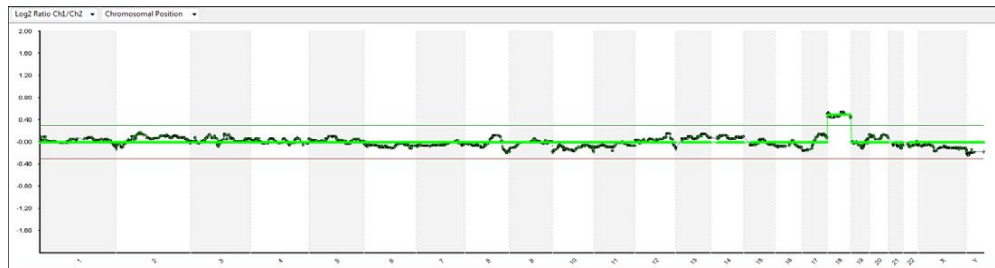
(Nguồn: kết quả a-CGH của phôi số 1 của bệnh nhân Waner.T)



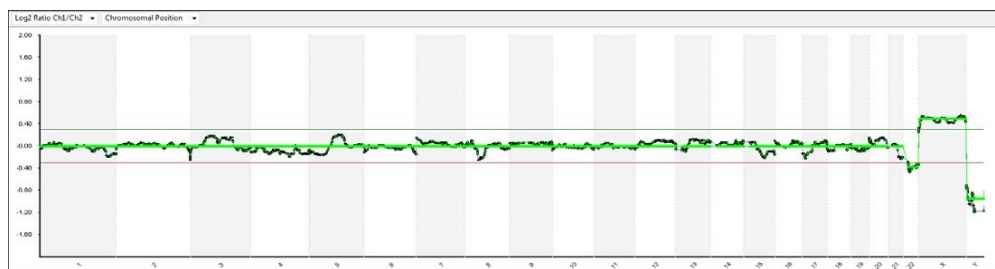
**Hình 3.4:** Lệch bội ở 3 cặp NST (45,XY;+15,-16,-19).  
(Nguồn: kết quả a-CGH của phôi số 2 của bệnh nhân Cox.J)



**Hình 3.5:** Lệch bội ở 2 cặp NST (44,XX;-17,-19).  
(Nguồn: kết quả a-CGH của phôi số 2 của bệnh nhân Polsfut.A)



**Hình 3.6:** Lệch bội ở NST 18 (47,XY; +18).  
(Nguồn: kết quả a-CGH của phôi số 1 của bệnh nhân Cade.M)



**Hình 3.7:** Lệch bội ở NST 22 (45,XX;-22).  
(Nguồn: kết quả a-CGH của phôi số 5 của bệnh nhân Kozey.R)

### 3.2.2. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể phân bố theo cặp nhiễm sắc thể.

**Bảng 3.4:** Tỷ LBNST thể phân bố theo các cặp nhiễm sắc thể 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

**Nhận xét:** Tất cả các cặp NST đều bị lệch bội theo các tỷ lệ khác nhau; Tỷ lệ LBNST gặp ít nhất (<1,5%) ở các cặp 5, 10, 8, 7, 17 và tỷ lệ LBNST gặp nhiều nhất (trên 3,5%) ở các cặp 22, 19, 16, 15, 21 và XY.

### 3.3. Khả năng tự sửa chữa của phôi ngày 3 bị lệch bội nhiễm sắc thể.

Tất cả phôi ngày 3 sau xét nghiệm chẩn đoán có LBNST đều tiếp tục nuôi cấy nhằm đánh giá:

- Tỷ lệ phôi ngày 3 có LBNST phát triển thành phôi nang.
- Một số phôi được xét nghiệm lại qua xét nghiệm tế bào lá nuôi để xác định khả năng tự điều chỉnh của phôi từ ngày 3 đến ngày 5-6 khi phôi phát triển thành phôi nang.

#### 3.3.1. Khả năng phát triển thành phôi nang của phôi lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3.

**Bảng 3.5:** Khả năng phát triển thành phôi nang của phôi LBNST ngày 3.

Kết quả a-CGH	Phát triển thành phôi nang		Chậm/ Ngừng phát triển		Cộng	RR	p
	Số phôi	%	Số phôi	%			
Bình thường	319	<b>67,3</b>	155	32,7	474	2,1	<0,001
LBNST	253	<b>32,3</b>	530	67,7	783	1	
Cộng	572		685		1257		

**Nhận xét:** Phôi bị LBNST có khả năng phát triển thành phôi nang với tỷ lệ bằng nửa phôi bình thường (RR=2,1).

#### 3.3.2. Khả năng tự sửa chữa của phôi ngày 3 bị lệch bội nhiễm sắc thể.

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 nguyên bào lá nuôi cho kết quả sau (bảng 3.6):



**Bảng 3.6:** 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 phát triển thành phôi nang vào ngày thứ 5, 6 và có khả năng tự sửa chữa trở lại bình thường (qua xét nghiệm tế bào lá nuôi).

### 3.3.3. Mối liên quan giữa khả năng tự sửa chữa của phôi LBNST ngày 3 và tuổi mẹ.

**Bảng 3.7:** 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 lệch bội nhiễm sắc thể qua phân tích đơn biến.

#### 3.4.1. Tiền sử sảy thai, điều trị vô sinh và lệch bội nhiễm sắc thể.

**Bảng 3.8:** Tiền sử sảy thai, điều trị vô sinh và LBNST.

Tiền sử	LBNST	Bình thường	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 thụ tinh trong ống nghiệm (IVF), tỷ lệ LBNST cao 76%, tăng 1,3 lần so với điều trị thông thường khác.

#### 3.4.2 Nguyên nhân vô sinh và lệch bội nhiễm sắc thể.

**Bảng 3.9:** Nguyên nhân vô sinh và LBNST.

Nguyên nhân vô sinh	LBNST	Bình thường	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 là 3 yếu tố tương ứng với LBNST cao > 60%, tăng trên 2 lần so với yếu tố tử cung; Vô sinh không rõ nguyên nhân sẽ không có phác đồ điều trị rõ ràng và khá phức tạp, đồng thời cũng liên quan nhiều đến tỷ lệ LBNST cao (65,9%).

### 3.4.3 Tuổi mẹ liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.

**Bảng 3.10:** 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	<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		
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. Đặc biệt khi tuổi mẹ trên 40 tuổi, tỷ lệ LBNST tăng cao gần 92%, gấp gần 2 lần so với khi tuổi mẹ <35 (RR=1,85; P<0,001); Yếu tố tuổi mẹ cao >40 là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST với giá trị cao (LR<sup>(+)</sup> = 8,5 và LR<sup>(-)</sup> = 0,74).

### 3.4.4. Nồng độ FSH cơ bản của mẹ liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.

**Bảng 3.11:** 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	<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			
Cộng	783		474		1257				

**Nhận xét:** FSH cơ bản >15 mIU/ml tương ứng với tỷ lệ LBNST 76,3% tăng nguy cơ bị LBNST lên gần 1,3 lần so với FSH ≤15 mIU/ml (RR=1,3; P<0,001);

Yếu tố nồng độ FSH cơ bản cao >15 mIU/ml là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST tuy nhiên giá trị thấp (LR<sup>(+)</sup> = 1,93 và LR<sup>(-)</sup> = 0,93).

### 3.4.5. Tốc độ phát triển và hình thái của phôi ngày 3 và lệch bội nhiễm sắc thể.

\* Tốc độ phát triển của phôi ngày 3 sau thụ tinh (biểu thị qua số lượng phôi bào) và lệch bội nhiễm sắc thể.

**Bảng 3.12:** 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 phôi bào)

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

**Nhận xét:** Sự phát triển của phôi từ 7-9 phôi bào ở ngày 3 (Hình 3.8) tương ứng với tỷ lệ LBNST thấp nhất (56,3%).

Phôi phát triển chậm hay quá nhanh đều có nguy cơ bị LBNST cao hơn phôi phát triển bình thường (P<0,001); đặc biệt phôi phát triển chậm đến ngày 3 chỉ có 4-6 phôi bào (Hình 3.9) sẽ tương ứng với tỷ lệ LBNST tăng gần 1,5 lần so với phôi có 7-9 phôi bào (P <0,001).

Yếu tố phôi phát triển chậm 4-6 phôi bào là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST với giá trị trung bình (LR<sup>(+)</sup> = 3,1 và LR<sup>(-)</sup> = 0,82).

Phôi phát triển chậm có 4-6 phôi bào ngày 3 có tỷ lệ LBNST cao hơn phôi phát triển nhanh có ≥ 10 phôi bào ngày 3 (Hình 3.10) (P < 0,001).



**Hình 3.8:** Phôi số 4 vào ngày 3 của bệnh nhân Zaic.S.

Phôi phát triển bình thường (8 phôi bào) vào ngày 3 sau thụ tinh; các phôi bào đồng đều, không có mảnh vụn (*kính hiển vi đảo ngược x 400*)



**Hình 3.9:** Phôi số 2 vào ngày 3 của bệnh nhân Garcia.A.

Phôi phát triển chậm vào ngày thứ 3 sau thụ tinh (có 5 phôi bào)  
(*kính hiển vi đảo ngược x 200*)



**Hình 3.10:** Phôi số 9 vào ngày 3 của bệnh nhân Borchardt.M.

Phôi phát triển nhanh vào ngày thứ 3 sau thụ tinh

(có trên 10 phôi bào có kích thước không đều)

(kính hiển vi đảo ngược x 200)

\* Độ đồng đều của kích thước phôi bào ngày 3 và lệch bội nhiễm sắc thể.

**Bảng 3.13:** 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	<b>81,6</b>	112	18,4	609	1,85	<0,001	2,69	0,48
Đều	286	<b>44,1</b>	362	55,9	648	1			
Cộng	783		474		1257				

**Nhận xét:** Kích thước phôi bào ngày 3 không đồng đều (Hình 3.10 và 3.11) tương ứng với LBNST khá cao 81,6% tăng gấp gần 2 lần so với phôi có kích thước phôi bào đồng đều (44,1%); Kích thước phôi bào ngày 3 không đồng đều là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST với giá trị trung bình (LR<sup>(+)</sup> = 2,69 và LR<sup>(-)</sup> = 0,48).



**Hình 3.11:** Phôi số 7 vào ngày 3 của bệnh nhân Waner.T.

(7 phôi bào: các phôi bào có kích thước không đều)

(Kính hiển vi đảo ngược x400)

\* Xuất hiện mảnh vụn trong phôi ngày 3 và lệch bội nhiễm sắc thể.

**Bảng 3.14:** 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>b,c</sup> <0,001

**Nhận xét:** Phôi càng có nhiều mảnh vụn thì khả năng bị LBNST càng cao (P<0,05). Phôi có số lượng mảnh vụn nhiều 16-30% (Hình 3.12) tương ứng với tỷ lệ LBNST cao nhất (75,1%) cao gấp 1,39 lần phôi có ít mảnh vụn 0-5% (Hình 3.15) (RR=1,39; P<0,001); Phôi có nhiều mảnh vụn là chỉ báo để tiên lượng phôi LBNST với giá trị thấp (LR<sup>(+)</sup>=1,96 và LR<sup>(-)</sup>=0,77).



**Hình 3.12:** Phôi số 4 vào ngày 3 của bệnh nhân Lucente.M.

Phôi có 8 phôi bào với khoảng 16-20% mảnh vụn nằm rải rác, các phôi bào có kích thước đồng đều. (*Kính hiển vi đảo ngược x 200*)

\* Sự phân bố vị trí mảnh vụn trong phôi ngày 3 và lệch bội nhiễm sắc thể.

Trong tổng số 1257 phôi được xét nghiệm a-CGH, có 28 phôi không có mảnh vụn, còn lại 1229 phôi có mảnh vụn. Sau đây là kết quả nghiên cứu của 1229 phôi nói trên (bảng 3.15).

**Bảng 3.15:** 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				

**Nhận xét:** Mảnh vụn có thể phân bố rải rác (Hình 3.12, 3.14, 3.15) trong phôi hoặc tập trung vùng ngoại vi (Hình 3.13). Phôi có mảnh vụn phân bố rải rác là chỉ báo phôi có tỷ lệ LBNST cao 77,6%, tăng gấp gần 2 lần so với phôi có mảnh vụn tập trung ở ngoại vi (40,1%) (RR=1,94; P<0,001); Mảnh vụn phân bố rải rác là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST với giá trị trung bình (LR<sup>(+)</sup> = 2; LR<sup>(-)</sup> = 0,39).





**Hình 3.13:** Phôi số 5 vào ngày 3 của bệnh nhân Dacy.S.

Phôi có 4 phôi bào với khoảng 15 % mảnh vụn nằm tập trung, các phôi bào có kích thước đồng đều (*Kính hiển vi đảo ngược x 400*)



**Hình 3.14:** Phôi số 8 vào ngày 3 của bệnh nhân Dittrich.J.

Phôi có 8 phôi bào với khoảng 6-15% mảnh vụn nằm rải rác.  
(*Kính hiển vi đảo ngược x 400*)



**Hình 3.15:** Phôi số 6 vào ngày 3 của bệnh nhân Shen.M.

Phôi có 6 phôi bào với  $\leq 5\%$  mảnh vụn nằm rải rác.

(Kính hiển vi đảo ngược x 400)

#### 3.4.6. Tốc độ phát triển thành phôi nang, hình thái của phôi nang và lệch bội nhiễm sắc thể.

\* Sự phát triển của phôi từ ngày 3 đến giai đoạn phôi nang (biểu thị bằng khả năng hình thành phôi nang) và lệch bội nhiễm sắc thể.

**Bảng 3.16:** 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:** Phôi chậm hoặc ngừng phát triển từ ngày 3 đến giai đoạn phôi nang có nguy cơ tăng LBNST lên 1,75 lần so với phôi phát triển thành phôi nang. Phôi ngừng phát triển là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBT với giá trị trung bình ( $LR^{(+)} = 2,1$  và  $LR^{(-)} = 0,48$ ).

\* 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 lệch bội nhiễm sắc thể.

Trong tổng số 1257 phôi có 685 (54,5%) phôi ngừng phát triển ở giai đoạn phân chia hay chậm phát triển ở giai đoạn phôi dâu hay phôi nang sớm (giai đoạn 1); còn lại 572 phôi tiếp tục phát triển theo tốc độ khác nhau thành phôi nang (giai đoạn 2-6) tương ứng với tỷ lệ LBNST cũng khác nhau được nêu trong bảng sau (bảng 3.17).

**Bảng 3.17:** So sánh giữa phôi phát triển chậm đến ngày 6 mới hình thành phôi nang và phôi phát triển nhanh đến ngày 5 đã thành phôi nang và LBNST.

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

**Nhận xét:** Phôi phát triển chậm (thành phôi nang vào ngày 6) tương ứng với tỷ lệ LBNST 66,7%; cao hơn khoảng 2,3 lần so với phôi nang phát triển bình thường (thành phôi nang vào ngày 5) (RR = 2,3 và P <0,001);

Phôi phát triển chậm thành phôi nang vào ngày thứ 6 là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST với giá trị trung bình ( $LR^{(+)} = 2,52$  và  $LR^{(-)} = 0,51$ ).

\* *Tốc độ phát triển của phôi nang vào ngày 5 và lệch bội nhiễm sắc thể.*

**Bảng 3.18:** 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 dâu	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)

$P^{a,b} < 0,005$ ;  $P^{a,c} < 0,001$ ;  $P^{a,d} < 0,001$ ;  $P^{a,e} < 0,001$ ;  $P^{a,f} < 0,001$ ;

$P^{b,c} < 0,001$ ;  $P^{b,d} < 0,001$ ;  $P^{b,e} < 0,001$ ;  $P^{b,f} < 0,001$ ;

$P^{c,d} < 0,005$ ;  $P^{c,e} < 0,001$ ;  $P^{c,f} < 0,001$ ;

$P^{d,e} > 0,05$ ;  $P^{d,f} < 0,001$ ;

$P^{e,f} < 0,05$

**Nhận xét:** Phôi LBNST phát triển thành phôi nang vào ngày 5 sau khi thụ tinh với tốc độ chậm hơn phôi bình thường.

Phôi nang phát triển càng chậm ở các mức độ khác nhau (từ giai đoạn 3-4, giai đoạn 2, giai đoạn 1, đến giai đoạn phôi dâu) làm cho nguy cơ LBNST tăng lần lượt là 1,7 – 2 – 2,9 – 3,7 – và 4,2 lần so với khi phôi nang phát triển tốt bình thường (giai đoạn 5-6).

Phôi nang phát triển chậm đặc biệt là khi ngừng phát triển hay giai đoạn phôi dâu là chỉ báo tiên lượng LBNST với giá trị cao ( $LR^{(+)} > 5$ ).

\* *Mức độ lệch bội nhiễm sắc thể và khả năng hình thành phôi nang.*

**Bảng 3.19:** 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 cặp NST	121	52,4 <sup>b</sup>	110	47,6	0,78	1	231
LB ở 2 cặp NST	53	41,7 <sup>c</sup>	74	58,3	0,62	0,8	127
LB ở 3 cặp NST	14	31,1 <sup>d</sup>	31	68,9	0,46	0,59	45
LB >3 cặp NST	65	17,1 <sup>e</sup>	315	82,9	0,25	0,33	380
Tổng	572		685				1257

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

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

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

$P^{d,e} < 0,05$

**Nhận xét:** Khả năng phát triển thành phôi nang có xu hướng giảm dần khi mức độ LBNST tăng (hay số cặp NST của phôi bị LBNST càng nhiều). Nếu so sánh với phôi bình thường thì khả năng phát triển thành phôi nang giảm bằng 0,25 – 0,46 – 0,62 - 0,78 lần lượt tương ứng với LBNST xảy ra > 3 cặp NST, 3 cặp NST, 2 cặp NST và 1 cặp NST.

\**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 lệch bội nhiễm sắc thể*

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 3.20:** Giới tính của phôi nang ngày 5 và LBNST.

Giới tính	LBNST		Bình thường		P	Tổng
	Số phôi	%	Số phôi	%		
XX	41	<b>25,8</b>	118	74,2	>0,05	<b>159</b>
XY	35	<b>22,2</b>	123	77,8		<b>158</b>
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 của phôi có giới tính nam và nữ khác biệt không có ý nghĩa thống kê, có nghĩa là nguy cơ phôi bị LBNST không bị chi phối bởi giới tính.

\* *Chất lượng của mầm phôi (ICM) và lệch bội nhiễm sắc thể.*

Trong tổng số 1257 phôi được xét nghiệm a-CGH, có 685 phôi chậm hay ngừng phát triển, còn lại 572 phôi phát triển thành phôi nang (giai đoạn 2-6) vào ngày 5 và 6. Sau đây là kết quả nghiên cứu một số yếu tố liên quan LBNST của 572 phôi nang nói trên (bảng 3.21).

**Bảng 3.21:** 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	<b>80,6<sup>a</sup></b>	14	19,4	72	2,74	6	0,57
Loại B	131	<b>46,3<sup>b</sup></b>	152	53,7	283	1,57	1,34	0,66
Loại A	64	<b>29,5<sup>c</sup></b>	153	70,5	217	1		
Cộng	253		319		572			

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

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

**Nhận xét:** Đánh giá hình thái chất lượng của mầm phôi (ICM) cho thấy ảnh hưởng của LBNST. Chất lượng ICM giảm dần khi tỷ lệ LBNST tăng ( $P < 0,001$ ). Phôi có ICM loại A (chất lượng tốt) thấy ở 70,5% phôi bình

thường so với 29,5% ở phôi LBNST. Phôi có ICM loại C-D (không có hay có chất lượng kém) có tỷ lệ LBNST cao gấp gần 3 lần so với phôi có ICM loại A (chất lượng tốt) (RR=2,74; P<0,001); ICM loại C-D là chỉ báo tiên lượng LBNST có giá trị cao với  $LR^{(+)}=6$  và  $LR^{(-)}=0,57$ .

\* *Chất lượng của nguyên bào lá nuôi phôi (TE) và lệch bội nhiễm sắc thể.*

**Bảng 3.22:** Chất lượng của nguyên bào lá nuôi phôi và LBNST.

Nguyên bào lá nuôi	LBNST		Bình thường		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 nguyên bào lá nuôi phôi (TE) chất lượng kém (loại C), tỷ lệ lệch LBNST tăng gấp 2,1 lần phôi có có TE chất lượng tốt (loại A) (RR=2,1; P<0,001); TE loại C (chất lượng kém) là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST với giá trị trung bình ( $LR^{(+)}=2,69$  và  $LR^{(-)}=0,41$ ).

\* *Chất lượng phôi nang và lệch bội nhiễm sắc thể.*

**Bảng 3.23:** Chất lượng phôi nang nói chung và LBNST.

Chất lượng phôi nang	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%				
CL kém (BC,CB,CC,DC)	88	78,6 <sup>(c)</sup>	24	21,4	112	2,53	4,3	0,53
CL trung bình (BB)	89	41,2 <sup>(b)</sup>	127	58,8	216	1,32	1,25	0,81
CL tốt (AA, AB, BA)	76	31,1 <sup>(a)</sup>	168	68,9	244	1		
Cộng	253		319		572			

(Ghi chú : RR và LR so sánh với tiêu chuẩn chất lượng phôi tốt)

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

**Nhận xét:** Tỷ lệ LBNST tăng dần khi chất lượng của phôi nang giảm. Phôi có chất lượng kém (BC, CB, CC, DC) tương ứng với tỷ lệ LBNST tăng gấp 2,5 lần so với phôi có chất lượng tốt (AA, AB, BA); Phôi nang có chất lượng kém là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST với giá trị trung bình ( $LR^{(+)} = 4,3$  và  $LR^{(-)} = 0,53$ ).

\* *Chất lượng phôi nang vào ngày 5 và tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể.*

Trong số 1257 phôi xét nghiệm a-CGH, 685 phôi chậm hay ngừng phát triển còn lại 572 phôi phát triển thành phôi nang (giai đoạn 2-6) vào ngày 5 và 6. Trong số 572 phôi phát triển thành phôi nang có 338 phôi phát triển thành phôi nang ngày 5. Sau đây là kết quả nghiên cứu về LBNST trên 338 phôi nang ngày 5 (bảng 3.24):

**Bảng 3.24:** Chất lượng phôi nang ngày 5 và LBNST.

Chất lượng phôi nang	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%				
CL kém (BC,CB,CC,DC)	13	56,5 <sup>(a)</sup>	10	43,5	23	2,29	3,5	0,84
CL trung bình (BB)	35	29,9 <sup>(b)</sup>	82	70,1	117	1,21	1,17	0,9
CL tốt (AA, AB, BA)	49	24,7 <sup>(c)</sup>	149	75,3	198	1		
Cộng	97		241		338			

(Ghi chú: RR và LR so sánh với phôi nang có chất lượng tốt)

$P^{a,b} < 0,05$ ;  $P^{a,c} < 0,005$ ;  $P^{b,c} > 0,05$ .

**Nhận xét:** Vào ngày thứ 5 sau thụ tinh, phôi nang có chất lượng kém, tỷ lệ LBNST cao gấp 2,3 lần so với phôi nang có chất lượng tốt (Hình 3.16) ( $RR=2,29$ ;  $P < 0,005$ ); Phôi có chất lượng kém là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST có giá trị trung bình với  $LR^{(+)}=3,5$  và  $LR^{(-)}=0,84$ .

\* *Chất lượng phôi nang ngày 6 và tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể.*

Trong số 1257 phôi xét nghiệm, vào ngày 5: 247 phôi bình thường được chọn để chuyển vào buồng tử cung mẹ; 92 phôi được đông lạnh dự trữ; 94 phôi được hiến cho nghiên cứu khoa học; 299 phôi bị loại bỏ do ngừng phát triển. Sau đây là kết quả nghiên cứu của 525 phôi được nuôi cấy theo dõi tiếp đến ngày 6 (bảng 3.25).



**Bảng 3.25:** Chất lượng phôi nang ngày 6 và LBNST.

Chất lượng phôi nang	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%				
Thoái hóa, Chậm phát triển (Phôi dâu, phôi nang sớm)	255	87,6 <sup>(a)</sup>	36	12,4	291	1,49	1,38	0,28
CL kém (BC, CB, CC)	75	84,3 <sup>(b)</sup>	14	15,7	89	1,44	1,76	0,45
CL trung bình (BB)	54	54,5 <sup>(c)</sup>	45	45,5	99	0,93	0,96	1,1
CL tốt (AA, AB, BA)	27	58,7 <sup>(d)</sup>	19	41,3	46	1		
Cộng	411		114		525			

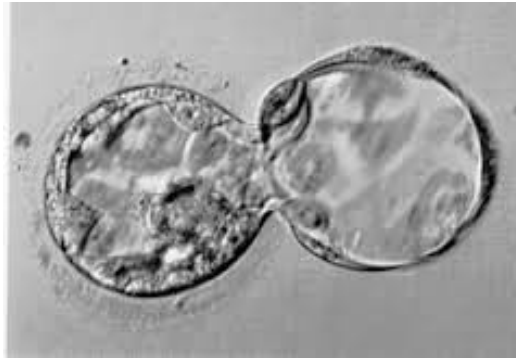
(Ghi chú: RR và LR so sánh với phôi nang có chất lượng tốt)

P<sup>a,d</sup><0.001; P<sup>a,c</sup><0.001; P<sup>b,d</sup><0.001; P<sup>b,c</sup><0.001

**Nhận xét:** Vào ngày thứ 6 sau thụ tinh, phôi nang phát triển có chất lượng kém, tỷ lệ LBNST tương đương với phôi phát triển chậm ở giai đoạn thoái hóa, phôi dâu hoặc phôi nang sớm (tương ứng 84,3% và 87,6%), cao hơn khoảng 1,5 lần so với phôi nang phát triển có chất lượng tốt và trung bình (Hình 3.17).

**Hình 3.16:** Phôi số 7 và 8 vào ngày 5 của bệnh nhân Guarino.T.

Phôi nang chất lượng tốt giai đoạn 5 (đang thoát màng) vào ngày 5 sau khi sinh thiết phôi vào ngày 3. (Kính hiển vi đảo ngược x 200)



**Hình 3.17:** Phôi số 3 của vào ngày 6 của bệnh nhân Cherry.E.

Phôi nang có chất lượng trung bình giai đoạn 5 (đang thoát màng) vào ngày 6 sau khi sinh thiết phôi vào ngày 3. (Kính hiển vi đảo ngược x 200)

### 3.5. Một số yếu tố liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể qua phân tích đa biến.

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

**Bảng 3.26:** Liên quan giữa tuổi mẹ; số lượng phôi bào và LBNST.

YT liên quan tác động		LBNST		Bình thường		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
Số phôi bào	Tuổi mẹ	Số phôi	%	Số phôi	%				
4-6	<35	50	<b>75,8<sup>a</sup></b>	16	24,2	66	1,75	3,5	0,84
	35-40	68	<b>87,2<sup>b</sup></b>	10	12,8	78	2,0	6,75	0,76
	>40	30	<b>88,2<sup>c</sup></b>	4	11,8	34	2,03	8,75	0,88
7-9	<35	185	<b>43,4<sup>d</sup></b>	241	56,6	426	1		
	35-40	194	<b>66,7<sup>e</sup></b>	97	33,3	291	1,54	1,76	0,69
	>40	66	<b>90,4<sup>f</sup></b>	7	9,6	73	2,08	9,29	0,76
≥10	<35	83	<b>56,1<sup>g</sup></b>	65	43,9	148	1,29	1,48	0,87
	35-40	78	<b>69,6<sup>h</sup></b>	34	30,4	112	1,6	2,5	0,8
	>40	29	<b>100<sup>i</sup></b>	0	0	29	2,3	N/A	0,86
Cộng		783		474		1257			

(Ghi chú: RR và LR so sánh với phôi có 7-9 tế bào ở mẹ <35 tuổi)

$P^{a,b,c} > 0,05$ ;  $P^{a,d} < 0,001$ ;  $P^{a,e} > 0,05$ ;  $P^{a,f} < 0,05$ ;  $P^{a,g} < 0,01$ ;  $P^{a,h} > 0,05$ ;  $P^{a,i} < 0,01$ ;  
 $P^{b,d} < 0,001$ ;  $P^{b,e} < 0,001$ ;  $P^{b,f} > 0,05$ ;  $P^{b,g} < 0,001$ ;  $P^{b,h} < 0,01$ ;  $P^{b,i} > 0,05$ ;  $P^{c,d} < 0,001$ ;  
 $P^{c,e} < 0,025$ ;  $P^{c,f} > 0,05$ ;  $P^{c,g} < 0,005$ ;  $P^{c,h} > 0,05$ ;  $P^{c,i} > 0,05$ ;  $P^{d,e} < 0,001$ ;  $P^{d,f} < 0,001$ ;  
 $P^{d,g} < 0,025$ ;  $P^{d,h} < 0,001$ ;  $P^{d,i} < 0,001$ ;  $P^{e,f} < 0,001$ ;  $P^{e,g} < 0,05$ ;  $P^{e,h} > 0,05$ ;  $P^{e,i} < 0,001$ ;  
 $P^{f,g} < 0,001$ ;  $P^{f,h} < 0,005$ ;  $P^{f,i} > 0,05$ ;  $P^{g,h} < 0,05$ ;  $P^{g,i} < 0,001$ ;  $P^{h,i} < 0,005$

**Nhận xét:** Phôi 4-6 phôi bào tỷ lệ LBNST cao không phụ thuộc vào tuổi mẹ ( $P>0,05$ ). phôi có  $> 6$  phôi bào, tỷ lệ LBNST tăng theo tuổi mẹ ( $P<0,05$ ). Ở mẹ trên 40 tuổi, tỷ lệ LBNST đều cao không phụ thuộc vào số lượng phôi bào ( $P>0,05$ ). Khi so sánh với phôi 7-9 phôi bào ở phụ nữ trẻ  $<35$  tuổi: \*nếu 2 yếu tố số phôi bào  $\leq 6$  và tuổi mẹ  $>35$  cùng tác động, sẽ tăng nguy cơ LBNST lên khoảng 2 lần; hai yếu tố số phôi bào  $\leq 6$  và tuổi mẹ  $>35$  là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST có giá trị cao với  $LR^{(+)}=6,5$  và  $8,75$ ; \*nếu 2 yếu tố số phôi bào  $\geq 10$  và tuổi mẹ  $>35$  cùng tác động sẽ tăng nguy cơ LBNST lên 1,6- 2,3 lần; 2 yếu tố phôi bào  $\geq 10$  và tuổi mẹ 35-40 là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST có giá trị trung bình với  $LR^{(+)}=2,5$  và  $LR^{(-)}=0,8$ .

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

**Bảng 3.27:** Liên quan giữa số lượng phôi bào; tỷ lệ mảnh vụn và LBNST.

YT liên quan tác động		LBNST		Bình thường		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
Số phôi bào	% mảnh vụn	Số phôi	%	Số phôi	%				
4-6	0-5%	19	<b>82,6<sup>a</sup></b>	4	17,4	23	1,68	4,7	0,94
	6-15%	50	<b>86,2<sup>b</sup></b>	8	13,8	58	1,75	5,4	0,83
	16-30%	79	<b>81,4<sup>c</sup></b>	18	18,6	97	1,65	3,5	0,78
7-9	0-5%	206	<b>49,2<sup>d</sup></b>	213	50,8	419	1		
	6-15%	158	<b>62<sup>e</sup></b>	97	38	255	1,26	1,4	0,81
	16-30%	81	<b>69,8<sup>f</sup></b>	35	30,2	116	1,42	2	0,84
$\geq 10$	0-5%	89	<b>64,5<sup>g</sup></b>	49	35,5	138	1,31	1,58	0,86
	6-15%	68	<b>63,6<sup>h</sup></b>	39	36,4	107	1,29	1,67	0,88
	16-30%	33	<b>75<sup>i</sup></b>	11	25	44	1,52	2,86	0,91
Cộng		783		474		1257			

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

$P^{a,b,c}>0,05$ ;  $P^{a,d}<0,01$ ;  $P^{a,e}>0,05$ ;  $P^{a,f}>0,05$ ;  $P^{a,g}>0,05$ ;  $P^{a,h}>0,05$ ;  $P^{a,i}>0,05$ ;  
 $P^{b,d}<0,001$ ;  $P^{b,e}<0,001$ ;  $P^{b,f}<0,05$ ;  $P^{b,g}<0,005$ ;  $P^{b,h}<0,005$ ;  $P^{b,i}>0,05$ ;  $P^{c,d}<0,001$ ;  
 $P^{c,e}<0,001$ ;  $P^{c,f}>0,05$ ;  $P^{c,g}<0,01$ ;  $P^{c,h}<0,01$ ;  $P^{c,i}>0,05$ ;  $P^{d,e}<0,005$ ;  $P^{d,f}<0,001$ ;  
 $P^{d,g}<0,005$ ;  $P^{d,h}<0,025$ ;  $P^{d,i}<0,005$ ;  $P^{e,f}>0,05$ ;  $P^{e,g}>0,05$ ;  $P^{e,h}>0,05$ ;  $P^{e,i}>0,05$ ;  
 $P^{f,g}>0,05$ ;  $P^{f,h}>0,05$ ;  $P^{f,i}>0,05$ ;  $P^{g,h}>0,05$ ;  $P^{g,i}>0,05$ ;  $P^{h,i}>0,05$ .

**Nhận xét:** Ở phôi phát triển chậm (4-6 phôi bào), tỷ lệ LBNST cao >80% không liên quan đến tỷ lệ mảnh vụn ( $P>0,05$ ). Ở phôi phát triển nhanh ( $\geq 10$  phôi bào) tỷ lệ LBNST cao >63% không liên quan đến tỷ lệ mảnh vụn ( $P>0,05$ ). Khi so sánh với phôi 7-9 phôi bào có ít mảnh vụn (0-5%) (có nguy cơ LBNST thấp nhất): \*nếu 2 yếu tố số phôi bào  $\leq 6$  và tỷ lệ mảnh vụn >5% cùng tác động, sẽ tăng nguy cơ lệch bội thể lên 1,65 đến 1,75 lần; hai yếu tố số phôi bào  $\leq 6$  và số lượng mảnh vụn >5% là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST có giá trị tương đối cao với  $LR^{(+)} \geq 3,5$ ; \*nếu 2 yếu tố số phôi bào  $\geq 10$  và số lượng mảnh vụn trung bình >5% cùng tác động sẽ tăng nguy cơ LBNST lên 1,29 -1,52; hai yếu tố số tế bào phôi  $\geq 10$  và số lượng mảnh vụn >5% là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST với  $LR^{(+)}=1,67$  và 2,86.

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

Trong tổng số 1257 phôi được xét nghiệm a-CGH, có 427 phôi có phôi bào không đều với  $\leq 15\%$  mảnh vụn; 75 phôi có phôi bào đều với >15% mảnh vụn; còn lại 755 phôi, trong đó 182 phôi có phôi bào không đều với >15% mảnh vụn và 573 phôi có phôi bào đều với  $\leq 15\%$  mảnh vụn. Sau đây là kết quả nghiên cứu của 755 phôi nói trên (bảng 3.28):

**Bảng 3.28:** 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	<b>86,3</b>	25	13,7	182	1,98	<0,001	5,36	0,66
Đều MV $\leq 15\%$	250	<b>43,6</b>	323	56,4	573	1			
Cộng	407		348		755				

**Nhận xét:** Khi so sánh với phôi có phôi bào đều với  $\leq 15\%$  mảnh vụn, thì 2 yếu tố phôi bào không đều và mảnh vụn  $>15\%$  tác động kết hợp làm tăng nguy cơ LBT lên 1,98 lần; 2 yếu tố phôi bào không đều và mảnh vụn  $>15\%$  tác động kết hợp là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBT với giá trị cao ( $LR^{(+)} = 5,36$  và  $LR^{(-)} = 0,66$ ).

Trong tổng số 1257 phôi được xét nghiệm a-CGH, có 190 phôi có phôi bào không đều với  $\leq 5\%$  mảnh vụn và 258 phôi có phôi bào đều với  $>5\%$  mảnh vụn, còn lại 809 phôi, trong đó 419 phôi có phôi bào không đều với  $>5\%$  mảnh vụn và 390 phôi có phôi bào đều với  $\leq 5\%$  mảnh vụn. Sau đây là kết quả nghiên cứu của 809 phôi nói trên (bảng 3.29):

**Bảng 3.29:** Phôi bào không đều, mảnh vụn  $>5\%$  và LBNST.

2 Yếu tố	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	P	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%					
Không đều MV $>5\%$	353	<b>84,2</b>	66	15,8	419	1,93	<0,001	2,92	0,42
Đều MV $\leq 5\%$	170	<b>43,6</b>	220	56,4	390	1			
Cộng	523		286		809				

**Nhận xét:** So với phôi có phôi bào đều với  $\leq 5\%$  mảnh vụn thì khi 2 yếu tố phôi bào không đều với  $>5\%$  mảnh vụn tác động kết hợp làm tăng nguy cơ LBNST lên 1,93 lần; khi 2 yếu tố phôi bào không đều và mảnh vụn  $>5\%$  tác động kết hợp là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST với giá trị trung bình ( $LR^{(+)} = 2,9$  và  $LR^{(-)} = 0,42$ ).

#### **3.5.4. Phân tích đa biến 3 yếu tố: Số phôi bào, độ đồng đều và sự có mặt mảnh vụn.**

Trong tổng số 1257 phôi được xét nghiệm a-CGH có 724 phôi không phù hợp trong bảng phân tích sau bao gồm: 105 phôi có  $\leq 6$  phôi bào kích

thước đều với 0-30% mảnh vụn và kích thước phôi bào không đều với  $\leq 15\%$  mảnh vụn; 36 phôi có 7-9 phôi bào đều với  $>15\%$  mảnh vụn; 323 phôi có 7-9 phôi bào có kích thước không đều với 0-30% mảnh vụn; 122 phôi có  $\geq 10$  phôi bào kích thước không đều với  $\leq 15\%$  mảnh vụn; và 138 phôi có  $\geq 10$  phôi bào có kích thước đều với 0-30% mảnh vụn). Còn lại 533 phôi đúng tiêu chuẩn được phân tích ở bảng 3.30 dưới đây.

**Bảng 3.30:** Phôi phát triển nhanh/chậm, kích thước phôi bào 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	%				
$\geq 10$ 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 $\leq 15\%$	168	39 <sup>b</sup>	263	61	431	1		
$\leq 6$ 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<sup>a,b</sup> < 0,001; P<sup>b,c</sup> < 0,001; P<sup>a,c</sup> > 0,05

**Nhận xét:** So với phôi có 7-9 phôi bào đều với  $\leq 15\%$  mảnh vụn thì \*khi có 3 yếu tố số phôi bào  $\geq 10$ , phôi bào không đều, mảnh vụn  $>15\%$  tác động kết hợp làm tăng nguy cơ LBNST lên 2,3 lần; 3 yếu tố này kết hợp là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST có giá trị rất cao với LR<sup>(+)</sup> = 12 và LR<sup>(-)</sup> = 0,88. \* khi 3 yếu tố số phôi bào  $\leq 6$ , phôi bào không đều, mảnh vụn  $>15\%$  tác động kết hợp làm tăng nguy cơ LBNST lên 2,2 lần; 3 yếu tố này khi kết hợp chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST có giá trị cao với LR<sup>(+)</sup> = 6,75 và LR<sup>(-)</sup> = 0,76.

Trong tổng số 1257 phôi được xét nghiệm a-CGH, có 741 phôi không phù hợp trong bảng phân tích dưới đây bao gồm: 196 phôi có  $\geq 10$  phôi bào kích thước đều mảnh vụn 0-30% và phôi bào kích thước không đều với  $\leq 5\%$  mảnh vụn; 166 phôi có 7-9 phôi bào đều với  $>5\%$  mảnh vụn; 323 phôi có 7-9 phôi bào có kích thước không đều với 0-30% mảnh vụn; 13 phôi có  $\leq 6$  phôi bào kích thước không đều với  $\leq 5\%$  mảnh vụn; và 43 phôi có  $\leq 6$  phôi bào có kích thước đều với 0-30% mảnh vụn. Còn lại 516 phôi đúng tiêu chuẩn được phân tích ở bảng 3.31 dưới đây.

**Bảng 3.31:** Phôi phát triển nhanh/chậm, kích thước phôi bào không đều, mảnh vụn  $>5\%$  và LBNST.

3 Yếu tố	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%				
$\geq 10$ phôi bào không đều MV $>5\%$	75	<b>80,6<sup>a</sup></b>	18	19,4	93	2,1	4,5	0,66
7-9 phôi bào đều MV $\leq 5\%$	115	<b>38,2<sup>b</sup></b>	186	61,8	301	1		
$\leq 6$ phôi bào không đều MV $>5\%$	105	<b>86,1<sup>c</sup></b>	17	13,9	122	2,3	5,7	0,57
Cộng	295		221		516			

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

**Nhận xét:** Khi so sánh với phôi có 7-9 phôi bào kích thước đều với  $\leq 5\%$  mảnh vụn thì \*khi 3 yếu tố số phôi bào  $\leq 6$ , phôi bào không đều, mảnh vụn  $>5\%$  tác động kết hợp làm tăng nguy cơ LBNST lên 2,3 lần; 3 yếu tố này khi kết hợp là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST có giá trị cao với  $LR^{(+)} = 5,7$  và  $LR^{(-)} = 0,57$ ; \*khi 3 yếu tố số phôi bào  $\geq 10$ , phôi bào không đều, mảnh vụn  $>5\%$  tác động kết hợp làm tăng nguy cơ LBNST lên 2,1; 3 yếu tố này khi kết hợp là chỉ báo trong tiên lượng LBNST có giá trị trung bình với  $LR^{(+)} = 4,5$  và  $LR^{(-)} = 0,66$ .

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

Trong tổng số 1257 phôi được xét nghiệm a-CGH, có 799 phôi không đúng tiêu chuẩn phân tích trong bảng dưới bao gồm: 246 trường hợp có  $\geq 10$  phôi bào với  $\leq 15\%$  mảnh vụn rải rác và  $\geq 10$  phôi bào với 0-30% mảnh vụn tập trung; 16 trường hợp 7-9 TB với  $> 15\%$  mảnh vụn tập trung; 448 trường hợp 7-9 TB với 0-30% mảnh vụn rải rác; 37 trường hợp  $\leq 6$  TB với 0-30% mảnh vụn tập trung; và 52 trường hợp  $\leq 6$  TB với  $\leq 15\%$  mảnh vụn rải rác. Còn lại 458 phôi đúng tiêu chuẩn được phân tích ở bảng 3.32 dưới đây.

**Bảng 3.32:** 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	%				
$\geq 10$ phôi bào MV $> 15\%$ Rải rác	34	79,1 <sup>a</sup>	9	20,9	43	2,3	5,61	0,8
7-9 phôi bào MV $\leq 15\%$ Tập trung	114	35 <sup>b</sup>	212	65	326	1		
$\leq 6$ phôi bào 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:** Khi so sánh với phôi có 7-9 phôi bào với  $\leq 15\%$  mảnh vụn nằm tập trung thì \*khi có 3 yếu tố số tế bào  $\geq 10$ , mảnh vụn  $> 15\%$  rải rác tác động kết hợp làm tăng nguy cơ LBNST lên 2,3 lần; 3 yếu tố này khi kết hợp là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST có giá trị cao với LR<sup>(+)</sup> = 5,61 và LR<sup>(-)</sup> = 0,8; \* khi 3 yếu tố số phôi bào  $\leq 6$ , mảnh vụn  $> 15\%$  rải rác tác động kết hợp làm



tăng nguy cơ LBNST lên 2,5 lần; 3 yếu tố này kết hợp là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBT có giá trị cao với  $LR^{(+)} = 7,5$  và  $LR^{(-)} = 0,63$ .

Trong tổng số 1257 phôi được xét nghiệm a-CGH, có 719 phôi không đúng tiêu chuẩn phân tích trong bảng dưới bao gồm: 289 phôi có  $\geq 10$  phôi bào với 0-30% mảnh vụn nằm tập trung và  $\geq 10$  phôi bào với 0-5% mảnh vụn nằm rải rác; 74 phôi có 7-9 phôi bào với  $> 5\%$  mảnh vụn tập trung; 448 phôi có 7-9 phôi bào với 0-30% mảnh vụn rải rác; 37 phôi có  $\leq 6$  phôi bào với 0-30% mảnh vụn tập trung; và 7 phôi có  $\leq 6$  phôi bào với  $\leq 5\%$  mảnh vụn rải rác. Còn lại 538 phôi đúng tiêu chuẩn được phân tích ở bảng 3.33 dưới đây.

**Bảng 3.33:** Phôi phát triển nhanh/chậm, mảnh vụn  $>5\%$  phân bố rải rác và LBNST.

3 Yếu tố	LBNST		Bình thường		Cộng	RR	LR <sup>(+)</sup>	LR <sup>(-)</sup>
	Số phôi	%	Số phôi	%				
$\geq 10$ phôi bào MV $>5\%$ Rải rác	99	<b>72,8<sup>a</sup></b>	37	27,2	136	2	2,84	0,6
7-9 phôi bào MV $\leq 5\%$ Tập trung	97	<b>36,2<sup>b</sup></b>	171	63,8	268	1		
$\leq 6$ phôi bào MV $>5\%$ Rải rác	116	<b>86,6<sup>c</sup></b>	18	13,4	134	2,4	5,74	0,5
Cộng	312		226		538			

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

**Nhận xét:** Khi so sánh với phôi có 7-9 phôi bào có  $\leq 5\%$  mảnh vụn nằm tập trung thì \*khi 3 yếu tố số phôi bào  $\geq 10$ , mảnh vụn  $>5\%$  rải rác tác động kết hợp làm tăng nguy cơ LBNST lên 2,0 lần; 3 yếu tố này khi kết hợp là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST có giá trị trung bình với  $LR^{(+)} = 2,84$  và  $LR^{(-)} = 0,6$ ; \*khi có 3 yếu tố số phôi bào  $\leq 6$ , mảnh vụn  $>5\%$  rải rác tác động kết hợp

làm tăng nguy cơ lệch bội thể lên 2,4 lần; 3 yếu tố này khi kết hợp là chỉ báo trong tiên lượng phôi LBNST có giá trị cao với  $LR^{(+)} = 5,74$  và  $LR^{(-)} = 0,5$ .

Tóm lại, phân tích các yếu tố liên quan với LBNST sẽ xác định được nguy cơ có liên quan đến LBNST, nhưng nếu chỉ dựa vào phân tích đơn biến để xác định nguy cơ tương đối (RR) sẽ chưa phù hợp với thực tế lâm sàng. Khả năng phối hợp các nguy cơ (các nguy cơ cộng đồng tác động) là thường gặp nên phân tích đa biến trên sẽ xác định RR gần sát thực tế hơn, xác định được mức độ giá trị của từng chỉ báo, của các chỉ báo kết hợp để chọn lọc ứng dụng trong dự đoán phôi bị LBNST góp phần xử trí lâm sàng được kịp thời và chính xác.

Sau đây là bảng tóm tắt về giá trị của một số chỉ báo dự đoán LBNST của phôi qua phân tích nguy cơ tương đối (RR) và tỷ số khả năng (LR).

**Bảng 3.34:** Các yếu tố chỉ báo (CB) có giá trị dự đoán LBNST của phôi xếp từ cao xuống thấp.

CB có giá trị dự báo	Chỉ báo hiện diện	Cơ sở khoa học để chứng minh	$LR^{(+)}$	$LR^{(-)}$	RR so với nhóm chứng
1	Phôi phát triển nhanh $\geq 10$ PB Tế bào phôi không đều Mảnh vụn $> 15\%$	Phân tích đa biến xác định LR, RR	12	0,88	2,3
2	Phôi phát triển chậm $\leq 4-6$ PB Tuổi mẹ $> 40$	Phân tích đa biến xác định LR, RR	8,75	0,88	2,03
3	Tuổi mẹ $> 40$	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	8,5	0,74	1,85
4	Phôi phát triển chậm 4-6 PB Mảnh vụn $> 15\%$ Mảnh vụn nằm rải rác	Phân tích đa biến xác định LR, RR	7,5	0,63	2,5
5	Phôi phát triển chậm 4-6 PB Tuổi mẹ 35-40	Phân tích đa biến xác định LR, RR	6,75	0,88	2,0

<b>CB có giá trị dự báo</b>	<b>Chỉ báo hiện diện</b>	<b>Cơ sở khoa học để chứng minh</b>	<b>LR<sup>(+)</sup></b>	<b>LR<sup>(-)</sup></b>	<b>RR so với nhóm chứng</b>
6	Phôi phát triển chậm 4-6 PB Tế bào phôi không đều Mảnh vụn >15%	Phân tích đa biến xác định LR, RR	6,75	0,76	2,2
7	Phôi ngừng phát triển thành phôi nang ngày 5	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	6,58	0,16	4,2
8	Chất lượng mầm phôi (ICM) kém loại C-D	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	6	0,57	2,74
9	Phôi phát triển chậm 4-6 PB Mảnh vụn >5% Mảnh vụn nằm rải rác	Phân tích đa biến xác định LR, RR	5,74	0,5	2,4
10	Phôi phát triển chậm 4-6 PB Tế bào phôi không đều Mảnh vụn >5%	Phân tích đa biến xác định LR, RR	5,7	0,57	2,3
11	Phôi phát triển nhanh $\geq 10$ PB Mảnh vụn >15% Mảnh vụn nằm rải rác	Phân tích đa biến xác định LR, RR	5,61	0,8	2,3
12	Phôi phát triển chậm: phôi dâu ngày 5	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	5,6	0,37	3,7
13	Phôi phát triển chậm 4-6 PB Mảnh vụn trung bình 6-15%	Phân tích đa biến xác định LR, RR	5,4	0,83	1,75
14	Tế bào phôi không đều Mảnh vụn >15%	Phân tích đa biến xác định LR, RR	5,36	0,66	1,98
15	Phôi phát triển nhanh $\geq 10$ PB Tế bào phôi không đều Mảnh vụn >5%	Phân tích đa biến xác định LR, RR	4,5	0,66	2,1
16	Chất lượng phôi nang kém (BC,CB,CC, DC)	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	4,3	0,53	2,53

<b>CB có giá trị dự báo</b>	<b>Chỉ báo hiện diện</b>	<b>Cơ sở khoa học để chứng minh</b>	<b>LR<sup>(+)</sup></b>	<b>LR<sup>(-)</sup></b>	<b>RR so với nhóm chứng</b>
17	Phôi phát triển chậm 4-6 PB Mảnh vụn nhiều 16-30%	Phân tích đa biến xác định LR, RR	3,5	0,78	1,65
18	Phôi phát triển chậm (4-6 PB) ngày 3	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	3,1	0,82	1,48
19	Tế bào phôi không đều Mảnh vụn >5%	Phân tích đa biến xác định LR, RR	2,92	0,42	1,93
20	Phôi phát triển nhanh $\geq 10$ PB Mảnh vụn nhiều (16-30%)	Phân tích đa biến xác định LR, RR	2,86	0,91	1,52
21	Phôi phát triển nhanh $\geq 10$ PB Mảnh vụn >5% Mảnh vụn nằm rải rác	Phân tích đa biến xác định LR, RR	2,84	0,6	2
22	Phôi bào kích thước không đều	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	2,69	0,48	1,85
23	Chất lượng nguyên bào lá nuôi (TE) kém loại C	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	2,69	0,41	2,1
24	Phát triển chậm thành phôi nang ngày 6	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	2,52	0,51	2,3
25	Phôi phát triển nhanh $\geq 10$ PB Tuổi mẹ 35-40	Phân tích đa biến xác định LR, RR	2,5	0,8	1,6
26	Phôi chậm ngừng phát triển thành phôi nang	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	2,1	0,48	1,75
27	Phôi nang giai đoạn 2 vào ngày 5	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	2,04	0,73	2
28	Mảnh vụn rải rác	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	2	0,39	1,94
29	Mảnh vụn 16-30%	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	1,96	0,77	1,39

<b>CB có giá trị dự báo</b>	<b>Chỉ báo hiện diện</b>	<b>Cơ sở khoa học để chứng minh</b>	<b>LR<sup>(+)</sup></b>	<b>LR<sup>(-)</sup></b>	<b>RR so với nhóm chứng</b>
30	FSH >15 mIU/ml	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	1,93	0,93	1,3
31	Phôi nang giai đoạn 3-4 vào ngày 5	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	1,8	0,85	1,7
32	Tuổi mẹ 35-40	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	1,7	0,69	1,42
33	Phôi phát triển nhanh $\geq 10$ PB Mảnh vụn trung bình (6-15%)	Phân tích đa biến xác định LR, RR	1,67	0,88	1,29
34	Phôi phát triển chậm: phôi nang sớm (giai đoạn1) vào ngày 5	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	1,67	0,27	2,9
35	Phôi phát triển nhanh ( $\geq 10$ PB)	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	1,35	0,9	1,17
36	Chất lượng mầm phôi (ICM) loại trung bình	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	1,34	0,66	1,57
37	Mảnh vụn 6-15%	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	1,33	0,82	1,21
38	Chất lượng phôi nang trung bình (BB)	Phân tích đơn biến xác định LR, RR	1,25	0,81	1,32

**Nhận xét:** Từ bảng trên thấy phân tích đa biến có hiệu quả chọn lọc chỉ báo có giá trị tuy nhiên qua phân tích đơn biến chỉ cần 1 chỉ báo: tuổi mẹ >40, phôi chậm phát triển ở ngày 3, phôi ngừng chậm phát triển thành phôi nang, chất lượng phôi nang kém cũng có giá trị dự đoán LBNST cao.

## Chương 4

### BÀN LUẬN

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

##### 4.1.1. Bàn luận về 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 phôi về sau:

*- Quan điểm cho rằng sinh thiết phôi bào không ảnh hưởng đến phôi*

Việc sinh thiết một phôi bào mà không làm tổn thương đến phôi là một kỹ thuật khó và đòi hỏi kinh nghiệm. Tuy nhiên khả năng này vẫn có thể xảy ra khoảng 0,1%. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh là sinh thiết một phôi bào của phôi ngày 3 không ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi đến giai đoạn phôi nang [122],[123],[124].

Trong một nghiên cứu gần đây năm 2013 của Nguyễn Ngọc Diệp và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu đánh giá thay đổi hình thái của 30 phôi ngày 3 sau sinh thiết 1 phôi bào thấy là tỷ lệ mảnh vụn tế bào, tỷ lệ phôi sống sót, tỷ lệ phát triển thành phôi nang, đường kính phôi và độ dày màng trong suốt thay đổi không có ý nghĩa thống kê so với nhóm phôi không sinh thiết [125],[126].

Sinh thiết phôi ngày 3 cho phép các nhà di truyền học có 2-3 ngày để phân tích đánh giá nhiễm sắc thể của phôi và có kết quả trước khi chuyển phôi tươi.

*- Quan điểm cho rằng sinh thiết phôi bào có ảnh hưởng đến phôi ít hoặc nhiều.*

Nghiên cứu của Scott và cộng sự nêu rằng sinh thiết phôi ngày 3 ảnh hưởng đến sự làm tổ của phôi trong khi sinh thiết phôi nang thì không ảnh hưởng [127].

Khoảng 7-10% phôi bào sinh thiết ra nhưng không đem lại kết quả di truyền do phôi bào không có nhân nguyên vẹn, hoặc DNA trong nhân bị phân rã do phôi đang trong giai đoạn ngừng phát triển. Đôi khi, có thể do phôi bào không được chuyển vào ống PCR hoặc phôi bào không có nhân [41].

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng phôi ở giai đoạn phân chia có tỷ lệ phôi thể khảm cao, đồng thời phôi thể khảm có một số lượng nhỏ phôi bào bất thường trong phôi vẫn có khả năng phát triển bình thường (xem phần 1.3). Tuy nhiên cho đến nay chưa chứng minh được phôi cần có bao nhiêu phôi bào có số lượng nhiễm sắc thể bình thường để có thể phát triển thành đứa trẻ sinh ra khỏe mạnh vì vậy chẩn đoán chỉ dựa vào việc phân tích một phôi bào không đại diện cho toàn bộ phôi do vậy chẩn đoán không hoàn toàn đáng tin cậy. Một điểm cần chú ý là ảnh hưởng của việc sinh thiết phôi. Do việc lấy ra một hay nhiều phôi bào sẽ ảnh hưởng tới thành phần các phôi bào bình thường, bất thường ở phôi thể khảm. Khi 2 phôi bào được lấy ra, thường 2 phôi bào nằm cạnh nhau được hút ra. Vì vậy việc sinh thiết không phải là ngẫu nhiên, rất có thể khả năng lấy ra phôi bào có thừa hay thiếu nhiễm sắc thể tương ứng là 25%. Baart và cộng sự thấy rằng sinh thiết 2 phôi bào có thể tạo nên phôi bình thường vào ngày 5. Sự phát triển của phôi thể khảm hoàn toàn phụ thuộc vào thành phần của phôi bào bình thường [29]. Nhiều tác giả đưa ra giả thuyết là phôi với <50% phôi bào bình thường thường không thể sống sót qua giai đoạn làm tổ, nhưng giả thuyết này chưa được chứng minh cụ thể [68].

*\* Sinh thiết phôi nang.*

Ở giai đoạn phôi nang, 2-9 nguyên bào lá nuôi được đánh giá nên nhiều chất liệu di truyền hơn so với 1 phôi bào ngày 3 nên kết quả chính xác hơn.

Sinh thiết phôi nang an toàn hơn so với sinh thiết phôi ngày 3 do một lượng nhỏ trong tổng số phôi bào được lấy ra. Ví dụ như 1 phôi bào được sinh

thiết từ phôi có 8 phôi bào (chiếm khoản 13% tổng số phôi), trong khi trung bình khoảng 5 nguyên bào lá nuôi được sinh thiết (chiếm khoảng 2-3% tổng số khoảng 200 phôi bào của phôi nang phát triển).

Phôi nang có khả năng chịu được những thao tác trong quá trình sinh thiết hơn do đã trải qua quá trình hoạt hóa phôi [127].

Phôi có khả năng sống phát triển với tốc độ bình thường thành phôi nang có khả năng tự sửa chữa lệch bội nhiễm sắc thể. Hơn nữa, phôi có khả năng tự sửa chữa cao có thể đuổi kịp các phôi bình thường với tốc độ phát triển bình thường. Phôi tam thể có khả năng tự sửa chữa cao hơn các dạng khác có thể do cơ chế hồi phục thể tam nhiễm.

Hạn chế của việc sinh thiết phôi nang là sự khác nhau về thành phần phôi bào trong phôi nang. Phôi nang có 2 phần chính là mầm phôi (ICM) và nguyên bào lá nuôi (TE). Mầm phôi bao gồm các phôi bào sẽ phát triển thành tổ chức thai sau này và nguyên bào lá nuôi gồm các phôi bào sẽ phát triển thành rau thai. Sinh thiết phôi nang chỉ lấy các nguyên bào lá nuôi nhằm giảm thương tổn cho mầm phôi. Mặc dù nhiều nghiên cứu cho rằng thành phần phôi bào của mầm phôi và nguyên bào lá nuôi có độ đồng nhất cao nhưng một số tác giả chứng minh là khoảng 10% phôi nang có lệch bội nhiễm sắc thể ở nguyên bào lá nuôi nhưng không có ở mầm phôi hay ngược lại [128]. Vì vậy, sinh thiết nguyên bào lá nuôi vẫn không hoàn toàn đại diện cho toàn bộ phôi nang. Hiện tượng phôi thể khảm vẫn xuất hiện ở phôi nang tuy nhiên nhiều nghiên cứu gần đây cho rằng tỷ lệ phôi thể khảm ở phôi nang giảm nhiều so với phôi ở giai đoạn phân chia [129]. Với tiến bộ về kỹ thuật phân tích di truyền hiện nay có thể phát hiện được hầu hết phôi thể khảm nhưng nếu thể khảm ở mức độ ít thì không phát hiện được.

Một điểm hạn chế nữa của sinh thiết phôi nang là ở những trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm không có trung tâm phân tích di truyền tại chỗ thì



phôi sau khi sinh thiết thường phải đông và chuyển vào chu kỳ chuyển phôi đông lạnh. Trong trường hợp này các nhà lâm sàng cần phải cân nhắc về ảnh hưởng của quá trình đông lạnh và tan đông cũng như ảnh hưởng nếu chuyển phôi vào buồng tử cung quá muộn khi nội mạc tử cung ở giai đoạn quá mãn (hyperstimulated endometrium).

#### ***4.1.2. Bàn luận về phương pháp a-CGH.***

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng một phương pháp di truyền học phân tử mới gọi là phương pháp lai so sánh bộ gen dùng chip DNA (Array – comparative genomic hybridization/a-CGH) để tiến hành phân tích nhiễm sắc thể của phôi ngày 3 sau thụ tinh trong ống nghiệm.

##### ***\* Ưu điểm của phương pháp a-CGH.***

Ưu điểm nổi bật của kỹ thuật a-CGH là khả năng đánh giá trên toàn bộ 46 nhiễm sắc thể. Chỉ trong một xét nghiệm duy nhất có thể phát hiện các bất thường của nhiễm sắc thể bao gồm: lệch bội nhiễm sắc thể, mất hoặc nhân đoạn của nhiễm sắc thể có độ chính xác hơn nhiều so với phương pháp FISH (chỉ đánh giá tối đa 12 cặp nhiễm sắc thể).

Kỹ thuật a-CGH cho phép phát hiện các bất thường của nhiễm sắc thể ngay cả khi không có định hướng trong chẩn đoán, đây cũng là một ưu thế của a-CGH so với kỹ thuật FISH hay PCR.

A-CGH cũng phát hiện được các trường hợp phôi thể khảm, tuy nhiên sự chính xác trong chẩn đoán còn phụ thuộc vào tỷ lệ giữa dòng phôi bào bình thường và phôi bào bị rối loạn nhiễm sắc thể.

Một ưu điểm khác của a-CGH là có thể thực hiện trên một phôi bào và hoàn toàn tự động hóa nhờ đó giảm thiểu được thời gian xét nghiệm và tăng mức độ chính xác của chẩn đoán.

Các ưu điểm trên đã làm tăng giá trị của kỹ thuật a-CGH, là một trong số ít những kỹ thuật hiệu quả nhất trong chẩn đoán phôi trước làm tổ.

*\* Hạn chế của phương pháp a-CGH.*

Xuất phát từ nguyên tắc của kỹ thuật, hạn chế của a-CGH là không thể phát hiện các trường hợp bất thường trong cấu trúc của nhiễm sắc thể ở dạng cân bằng như chuyển đoạn tương hỗ cân bằng và đảo đoạn do các bất thường trên không xảy ra tình trạng thừa hay thiếu vật liệu di truyền.

A-CGH không thể phát hiện được các trường hợp phôi thể khảm có tỷ lệ thấp hơn 25% [130].

Một số loại a-CGH không cho phép phát hiện được một số đa bội như tam bội (triploid) (69,XXX); tứ bội (tetraploidies) (92,XXXX hay 92,XXYY) nhưng có thể phát hiện 69,XXY và 92,XXXYY hay 92,XYYY. Tuy nhiên những phôi này thường có thêm những bất thường có thể phát hiện được bằng a-CGH, chỉ 1,7% phôi đa bội đồng nhất (ví dụ: 69,XXX hay 92,XXYY) không phát hiện được bằng a-CGH. Hơn nữa 87% những phôi này ngừng phát triển hay có bất thường về hình thái và không được chọn để chuyển phôi [41].

Thời gian để tiến hành xét nghiệm và phân tích 14-24 giờ, vì vậy trong một số trường hợp sinh thiết phôi nang, cần phải đông phôi và tiến hành chuyển phôi đông lạnh.

Một hạn chế nữa của kỹ thuật a-CGH là giá xét nghiệm khá cao nên khó có thể thực hiện chỉ định rộng rãi kỹ thuật này cho mọi đối tượng.

Tóm lại, cho dù các kỹ thuật chuẩn đoán di truyền có phát triển đến đâu vẫn không thể chẩn đoán chính xác 100% tình trạng nhiễm sắc thể của phôi. Tuy nhiên, sàng lọc phôi trước làm tổ vẫn đem lại những chỉ số về chất lượng của phôi, và vì vậy đóng góp vào việc tăng hiệu quả điều trị thụ tinh trong ống nghiệm [129]. Với những hạn chế trên, bệnh nhân cần được tư vấn kỹ về nguy cơ cũng như những mặt hạn chế của kỹ thuật sàng lọc phôi trước làm tổ. Đồng thời, kỹ thuật sàng lọc trước sinh vẫn được khuyến cáo cho các bệnh nhân sử dụng sàng lọc tiền làm tổ.

#### **4.2. Bàn luận về tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể của phôi ngày 3.**

Sau khi thụ tinh, phôi thường được nuôi cấy thêm khoảng 3 ngày (giai đoạn phân chia) đến 5-6 ngày (giai đoạn phôi nang). Trên 50% phôi tạo ra trong ống nghiệm ở giai đoạn phân chia bị lệch bội nhiễm sắc thể, tỷ lệ này tăng lên đến trên 80% ở phụ nữ trên 42 tuổi [46],[47],[48],[49]. 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 cũng tăng cùng với tuổi mẹ [52],[54],[131].

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 62,3% (783/1257), phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho là phôi người trước khi làm tổ có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể khá cao [41],[46],[131],[132] (hình3.1). Tỷ lệ này cao hơn so với một số nghiên cứu khác như trong nghiên cứu của Rubio và cộng sự năm 2013, sử dụng phương pháp FISH với 9 đầu dò cho nhiễm sắc thể 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, và XY để nghiên cứu 265 phôi ngày 3 của 91 bệnh nhân có tiền sử phôi không làm tổ liên tiếp. Tác giả thấy rằng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 57,3% [48]. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở nghiên cứu của Rubio thấp hơn ở nghiên cứu này là do tác giả sử dụng phương pháp FISH, chỉ đánh giá 9 cặp nhiễm sắc thể nên đã bỏ sót nhiều cặp nhiễm sắc thể không được kiểm tra. Hậu quả là nhiều phôi bị chẩn đoán sai, bị lệch bội nhiễm sắc thể nhưng lại được coi là bình thường. Trong nghiên cứu này sử dụng phương pháp a-CGH đánh giá toàn bộ 23 cặp nhiễm sắc thể của phôi nên tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng hơn là hợp lý. Nguyên nhân chính gây nên tình trạng phôi không làm tổ liên tiếp trong nghiên cứu của Rubio là do chuyển các phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể mà không được phát hiện do nguyên nhân đã nêu trên. Trong một nghiên cứu khác của Rubio và cộng sự năm 2013, sử dụng phương pháp a-CGH giống như trong nghiên cứu này đã

nêu tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể nói chung là 73,5% cao hơn so với nghiên cứu của chúng tôi do đối tượng nghiên cứu của tác giả là phôi của các bệnh nhân bị sảy thai liên tiếp, phôi không làm tổ liên tiếp, vô sinh nam và phụ nữ lớn tuổi thuộc nhóm có nguy cơ bị lệch bội nhiễm sắc thể cao [49].

Năm 2012, Rabinowitz và cộng sự sử dụng phương pháp a-SNP, một phương pháp di truyền phân tử khác cũng cho phép đánh giá toàn bộ 23 cặp nhiễm sắc thể của phôi cũng thấy rằng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi ngày 3 nói chung là rất cao 72,3% [47]. Tỷ lệ này cao hơn so với nghiên cứu này là do các tác giả này đánh giá phôi của nhóm bệnh nhân có tuổi trung bình 38 (26-47 tuổi) cao hơn nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi có tuổi trung bình là 34,5 (18-45 tuổi).

Kết quả của nghiên cứu này thấy rằng các cặp nhiễm sắc thể của phôi ngày 3 đều có nguy cơ bị lệch bội nhiễm sắc thể. Trong một phôi, hiện tượng lệch bội nhiễm sắc thể có thể xảy ra ở 1 cặp nhiễm sắc thể với tần số 29,5% (231/783), hoặc ở 2 cặp nhiễm sắc thể với tần số 16,2% (127/783), hay ở 3 cặp nhiễm sắc thể với tần số 5,7% (45/783), hay thậm chí lệch bội thể có thể xảy ra ở  $\geq 4$  cặp nhiễm sắc thể trong một phôi hay còn gọi là lệch bội nhiễm sắc thể thể phức tạp với tần số 48,5% (380/783) (hình 3.2). Traversa và cộng sự năm 2011, nghiên cứu trên phôi nang thấy số phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể thấp hơn ở phôi ngày 3 (43%). Khi đánh giá mức độ lệch bội nhiễm sắc thể thì họ thấy lệch bội ở một cặp nhiễm sắc thể là cao nhất (55%) sau đó là lệch bội 2 cặp nhiễm sắc thể (41%), lệch bội ở 3 cặp nhiễm sắc thể trở lên chỉ chiếm 7% [54]. Sự khác biệt về tỷ lệ cũng như mức độ lệch bội nhiễm sắc thể giữa phôi ngày 3 và ngày 5 có thể là do phôi lệch bội nhiễm sắc thể thể phức tạp thường bị ngừng phát triển trước khi phát triển thành phôi nang, đúng vào thời điểm mà Traversa chọn phôi nghiên cứu.

Khả năng sàng lọc các bất thường của 23 cặp nhiễm sắc thể có lợi thế hơn phương pháp FISH vì đã thấy tất cả các nhiễm sắc thể đều có thể bị lệch bội và lệch bội hay gặp nhất ở các cặp nhiễm sắc thể 22, 19, 16, 15, 21, XY, 9, 13, 18 (với tần suất >3%), đây cũng là sai lệch nhiễm sắc thể liên quan đến thai bất thường có thể phát hiện được trong thời gian mang thai. Kết quả này phù hợp với kết quả của Al-Asma và cộng sự 2012 và Rubio và cộng sự năm 2013 sử dụng phương pháp FISH 9 đầu dò (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, XY) [46],[48]. Trong nghiên cứu của Rubio và cộng sự năm 2013, các nhiễm sắc thể bị ảnh hưởng nhiều nhất đối với cả bệnh nhân có phôi không làm tổ liên tiếp và bệnh nhân lớn tuổi là nhiễm sắc thể 22 và 16 sau đó là nhiễm sắc thể 13, 21, 18, XY, 15, 17 cho nhóm bệnh nhân bị phôi không làm tổ liên tiếp và 21, 15, 13, 18, 17 và XY ở nhóm bệnh nhân lớn tuổi [48]. Trong nghiên cứu của Al-Asma và cộng sự năm 2012, thấy các nhiễm sắc thể bị lệch bội nhiều nhất cũng là nhiễm sắc thể 22 và 16 cho nhóm bệnh nhân có tiền sử sảy thai (thai tự nhiên hay thai tạo ra trong thụ tinh ống nghiệm) [46]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi (bảng 3.4) cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Guitierrez và cộng sự năm 2011, sử dụng phương pháp a-CGH thấy lệch bội ở tất cả các cặp nhiễm sắc thể và nhiễm sắc thể hay bị lệch bội là 16, 22, 21 và 15 [41]. Franasiak và cộng sự năm 2014, sử dụng phương pháp RT-PCR và SNP, cũng đánh giá 23 cặp nhiễm sắc thể của phôi nang thấy là nhiễm sắc thể hay bị lệch bội nhất cũng là 13, 15, 16, 18, 19, 21 và 22 [133].

#### **4.3. Bàn luận về khả năng tự sửa chữa của phôi lệch bội nhiễm sắc thể.**

Phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể là kết quả của việc thụ tinh giữa noãn hay tinh trùng bị lệch bội nhiễm sắc thể do sai sót trong quá trình giảm phân hoặc do những sai sót tại chỗ trong quá trình phân bào nguyên nhiễm xảy ra sau khi thụ tinh. Những sai sót trong quá trình giảm phân thường dẫn tới hình thành phôi lệch bội nhiễm sắc thể đồng nhất, trong khi những sai sót trong

phân bào nguyên nhiễm thường dẫn tới phôi bị thể khảm. Sàng lọc phôi trước làm tổ sẽ phát hiện những bất thường nhiễm sắc thể xảy ra trước hay sau khi thụ tinh. Tuy nhiên, kết quả chỉ dựa vào sự phân tích 1 hay 2 phôi bào không phản ánh đúng tình trạng nhiễm sắc thể của cả phôi sẽ làm tổ trong 3-4 ngày sau đó. Các nghiên cứu trước đây cho là qua quá trình nuôi cấy tới giai đoạn phôi nang, phôi có thể tự sửa chữa. Vì lý do này mà Hiệp hội chẩn đoán phôi trước làm tổ (PGD Consortium) đã khuyến cáo rằng phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3 nên được sinh thiết và phân tích lại vào ngày 5-6 [134]. Một số nghiên cứu sau đó tiến hành lại FISH trên phôi ngày 5 và công bố là thành phần nhiễm sắc thể của phôi có thể thay đổi trong giai đoạn đầu phân chia [58],[60],[68]. Thực vậy một số phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3 có thể phát triển thành phôi bình thường hay phôi có số lượng phôi bào bình thường tăng lên góp phần hình thành phôi nang. Một số nghiên cứu khác lại cho rằng những phôi này sẽ có thêm những bất thường khác [58],[68].

Nghiên cứu của Barbash-Hazan và cộng sự cho rằng có mối liên quan giữa sự phát triển của phôi và khả năng tự sửa chữa. Trong nghiên cứu này ông đã kết hợp phôi có trên 50% phôi bào tự sửa chữa và phôi tự sửa chữa hoàn toàn với lý do là khi có ít nhất 2/3 phôi bào ở phôi thể khảm là bình thường thì phôi đó có thể phát triển thành phôi nang và sinh ra thai sống [60]. Vì vậy, mặc dù phôi thể khảm là hiện tượng khá phổ biến ở phôi giai đoạn trước làm tổ, nhưng sự chọn lọc tự nhiên có thể loại bỏ ở những giai đoạn phát triển sau này. Peura và cộng sự thấy là tế bào gốc của phôi lệch bội nhiễm sắc thể hầu như là bình thường, điều này gợi ý là hiện tượng lệch bội nhiễm sắc thể không phải là vĩnh cửu [135].

Thống nhất với kết luận của các nghiên cứu sử dụng phương pháp FISH, trong nghiên cứu này của chúng tôi đã sử dụng phương pháp a-CGH để đánh giá liệu kết quả phân tích một phôi bào ngày 3 có hoàn toàn đại diện cho

phôi khi phát triển đến giai đoạn phôi nang, chúng tôi thấy là trong số 112 phôi ngày 3 bị lệch bội nhiễm sắc thể phát triển thành phôi nang, có 29,5% cho kết quả bình thường sau sinh thiết lại (bảng 3.6). Tỷ lệ này thấp hơn trong nghiên cứu của Li và cộng sự khi họ thấy tỷ lệ phôi tự sửa chữa là 40% [58], hay nghiên cứu của Munne và cộng sự khi tỷ lệ tự sửa chữa rất cao gần 70% [68]. Giải thích cho sự khác nhau này là trong nghiên cứu của Li và Munne sử dụng FISH 5-9 đầu dò nên tỷ lệ âm tính giả cao, một số phôi bất thường ở các nhiễm sắc thể 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 trước làm tổ và hiện tượng phục hồi thể ba nhiễm (trisomy rescue):

*Cơ chế thể khảm cao ở phôi trước làm tổ.*

Cơ chế phổ biến tạo ra phôi thể khảm là do thừa, thiếu nhiễm sắc thể hay hiện tượng không phân ly nhiễm sắc thể trong phân bào nguyên nhiễm [31]. Không phân ly trong phân bào nguyên nhiễm khi nhiễm sắc tử chị em (sister chromatids) không phân ly hoàn toàn dẫn đến tạo ra một phôi bào có thừa nhiễm sắc thể và một phôi bào thiếu nhiễm sắc thể tương ứng.

Chậm trễ kỳ sau (anaphase lagging) xảy ra khi một nhiễm sắc tử (chromatid) không gắn với thoi phân bào do sự chậm chễ (delayed movement) trong kỳ cuối và bị mất đi, dẫn tới tạo một phôi bào con có số lượng nhiễm sắc thể bình thường và một phôi bào con mất đi nhiễm sắc thể bị chậm chễ đó.

Hiện tượng nhân lên nội sinh (endoreduplication) xảy ra khi một nhiễm sắc tử ở cuối giai đoạn S (S-phase) của chu kỳ tế bào nhân đôi tạo nên sự có mặt của 3 nhiễm sắc tử. Tiếp theo giai đoạn phôi bào phân chia, một phôi bào sẽ là lưỡng bội (disomy) và một phôi bào là thể tam nhiễm (trisomy) [136].

Hiện tượng này giải thích khi một phôi bào con là thể tam nhiễm (trisomy) trong khi phôi bào con thứ hai không bị thiếu hụt nhiễm sắc thể tương ứng.

Điều kiện nuôi cấy có thể làm tăng xảy ra sai sót phân bào ở phôi tạo ra trong ống nghiệm [79]. Thể khảm được phát hiện ở khoảng 1-2% mẫu sinh thiết gai rau ở thai 3 tháng đầu [137]. Một số trường hợp thể khảm chỉ xảy ra ở rau thai sẽ trải qua quá trình tự sửa chữa [137]. Đến giai đoạn 3 tháng giữa của thai, thể khảm của rau và thai chỉ thấy ở 0,1%-0,4% thai sống, phát hiện bằng phương pháp chọc ối [138].

Một số nghiên cứu cho là phôi bào bình thường thường tập trung hình thành mầm phôi trong khi phôi bào lệch bội nhiễm sắc thể tập trung ở nguyên bào lá nuôi [31]. Một số nghiên cứu khác lại cho rằng ở phôi nang, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở mầm phôi và nguyên bào lá nuôi là như nhau [139]. Khi phôi thể khảm có phôi bào lưỡng bội (disomic cells), những phôi bào này sẽ phát triển khác với các phôi bào bất thường và sự khác nhau về mặt phân chia giữa phôi bào lưỡng bội và phôi bào lệch bội nhiễm sắc thể sẽ tạo nên phôi có nhiều phôi bào lưỡng bội đặc biệt trong giai đoạn phát triển đến phôi nang [68]. Hơn nữa, bộ gen của phôi chưa hoàn toàn hoạt hóa ở chu kỳ phân bào thứ 3 [61] nên những chất liệu sao chép từ mẹ cần thiết cho kiểm soát chu kỳ tế bào bị thiếu hụt dẫn đến sai lệch về nhiễm sắc thể. Cho đến khi bộ gen của phôi được hoạt hóa, cơ chế chết theo chương trình tế bào (apoptosis) và các điểm kiểm soát chu kỳ tế bào được hoạt hóa sẽ tránh những sai sót trong các chu kỳ phân bào nguyên nhiễm của phôi bào tiếp theo, các phôi bào bất thường bị loại bỏ, giảm số lượng phôi bào bất thường ở giai đoạn phôi nang.

#### *Cơ chế phục hồi thể tam nhiễm.*

Cơ chế thứ hai giải thích hiện tượng phôi tự sửa chữa là hiện tượng phục hồi thể tam nhiễm (trisomy rescue), qua 3 cách sau: (1) sự chậm trễ của kỳ sau (anaphase-lag), (2) không phân ly hay (3) nhiễm sắc thể bị phá hủy. Sự



sửa chữa theo cơ chế chậm trễ kỳ sau sẽ tạo nên 1 phôi bào lưỡng thể (disomy) và một phôi bào thể tam nhiễm (trisomy). Sự sửa chữa theo cơ chế không phân ly sẽ tạo ra 1 phôi bào lưỡng thể sống (viable disomic cell) và 1 phôi bào tứ thể chết (lethal tetrasomic cell), trong trường hợp này, số lượng phôi bào sẽ giảm, làm giảm sự phát triển bình thường. Sự sửa chữa theo cách nhiễm sắc thể bị phá hủy do một trong 3 nhiễm sắc thể bị vỡ trong giai đoạn biến kỳ (metaphase) hay kỳ sau (anaphase), tạo nên 2 phôi bào con lưỡng thể.

Sự chậm trễ trong kỳ sau của quá trình phân bào hay nhiễm sắc thể không phân ly trong giai đoạn đầu phân chia là cơ chế được nghiên cứu nhiều nhất đã được Munne và cộng sự nêu ra năm 2005, đây là cơ chế phát sinh các bất thường về số lượng nhiễm sắc thể [68]. Trong nghiên cứu của Barbash-Hazan và cộng sự, nghiên cứu 83 phôi có bất thường về nhiễm sắc thể ngày 3, trong đó 26,5% phôi có thể tam nhiễm (trisomy) ngày 3. Trong số phôi có thể tam nhiễm, 41% trải qua tự sửa chữa (trên 50% phôi bào bình thường ở phôi giai đoạn phôi nang), tác giả giải thích hiện tượng này có thể do cơ chế hồi phục thể tam nhiễm [60]. Rubio và cộng sự cho rằng phôi có thể tam nhiễm thường phát triển thành phôi nang cao hơn các bất thường lệch bội nhiễm sắc thể khác [140].

Một điều thú vị chưa được nêu lên trong các nghiên cứu trước đây là chúng tôi thấy phôi lệch bội nhiễm sắc thể 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 (bảng 3.7). Nguyên nhân phụ nữ lớn tuổi khả năng tự sửa chữa kém là do ở nhóm này tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể 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 [141]. Theo Fragouli và cộng sự năm 2011, 30% phôi bị ảnh hưởng có nguồn gốc từ phân bào giảm phân. [56]. Theo Hanson và cộng sự khi phân tích chẩn đoán lại phôi lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3 ở phụ nữ trên 37 tuổi sử dụng phương

pháp FISH thấy là ở phụ nữ lớn tuổi phôi có 1 phôi bào bất thường thì có nguy cơ cao các phôi bào khác có bất thường như vậy hay có những bất thường khác [142]. Vì vậy, sàng lọc trước làm tổ dường như thành công trong việc chọn lựa phôi có bất thường về nhiễm sắc thể ở nhóm phụ nữ lớn tuổi. Các bất thường có nguồn gốc từ phân bào giảm phân dẫn lệch bội nhiễm sắc thể đồng nhất và thể khảm phức tạp gây nên không có dòng phôi bào bình thường trong nhóm này [67]. Theo Delhanty và cộng sự 2005 thì nguyên nhân chủ yếu gây thể khảm lệch bội nhiễm sắc thể (aneuploidy mosaics) là do nhiễm sắc thể mất, tiếp theo đó là nhiễm sắc thể thừa do không phân ly trong phân bào và đều có liên quan đến tuổi mẹ. Phôi thể khảm phức tạp hỗn độn (chaotic) có thể xảy ra độc lập với tuổi mẹ, có liên quan đến bất thường trung thể và có nguồn gốc từ bố [143]. Wilding và cộng sự gợi ý một giả thuyết khác liên quan đến nguồn gốc của thể khảm phức tạp, và có mối liên quan giữa tuổi mẹ và tần suất phôi bị thể khảm phức tạp do tuổi mẹ có ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng của noãn. Các ảnh hưởng tới ty thể được tích dồn lại trong trong cuộc đời người phụ nữ dẫn tới giảm hoạt động của ty thể ở noãn. Các tác giả này thấy rằng phôi thể khảm phức tạp tăng đáng kể ở phụ nữ trên 37 tuổi, có nghĩa là ty thể bị thoái hóa làm giảm hoạt động của ty thể dẫn đến những sai sót ở thoi phân bào. Tuổi mẹ ảnh hưởng đến phôi còn thể hiện có nhiều phôi lệch bội ở nhiều cặp nhiễm sắc thể [144].

Tóm lại tiến bộ trong điều kiện nuôi cấy phôi đã làm tăng chất lượng của phôi. Tuy nhiên, chỉ dựa vào sự phát triển thành phôi nang không phải là phương pháp đáng tin cậy để chọn phôi có nhiễm sắc thể bình thường. Sàng lọc trước làm tổ sử dụng a-CGH có thể kết hợp với tăng chất lượng môi trường nuôi cấy để tăng tỷ lệ có thai và giảm tỷ lệ sảy thai. Tuy nhiên, bệnh nhân cũng như bác sĩ lâm sàng cần chú ý là kỹ thuật sàng lọc trước làm tổ còn có những mặt hạn chế. Nếu có nghi ngờ trong chẩn đoán, thì nên phân tích lại góp phần làm tăng độ chính xác của kết quả và làm tăng tỷ lệ làm tổ.

#### **4.4. Bàn luận về một số yếu tố liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể qua phân tích đơn biến.**

##### ***4.4.1. Tiền sử điều trị thụ tinh trong ống nghiệm thất bại liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.***

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 tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao nhất 76% (bảng 3.8). Phôi không làm tổ thường gặp trong điều trị thụ tinh trong ống nghiệm, ngay cả khi phôi có chất lượng tốt được chuyển vào buồng tử cung. Mặc dù các phương pháp điều trị đã được tối ưu hóa và những phát triển vượt bậc trong phòng thí nghiệm nuôi cấy phôi, việc kiểm soát phôi không làm tổ vẫn là một thách thức đối với các bác sĩ và các nhà phôi thai học trên toàn cầu. Việc làm tổ của phôi trong buồng tử cung phụ thuộc vào sự đồng bộ của các yếu tố khác nhau ví dụ như là chất lượng của phôi, điều kiện nuôi cấy tối ưu, tình trạng tử cung của người mẹ, khả năng tiếp nhận bào thai của nội mạc tử cung và hệ thống miễn dịch của người mẹ. Cho đến nay người ta đã biết rõ là nguyên nhân chính gây phôi không làm tổ liên tiếp trong điều trị thụ tinh trong ống nghiệm là do phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể. Bất thường về nhiễm sắc thể càng tăng cao ở những phụ nữ có tiền sử có phôi không làm tổ liên tiếp. Những số liệu thu được từ phôi và noãn của bệnh nhân tham gia sàng lọc trước làm tổ trên bệnh nhân lớn tuổi, sảy thai liên tiếp, thất bại điều trị thụ tinh trong ống nghiệm nhiều lần đã cho thấy rằng nhiều phôi và noãn tạo ra trong ống nghiệm bị bất thường và vì vậy không làm tổ được. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cho nhóm bệnh nhân bị thất bại điều trị thụ tinh trong ống nghiệm trước đó trong nghiên cứu này cao hơn ở một số nghiên cứu khác [46],[48]. Kết quả nghiên cứu của Rubio và cộng sự 2013 có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 57,3% ở nhóm bệnh nhân tiền sử có phôi không làm tổ liên tiếp [48] và trong

ngiên cứu của Al-Asmar và cộng sự 2012, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 67,8% [46]. Lý giải cho sự khác nhau này là các nghiên cứu trước đây sử dụng phương pháp FISH chỉ nghiên cứu 9 cặp nhiễm sắc thể còn trong nghiên cứu này sử dụng phương pháp a-CGH cho phép đánh giá 23 cặp nhiễm sắc thể của phôi cùng một lúc nên có thể phát hiện thêm nhiều rối loạn nhiễm sắc thể hơn.

#### **4.4.2. Nguyên nhân vô sinh liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.**

Nguyên nhân vô sinh có liên quan đến tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể của phôi tạo ra trong ống nghiệm. Rối loạn phóng noãn, buồng trứng đa nang tương ứng với tỷ lệ phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể cao trên 60% so với nhóm vô sinh do bất thường ở tử cung (27,3%) (bảng 3.9). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Gianaroli và cộng sự năm 2010, cho là ở những phụ nữ có rối loạn phóng noãn (bất kể do nguyên nhân nào), thường hay xảy ra các sai sót trong giảm phân hay buồng trứng trải qua quá trình già hóa sinh học (do môi trường hormone của buồng trứng) cũng làm tăng nguy cơ sai sót trong quá trình này [145].

Vô sinh do yếu tố tinh trùng cũng tương ứng với tỷ lệ lệch bội thể khá cao ở phôi tạo ra trong ống nghiệm (>60%) (bảng 3.9). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Magli và cộng sự năm 2009 sử dụng phương pháp FISH thấy rằng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể trên phôi của phôi bệnh nhân có tinh trùng ít, yếu, hình thái bất thường là 62% và ở bệnh nhân không có tinh trùng trong tinh dịch (phải lấy tinh trùng ở mào tinh hay tinh hoàn) là 69% [146]. Ở nhóm bệnh nhân có tinh trùng bất thường (ít, yếu, hình thái bất thường) ảnh hưởng tới khả năng có thai tự nhiên, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở tinh trùng cao (2-14%). Tăng bất thường về nhiễm sắc thể của tinh trùng có liên quan mật thiết với mức độ vô sinh. Tăng lệch bội nhiễm sắc thể ở tinh trùng sẽ làm

tăng nguy cơ phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể [147]. Mặc dù tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở tinh trùng không đáng kể so với lệch bội nhiễm sắc thể ở noãn nhưng với phát triển của công nghệ hỗ trợ sinh sản và di truyền học hiện nay vẫn chưa thể đánh giá được thành phần nhiễm sắc thể của tinh trùng dùng trong kỹ thuật cấy tinh trùng với noãn hay tiêm tinh trùng vào bào tương noãn để chọn lọc chính xác tinh trùng đã dẫn tới tăng tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể giới tính ở phôi tạo ra bằng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn [148]. Một nguyên nhân nữa dẫn đến tăng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể của phôi ở bệnh nhân vô sinh nam là bất thường của trung thể của tinh trùng, đặc biệt ở tinh trùng không chuyển động hay chuyển động kém. Bất thường này ảnh hưởng đến hình thành thoi phân bào ở phôi ảnh hưởng đến sự phân chia, phát triển ở phôi, tạo nên phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể hay phôi thể khảm.

Vô sinh không rõ nguyên nhân là một chẩn đoán gây tranh cãi và nản lòng nhất cho bác sĩ cũng như bệnh nhân vì không tìm ra được bất thường đặc biệt nào để tập trung điều trị. Chẩn đoán vô sinh không rõ nguyên nhân thường được đưa ra khi bệnh nhân có chu kỳ phóng noãn bình thường, xét nghiệm tinh dịch đồ bình thường, chụp tử cung-vòi trứng bình thường và không có tiền sử đau dính vùng hố chậu hay lạc nội mạc tử cung. Trong trường hợp vô sinh không rõ nguyên nhân, thực chất vẫn có nguyên nhân mà khoa học hiện nay chưa thể phát hiện ra. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy rằng ở nhóm bệnh nhân vô sinh chưa rõ nguyên nhân có tỷ lệ lệch bội thể ở phôi cao 65,9% do bất thường nhiễm sắc thể của giao tử (noãn hay tinh trùng) (bảng 3.9).

#### ***4.4.3. Tuổi mẹ liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.***

Số lượng noãn ở buồng trứng giảm dần trong cuộc đời sinh sản của người phụ nữ do cơ chế thoái hóa (atresia). Ở thai khoảng 20 tuần, số lượng noãn là 6-7 triệu, sau đó giảm còn 1-2 triệu noãn lúc sinh; 300.000 – 500.000 ở tuổi dậy thì; 25.000 ở tuổi 37 và 1.000 ở tuổi 51 (thường là tuổi phụ nữ mãn kinh). Khả năng sinh đẻ của người phụ nữ giảm dần nhưng giảm rõ ràng từ tuổi 35 và giảm mạnh sau 37 tuổi thể hiện qua giảm chất lượng của noãn cùng với tăng dần nồng độ FSH cơ bản và giảm AMH và inhibin B. Trong một nghiên cứu của Schwartz và cộng sự trên những phụ nữ khỏe mạnh sử dụng tinh trùng của người cho thấy rằng tỷ lệ có thai giảm mạnh khi tuổi của người phụ nữ tăng [149]. Tỷ lệ có thai giảm từ 74% ở phụ nữ dưới 31 tuổi xuống còn 62% ở phụ nữ 31-35 tuổi và giảm mạnh còn 54% ở phụ nữ trên 35 tuổi [149]. Xu hướng này cũng thấy ở bệnh nhân điều trị thụ tinh trong ống nghiệm ở Hoa kỳ năm 2012 do trung tâm kiểm soát và phòng chống dịch bệnh Hoa kỳ (Center for Disease Control and Prevention/CDC) công bố năm 2014: tỷ lệ sinh sống giảm từ 40,5% ở phụ nữ dưới 35 tuổi còn 31,3% ở phụ nữ 35-37 tuổi, 22,2% ở phụ nữ 38-40 tuổi; 11,7% ở phụ nữ 41-42 tuổi; 4,5% ở phụ nữ 43-44 tuổi và 1,8% ở phụ nữ trên 44 tuổi [150]. Khi tuổi của người phụ nữ tăng, nguy cơ bị các rối loạn liên quan đến sinh sản như u tử cung, bệnh lý của vòi tử cung, bệnh lý lạc nội mạc tử cung cũng tăng cao. Tuổi của người phụ nữ cao làm tăng các bất thường đến thoi phân bào dẫn đến hiện tượng nhiễm sắc thể không phân ly có liên quan đến tăng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể và tỷ lệ sảy thai [22],[151].

Cơ chế lệch bội nhiễm sắc thể chủ yếu là kết quả của sự không phân ly trong giảm phân I, quá trình tạo noãn cần ít nhất 10-13 năm thậm chí 45-55 năm để hoàn thành. Quá trình giảm phân II hoàn thành sau khi thụ tinh. Sự chậm chễ của kỳ sau và sai sót trong việc hợp nhất có thể xảy ra trong

giai đoạn này. Vì vậy ở phụ nữ lớn tuổi, do ngừng phát triển ở giai đoạn giảm phân I (tình trạng  $G_0$ ) lâu hơn nên có nguy cơ bị lệch bội nhiễm sắc thể cao hơn.

Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng cùng với tuổi mẹ đã được chứng minh trong hầu hết các nghiên cứu [41],[47],[48],[152] và hiện tượng lệch bội nhiễm sắc thể xảy ra ở tất cả các giai đoạn phát triển của phôi: giai đoạn phân chia [48] hay giai đoạn phôi nang [133]. Sàng lọc phôi trước làm tổ thường được chỉ định trong trường hợp phụ nữ lớn tuổi, nhiều lần thất bại điều trị thụ tinh trong ống nghiệm, tiền sử sảy thai. Gần đây sàng lọc phôi trước làm tổ còn được tiến hành ở những bệnh nhân trẻ tuổi có tiền lượng lượng tốt nhằm nâng cao hiệu quả chuyển một phôi có chọn lọc [153],[154]. Sàng lọc phôi trước làm tổ đã được chứng minh qua lợi điểm: làm tăng khả năng có thai cho mỗi chu kỳ điều trị, rút ngắn thời gian để có thai, tránh những trường hợp chuyển phôi không cần thiết và tránh đông những phôi không có khả năng sống; giảm sảy thai, giảm sinh ra những đứa trẻ bị bệnh Down, đồng thời đem lại thông tin hữu ích về mặt tiền lượng cho bệnh nhân [48],[49],[132]. Trong nghiên cứu của chúng tôi đã thuyết phục được phụ nữ mọi lứa tuổi tự nguyện tham gia sàng lọc phôi tiền làm tổ và đặc biệt lứa tuổi từ 18-46 (trung bình  $34,5 \pm 5,7$ ) với khoảng 50% là trẻ dưới 35 tuổi (bảng 3.1).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng trùng hợp với kết quả của các nghiên cứu của các tác giả khác sử dụng phương pháp FISH, a-CGH hay a-SNP, đó là tuổi mẹ có liên quan mật thiết đến tỷ lệ lệch bội thể của phôi ngày 3 tạo ra trong ống nghiệm [67], [90]. Nghiên cứu của chúng tôi thấy là phôi tạo ra ở người mẹ trẻ dưới 35 tuổi có tỷ lệ lệch bội thể là 49,7% và tăng tới 91,9% ở người mẹ trên 40 tuổi. Khả năng phôi bị lệch bội thể ở mẹ 35-40 tuổi cao gấp gần 1,5 lần và ở mẹ trên 40 tuổi cao gấp gần 2 lần so với phôi của người mẹ trẻ tuổi dưới 35. Bảng 3.10 và 3.34 trong phần kết quả nghiên cứu

đã chứng minh khi có mặt của chỉ báo tuổi mẹ trên 40 thì tỷ số khả năng là  $LR^{(+)} = 8,5$  và  $LR^{(-)}=0,74$  khi so sánh tỷ lệ phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể ở người mẹ trẻ tuổi dưới 35. Do vậy tuổi mẹ trên 40 là chỉ báo rất quan trọng trong tiên lượng lệch bội nhiễm sắc thể. Bảng 3.26 chỉ rõ khi tuổi mẹ 35-40 và đặc biệt >40 có nguy cơ lệch bội nhiễm sắc thể tương ứng là 66,7% và 90,4%; mặc dù phôi ở ngày 3 phát triển bình thường có 7-9 phôi bào. Kết quả nghiên cứu trên đã chứng minh chỉ riêng tuổi mẹ >40 cũng đã là yếu tố độc lập có liên quan đến nguy cơ lệch bội nhiễm sắc thể cao. Vì vậy khi điều trị cho nhóm bệnh nhân này, 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.

#### **4.4.4. Nồng độ FSH cơ bản liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.**

Từ lâu chúng ta biết rằng, tăng nồng độ FSH cơ bản và tuổi mẹ tăng có liên quan đến giảm khả năng sinh đẻ. Cho đến nay, vẫn còn nhiều tranh cãi về bệnh sinh (etiology) của hiện tượng giảm khả năng sinh đẻ ở phụ nữ có nồng độ FSH cơ bản cao, đặc biệt ở phụ nữ trẻ tuổi. Sinh bệnh học của bệnh lý trên lại liên quan đến giảm chất lượng noãn hay giảm dự trữ buồng trứng cũng chưa được sáng tỏ. Trong nghiên cứu này chúng tôi thấy ở phụ nữ có nồng độ FSH cơ bản cao trên 15mIU/ml tương ứng với tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao gấp 1,3 lần so với ở phụ nữ có nồng độ FSH cơ bản thấp  $\leq 15$  mIU/ml (bảng 3.11). Kết quả này gần phù hợp với kết quả của Nasserri và cộng sự công bố là tăng nồng độ FSH cơ bản  $\geq 15$  mIU/ml có liên quan đến thai bị lệch bội nhiễm sắc thể. Các tác giả cho rằng nồng độ FSH cơ bản là chỉ báo để tiên lượng thai bị lệch bội nhiễm sắc thể có giá trị hơn yếu tố “tuổi mẹ cao”. Đây là điểm trái ngược với kết quả nghiên cứu của chúng tôi vì tác giả Nasserri chỉ nghiên cứu và xét nghiệm lệch bội nhiễm sắc thể trên tổ chức thai sẩy và một số trường hợp có thai tự nhiên hoặc bơm tinh trùng vào buồng tử



cung chứ không hoàn toàn là sau điều trị thụ tinh trong ống nghiệm. Phôi lệch bội nhiễm sắc thể thường có khả năng làm tổ kém. Xét nghiệm lệch bội nhiễm sắc thể trên tổ chức thai sẩy có thể không hoàn toàn phản ánh tỷ lệ thật của phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể [155]. Kết quả của nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với những nhận định của El-Touky và cộng sự năm 2002 cho là tuổi của người phụ nữ là yếu tố tác động tất nhiên gây ra hiện tượng giảm dự trữ buồng trứng thể hiện bằng tăng nồng độ FSH cơ bản ngày 3 từ đó giảm đáp ứng điều trị, tạo nên noãn có chất lượng kém, dẫn đến giảm tỷ lệ có thai và tăng tỷ lệ sẩy thai là lẽ đương nhiên [156]. Tăng nồng độ FSH còn thấy ở phụ nữ trẻ có giảm số lượng noãn là hậu quả của hiện tượng thoái hóa buồng trứng sớm (premature ovarian failure/POF). Nồng độ FSH cơ bản cao là chỉ báo cho chất lượng của noãn trong nhóm bệnh nhân này đã được chứng minh [155]. Về lâm sàng, mối liên quan này có ảnh hưởng tới việc tư vấn cho nhóm bệnh nhân trẻ có tăng nồng độ FSH về nguy cơ sẩy thai cũng như nguy cơ có thai bị lệch bội nhiễm sắc thể.

Nếu tăng nồng độ FSH là chỉ báo giảm chất lượng noãn và có ảnh hưởng tới tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi. Điều này cung cấp những thông tin có giá trị trong việc tư vấn bệnh nhân, đồng thời giải thích nguyên nhân giảm sinh đẻ ở phụ nữ có tăng nồng độ FSH. Bảng 3.11 trong phần kết quả của nghiên cứu này đã chứng minh khi có mặt của yếu tố tăng nồng độ FSH cơ bản thì khả năng dự đoán lệch bội nhiễm sắc thể không cao tương ứng với tỷ số khả năng  $LR^{(+)}=1,93$  và  $LR^{(-)}=0,93$ . Hiện tại một số trung tâm điều trị thụ tinh ống nghiệm sử dụng nồng độ FSH cơ bản để sàng lọc bệnh nhân điều trị. Tuy nhiên, một số nghiên cứu thấy là phụ nữ trẻ có nồng độ FSH cao vẫn có khả năng có thai mặc dù thấp hơn tỷ lệ chung một ít [157]. Kết quả nghiên cứu của Thum cho rằng tăng nồng độ FSH cơ bản  $\geq 10$  mIU/ml không có ảnh hưởng tới chất lượng của noãn, phụ nữ có tăng nồng độ FSH cơ bản không có

nguy cơ cao tạo ra phôi lệch bội nhiễm sắc thể. Tác giả thấy rằng tăng nồng độ FSH cơ bản có liên quan đến số lượng hơn là chất lượng dự trữ buồng trứng và phụ nữ trẻ có tăng nồng độ FSH có kết quả điều trị tốt hơn phụ nữ lớn tuổi có FSH bình thường. Vì vậy nồng độ FSH cơ bản có ít giá trị trong việc tiên lượng kết quả điều trị thụ tinh trong ống nghiệm và chỉ nên sử dụng FSH cơ bản như một gợi ý đến một phương pháp điều trị thích hợp.

***4.4.5. Tốc độ phát triển của phôi ngày 3 sau thụ tinh (biểu thị qua số lượng phôi bào) liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.***

Tốc độ phát triển của phôi ở giai đoạn phân chia biểu thị bằng số lượng phôi bào ở ngày 2 và 3 sau thụ tinh và có giá trị trong tiên lượng khả năng làm tổ và có thai. Theo phương pháp đánh giá phôi đồng thuận của tổ chức Alpha thì tốc độ phát triển lý tưởng nhất là phôi ngày 1 có 2 phôi bào ở thời điểm  $26 \pm 1$  giờ sau tiêm tinh trùng vào bào tương noãn và  $28 \pm 1$  giờ sau cấy tinh trùng với noãn; phôi ngày 2 có 4 phôi bào ở thời điểm  $44 \pm 1$  giờ và phôi ngày 3 có 8 phôi bào ở thời điểm  $68 \pm 1$  giờ [19]. Phôi phát triển theo đúng thời điểm thích hợp thường có khả năng phát triển thành phôi nang và làm tổ cao hơn [158]. Sau đó rất nhiều nghiên cứu đã khẳng định mốc phát triển 8 phôi bào là một chỉ số hữu ích trong việc lựa chọn phôi với khả năng làm tổ cao nhất vào ngày 3 sau thụ tinh [64],[159],[160],[161],[162].

Sau khi thụ tinh, sự phát triển của phôi bắt đầu bằng hiện tượng hợp nhất giữa tiền nhân của bố và của mẹ. Khả năng phát triển tiếp của phôi một phần nào đó bị ảnh hưởng bởi giai đoạn sớm này. Các yếu tố di truyền (gene) và biểu sinh học (epigenetics) từ giao tử bố và mẹ điều khiển và chi phối “chương trình” phát triển nói trên. Những sai sót trong “chương trình phát triển” đã được định sẵn về thời gian tạo hợp tử và các chuỗi sự kiện tiếp theo sẽ dẫn đến phôi bị chết.

Giảm phân là một cơ chế để tạo ra giao tử có số lượng nhiễm sắc thể giảm đi một nửa. Những sai sót trong quá trình giảm phân ít xảy ra ở hầu hết các sinh vật, tuy nhiên ở người thì cá biệt, khoảng 50% noãn tạo ra có nhiễm sắc thể bất thường [21],[22]. Phôi có lệch bội nhiễm sắc thể thường ít khi có khả năng sống sót, khoảng 1/3 các trường hợp sảy thai là do lệch bội nhiễm sắc thể.

Tốc độ phân chia của phôi ở thời điểm chuyển phôi cũng có giá trị trong tiên lượng sảy thai sớm. Hourvitz và cộng sự thấy rằng phôi có ít phôi bào vào ngày 3 ( $\leq 6$ ) thường có liên quan đến sảy thai sớm. Mối liên hệ giữa số lượng phôi bào và rối loạn nhiễm sắc thể đã được công bố. Sử dụng phương pháp FISH để đánh giá tình trạng 5-10 cặp nhiễm sắc thể của phôi ngày 3 sau thụ tinh, một số nhà nghiên cứu đã thấy rằng phôi có nhiễm sắc thể bất thường thường phân chia không theo đúng một thời gian thích hợp; tỷ lệ bất thường cao nhất ở phôi phát triển chậm [2],[65]. Munne và cộng sự thấy rằng phôi ngày 2 có 4 phôi bào có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể thấp nhất [163], trong khi đó Magli và cộng sự cũng cho là điều này đúng với phôi ngày 3 có 7-8 phôi bào ở thời điểm 62 giờ sau thụ tinh [2]. Finn và cộng sự cũng thấy phôi bình thường về số lượng nhiễm sắc thể gặp nhiều nhất ở phôi có 7 tới 8 phôi bào ở thời điểm 64 giờ sau thụ tinh khi so với phôi có  $\leq 6$  phôi bào hay phôi có  $\geq 9$  phôi bào [65]. Trong nghiên cứu của chúng tôi đã sử dụng phương pháp a-CGH để đánh giá toàn bộ 23 cặp nhiễm sắc thể của phôi 67-68 giờ sau thụ tinh cũng thấy rằng có mối liên quan chặt chẽ giữa số lượng nhiễm sắc thể và khả năng phát triển của phôi biểu thị qua số lượng phôi bào (bảng 3.12). Điều đó có nghĩa là thời gian phân chia của phôi chịu ảnh hưởng bởi tình trạng của nhân tế bào phôi. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao nhất ở những phôi phát triển chậm ( $\leq 6$  phôi bào) gấp gần 1,5 lần so với phôi phát triển bình thường (7-9 phôi bào). Yếu tố phát triển chậm được xem như là

một chỉ báo có giá trị tương đối cao trong dự đoán phôi lệch bội nhiễm sắc thể tương ứng với tỷ số khả năng  $LR^{(+)}=3,1$  và  $LR^{(-)}=0,82$  (bảng 3.12). Khác với nghiên cứu của Magli và Finn, họ đánh giá phôi ở thời điểm 62-64 giờ sau thụ tinh nên phôi 9 phôi bào được xếp vào loại phôi phát triển nhanh [2],[65], tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi đánh giá phôi ở thời điểm 67-68 giờ và phôi ở thời điểm này có 9 phôi bào được coi là bình thường giống như kết luận của Munne và cộng sự [163]. Trong nghiên cứu gần đây của Campbell và cộng sự năm 2014, sử dụng phương pháp theo dõi phôi liên tục (time-lapse imaging) cũng khẳng định rằng phôi lệch bội nhiễm sắc thể phát triển chậm hơn phôi bình thường [164]. Những bất thường về nhiễm sắc thể như phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể, phôi ở thể khảm có ảnh hưởng xấu làm cho phôi phân chia chậm. Một nguyên nhân chính gây nên hiện tượng phát triển không bình thường này có thể là do yếu tố môi trường hay điều kiện nuôi cấy phôi [79],[165] hoặc do giảm nồng độ oxy (oxygen tension) trong dịch nang [166]. Hậu quả là xảy ra quá trình nhân lên (replication) ở trong nhân tế bào nhưng lại không có sự phân chia bào tương (cytokinesis), nhân phân mảnh (fragmentation of the nuclei) hoặc việc di chuyển của các nhiễm sắc thể ở kỳ sau (anaphase) bị sai sót tạo nên những bất thường phức tạp như phôi thể khảm hay đa nhân. Một nguyên nhân khác là do rối loạn chức năng trung thể của tinh trùng dẫn đến sai sót khi hình thành thoi phân bào làm cho các nhiễm sắc thể cặp đôi và phân chia rối loạn khi phân chia nguyên nhiễm, tạo ra tình trạng lệch bội nhiễm sắc thể và phôi thể khảm [167].

Một điều thú vị là phôi phát triển quá nhanh cũng liên quan đến rối loạn nhiễm sắc thể giống như phôi phát triển chậm, tuy nhiên mức độ liên quan không chặt chẽ như đối với phôi phát triển chậm. Phôi có  $\geq 10$  phôi bào ở thời điểm 67-68 giờ sau thụ tinh cũng có khả năng bị lệch bội nhiễm sắc thể cao so với phôi phát triển bình thường (bảng 3.12). Tuy nhiên, tỷ lệ lệch bội nhiễm

sắc thể ở phôi phát triển nhanh cao hơn ở phôi phát triển bình thường khoảng 1,2 lần, và tỷ số khả năng là  $LR^{(+)}=1,35$ ;  $LR^{(-)}=0,9$  chứng tỏ yếu tố phôi phát triển nhanh là một trong những chỉ báo để tiên lượng phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể nhưng có giá trị thấp. Những quan sát này đã chỉ ra rằng thời gian là yếu tố quan trọng để đánh giá khả năng phát triển của phôi, phù hợp với những quan sát của các tác giả trước đây đã nêu lên là phôi phát triển nhanh có tỷ lệ phát triển thành phôi nang cao hơn so với phôi phát triển chậm [2],[158],[161], và bất cứ thay đổi về tốc độ phân chia của phôi đều có thể ảnh hưởng tới sự làm tổ của phôi [64],[159],[161],[162]. Nghiên cứu này cũng đã chứng minh là phôi hoàn thành chu kỳ phân chia thứ 3 ở thời điểm 67-68 giờ sau thụ tinh có khả năng nhiễm sắc thể bình thường cao nhất.

#### ***4.4.6. Hình thái của phôi ngày 3 liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.***

Các nghiên cứu sử dụng phương pháp FISH trước đây đều chỉ ra rằng phôi có bất thường về hình thái thường có tỷ lệ bất thường về nhiễm sắc thể cao hơn phôi có hình thái bình thường [2],[163]. Tuy nhiên rất khó phân biệt hình thái phôi có nhiễm sắc thể bình thường và phôi có nhiễm sắc thể bất thường, có thể do nhiễm sắc thể bất thường ở giai đoạn 2-8 phôi bào khó gây nên bất thường hình thái khi bộ gen của phôi chưa được hoạt hóa.

*\* Sự xuất hiện mảnh vụn và sự phân bố mảnh vụn trong phôi liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.*

Mảnh vụn là một phần của bào tương được bao bởi màng tế bào nhưng thường không có chứa DNA hình thành trong quá trình phân bào. Vì vậy mảnh vụn có nguồn gốc từ phôi bào và việc phân tích tỷ lệ mảnh vụn trong phôi được đề cập đến trong tất cả các hệ thống điểm đánh giá phôi. Tỷ lệ mảnh vụn thường được tính theo tỷ lệ phần trăm so với thể tích bào tương trong phôi (cytoplasmic volume). Theo hệ thống đánh giá phôi của chúng tôi thì tỷ lệ mảnh vụn ít ( $\leq 5\%$ ), trung bình (6-15%), nhiều (16-30%) và rất nhiều

(>30%). Thông thường khó phân biệt mảnh vụn lớn với phôi bào có kích thước nhỏ. Theo Johansson và cộng sự thì phần bào tương có kích thước nhỏ hơn  $45\mu\text{m}$  vào ngày 2 và nhỏ hơn  $40\mu\text{m}$  vào ngày 3 không chứa DNA thì được gọi là mảnh vụn [168].

Tỷ lệ mảnh vụn nhiều có ảnh hưởng xấu đến tỷ lệ làm tổ và có thai [169], trong khi đó tỷ lệ mảnh vụn ít không có ảnh hưởng xấu [85]. Sử dụng phương pháp theo dõi phôi liên tục, Hardarson và cộng sự thấy rằng một số ít mảnh vụn có thể được những phôi bào mới tạo ra hấp thụ vì vậy, phôi có ít mảnh vụn có thể xem là bình thường [74].

Tăng tỷ lệ mảnh vụn cũng làm giảm khả năng hình thành phôi nang và ảnh hưởng tới sự phân bố của các phôi bào trong quá trình biệt hóa phôi nang [170]. Sự phân bố của mảnh vụn trong khoang quanh phôi (perivitelline space/PVS) được phân ra làm hai loại rải rác và tập trung. Khi có nhiều mảnh vụn thì khó phân biệt mảnh vụn nằm tập trung hay rải rác. Việc đánh giá mảnh vụn là một thông số quan trọng trong các hệ thống đánh giá hình thái phôi vì phôi có nhiều mảnh vụn và mảnh vụn tồn tại trong hầu hết các giai đoạn phát triển thường ít có khả năng sống.

Kết quả đánh giá về mảnh vụn tế bào trong nghiên cứu của chúng tôi thống nhất với các nghiên cứu trước đây của Wilton và cộng sự (2003) sử dụng phương pháp CGH [171] và Magli và cộng sự (2007) sử dụng phương pháp FISH đánh giá 5-7 cặp nhiễm sắc thể [2]. Kết quả nghiên cứu này cũng thấy tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng cùng với hiện tượng tăng số lượng mảnh vụn trong phôi: phôi có nhiều mảnh vụn (16-30%) tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng gấp gần 1,4 lần so với phôi có ít mảnh vụn; phôi có số lượng mảnh vụn trung bình, tỷ lệ lệch bội thể tăng 1,2 lần. Tuy nhiên tăng số lượng mảnh vụn trong phôi chỉ là chỉ báo tiên lượng phôi bị lệch bội thể tương đối thấp  $LR^{(+)} = 1,96$ ;  $LR^{(-)} = 0,77$  đối với phôi có nhiều mảnh vụn và  $LR^{(+)} = 1,33$ ;

$LR^{(-)}=0,82$  đối với phôi có số lượng mảnh vụn trung bình (bảng 3.14). Vì vậy, khi đánh giá phôi nếu chỉ dựa vào yếu tố tỷ lệ mảnh vụn trong phôi thì không thể tiên lượng phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể có hiệu quả. Một điểm khác biệt trong nghiên cứu của chúng tôi so với nghiên cứu của Magli và Finn là chúng tôi chỉ đánh giá phôi có số lượng mảnh vụn từ 30% trở xuống còn trong nghiên cứu của Magli và Finn đánh giá cả phôi có rất nhiều mảnh vụn tới 50% [2],[65]. Lý do chúng tôi không đánh giá phôi có rất nhiều mảnh vụn (>30%) vào ngày 3 sau thụ tinh là do số lượng các phôi này ít và các phôi này thường ngừng phát triển trước khi hình thành phôi nang [73] đồng thời việc sử dụng đánh giá phôi bằng phương pháp a-CGH rất tốn kém. Nếu những phôi này có thể phát triển đến giai đoạn phôi nang chúng tôi sẽ đánh giá qua sinh thiết nguyên bào lá nuôi, như vậy sẽ giảm chi phí điều trị cho bệnh nhân.

Cũng giống như nghiên cứu của Magli và cộng sự [2], chúng tôi thấy khi mảnh vụn phân bố rải rác, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng 1,94 lần so với khi mảnh vụn nằm tập trung. Tuy nhiên đây cũng là yếu tố tiên lượng phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể không được cao ( $LR^{(+)}=2$  và  $LR^{(-)}=0,39$ ) (bảng 3.15). Một số nghiên cứu thấy là 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 [75],[172]. Hơn nữa, một số protein giúp cho sự phân cực bị giảm đi do nằm trong các mảnh vụn cũng sẽ ảnh hưởng xấu tới sự phát triển của phôi [173]. Khi mảnh vụn nằm rải rác chứng tỏ mảnh vụn xuất phát từ nhiều phôi bào gây ảnh hưởng càng xấu [55].

*\* Độ đồng đều của kích thước phôi bào liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.*

Kết quả nghiên cứu này thấy rằng phôi có kích thước các phôi bào không đồng đều tương ứng với tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao hơn gần 2 lần so với phôi có kích thước các phôi bào đồng đều. Bảng 3.13 trong phần kết

quả đã chứng minh phôi bào không đều là chỉ số tiên lượng phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể có giá trị trung bình tương ứng  $LR^{(+)} = 2,69$  và  $LR^{(-)} = 0,48$ . 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 [74],[163].

Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với kết luận của của các nghiên cứu trước đây của Magli và cộng sự là phôi có kích thước phôi bào không đều bị lệch bội nhiễm sắc thể nhiều hơn, nhiều cặp nhiễm sắc thể bị ảnh hưởng hơn và điều này ảnh hưởng tới sự phát triển của phôi [2],[10]. Có thể suy luận là khi phôi bào phân chia không đồng đều, 2 phôi bào con sẽ nhận được lượng protein, mRNA, ty thể và các thành phần khác không đồng đều và phôi bào cần một lượng các thành phần bào tương để duy trì sự sống, vì vậy những phôi có kích thước phôi bào không đồng đều thường chậm phát triển và khả năng làm tổ kém [74].

Kích thước của phôi bào bào phụ thuộc vào thời điểm phân chia (stage specific) cũng như tính cân đối của mỗi chu kỳ phân chia. Bình thường phôi bào của “phôi-2, -4, -8, và -10 phôi bào” phải có kích thước như nhau có nghĩa là phù hợp với thời điểm phân chia và phôi có kích thước không phù hợp thời điểm phân chia là khi các phôi bào có kích thước khác nhau. Ngược lại nếu số lượng phôi bào là số lẻ (3, 5, 7, 9) thường có kích thước khác nhau do có sự phân chia không đồng bộ (asynchrony) của một hay nhiều phôi bào [9]. Tuy nhiên trong nghiên cứu này chỉ tập trung nghiên cứu so sánh giữa phôi có kích thước phôi bào đồng đều và phôi có kích thước phôi bào không đều chứ không tính đến yếu tố phù hợp với thời điểm phân chia nên kết luận của chúng tôi có thể không hoàn toàn phù hợp với trường hợp phôi có số lượng phôi bào lẻ nhưng phù hợp với thời điểm phân chia (phôi 5-tế bào có 3 phôi bào lớn và 2 phôi bào nhỏ, phôi 7-tế bào có 1 phôi bào lớn và 6 phôi bào nhỏ, hay phôi 9-tế bào có 1 phôi bào lớn và 8 phôi bào nhỏ...). Cần phải



có một nghiên cứu đi sâu hơn phân tích mối liên quan đa biến giữa tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể và số lượng phôi bào chẵn, lẻ, độ đồng đều của kích thước phôi bào; phù hợp với thời điểm phân chia hay không để có thể tiên lượng phôi ít có khả năng bị lệch bội nhiễm sắc thể nhất.

#### ***4.4.7. Sự phát triển của phôi từ ngày 3 đến giai đoạn phôi nang liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.***

Trong một vài ngày đầu của sự phát triển, hệ thống gene của phôi chưa được hoạt hóa, phôi hầu như phát triển dựa vào nguồn protein và mRNA từ noãn. Khi phôi phát triển thêm, nguồn dự trữ từ noãn cạn kiệt dần, hệ thống gen của phôi bắt đầu hoạt động khi phôi có 4-8 tế bào. Khi hệ thống gen của phôi được hoạt hóa, hậu quả của các bất thường về di truyền bắt đầu tăng mạnh và ảnh hưởng đến hình thái của phôi. Về mặt lý thuyết thì khi có mặt các bất thường về di truyền sẽ ảnh hưởng tới quá trình phát triển của phôi như khả năng phân chia, kết đặc, biệt hóa tạo nguyên bào phôi và nguyên bào lá nuôi ở phôi nang. Vì lý do này, phân tích về hình thái của phôi ở giai đoạn sau khi bộ gen của phôi được hoạt hóa là đặc biệt có giá trị.

Chúng tôi thấy rằng tỷ lệ phôi bình thường phát triển thành phôi nang cao hơn 2 lần so với phôi bị lệch bội thể (67,3% so với 32,3%) (bảng 3.5; 3.16). Vega và cộng sự khi nghiên cứu 385 phôi sinh thiết ngày 3 cũng thấy rằng tỷ lệ phôi bình thường phát triển thành phôi nang cao gấp 2 lần phôi lệch bội nhiễm sắc thể và tỷ lệ phát triển thành phôi nang giai đoạn thoát màng cao gấp 3 lần [174]. Nghiên cứu của chúng tôi thấy rằng 44,2% các phôi được phân tích có thể phát triển đến giai đoạn phôi nang là lệch bội nhiễm sắc thể (bảng 3.16), trong khi đó nghiên cứu gần đây của Vega và cộng sự công bố là 45,5% phôi xét nghiệm có thể phát triển đến giai đoạn phôi thoát màng là bị lệch bội nhiễm sắc thể [174]. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao này có thể do

bản chất của nhóm đối tượng nghiên cứu hoặc do các nghiên cứu sử dụng các kỹ thuật khác nhau để phân tích nhiễm sắc thể.

Nhiều nghiên cứu đều khẳng định rằng trên 50% số phôi nang có khả năng để chuyển phôi vào ngày 5 là bị lệch bội nhiễm sắc thể góp phần khẳng định vai trò quan trọng của việc sàng lọc trước làm tổ. Tiến hành sàng lọc phôi ngày 3 hay ngày 5 đều được chứng minh là làm tăng tỷ lệ làm tổ và tạo ra tiềm năng chỉ chuyển một phôi bình thường cho tất cả các lứa tuổi [132],[154]. Basile và cộng sự năm 2014, sử dụng phương pháp theo dõi phôi liên tục (time-lapse) kết hợp a-CGH thấy rằng 79% phôi được chẩn đoán là bình thường có khả năng phát triển thành phôi nang [175]. Trong nghiên cứu của chúng tôi 67,3% phôi được chẩn đoán là bình thường phát triển thành phôi nang và 32,7% phôi bình thường không phát triển đến giai đoạn phôi nang (bảng 3.5) vì vậy không có khả năng để sinh thiết phôi nang. Điều này cần được cân nhắc về khả năng tổn hại và không chính xác của sinh thiết phôi ngày 3. Gần đây có một thử nghiệm lâm sàng nêu lên khả năng có hại của việc sinh thiết phôi ngày 3 lên tỷ lệ làm tổ, nhưng nghiên cứu này không nêu lên khả năng hình thành phôi nang hay tình trạng nhiễm sắc thể của phôi bị ảnh hưởng [127]. Mặc dù nghiên cứu này có thể đánh giá chính xác tỷ lệ hình thành phôi nang của phôi sinh thiết ngày 3 bị lệch bội nhiễm sắc thể và không lệch bội nhiễm sắc thể, nhưng việc sinh thiết cũng có ảnh hưởng đến tỷ lệ hình thành phôi nang. Vì vậy, tỷ lệ hình thành phôi nang sau khi sinh thiết ngày 3 không hoàn toàn phản ánh tỷ lệ hình thành phôi nang của phôi bình thường sau khi sinh thiết vào ngày 5.

Nghiên cứu của chúng tôi khẳng định các nghiên cứu sử dụng FISH trước đây là phôi bình thường có khả năng hình thành phôi nang cao hơn phôi lệch bội thể [140],[176]. Xét nghiệm phôi vào ngày 5 sẽ có tỷ lệ phôi bình thường cao hơn khi xét nghiệm phôi ngày 3 [177]. Điều này hỗ trợ xu hướng chuyển phôi vào ngày 5.

Một điểm đáng chú ý trong nghiên cứu của chúng tôi là vào ngày 5 sau khi thụ tinh, phôi nang phát triển nhanh đến giai đoạn đang thoát màng hay thoát màng (giai đoạn 5-6) có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể thấp nhất. Tốc độ phát triển của phôi nang càng chậm thì tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể càng cao (bảng 3.18). Phôi phát triển chậm ở giai đoạn phôi dâu hay ngừng phát triển vào ngày 5 là chỉ báo khả năng phôi bị lệch bội thể cao lần lượt tương ứng với tỷ số khả năng  $LR^{(+)} = 5,6$ ;  $LR^{(-)}=0,37$  và  $LR^{(+)}=6,58$ ;  $LR^{(-)}=0,16$  khi so sánh với phôi phát triển tốt thành phôi nang giai đoạn 5-6 vào ngày 5. Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả của Alfarawati và cộng sự khi tiến hành sinh thiết phôi nang, tác giả này cũng thấy là phôi nang phát triển nhanh (giai đoạn 5-6) có tỷ lệ phôi bình thường cao hơn phôi nang phát triển chậm ở giai đoạn 1-2 [90]. Vì vậy khi chọn phôi để chuyển vào ngày 5, nếu phôi ở giai đoạn phôi dâu hay phôi nang giai đoạn sớm thì không nên tiến hành chuyển phôi mà nên đợi thêm một ngày nữa để có thể chọn lọc phôi hiệu quả hơn.

Một điểm thú vị là phôi phát triển chậm thành phôi nang vào ngày 6 có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao hơn 2,3 lần so với phôi phát triển thành phôi nang vào ngày 5 (bảng 3.17). Phôi phát triển chậm thành phôi nang vào ngày 6 là chỉ báo có giá trị trung bình để chẩn đoán tiên lượng phôi lệch bội nhiễm sắc thể tương ứng với tỷ số khả năng  $LR^{(+)}=2,52$  và  $LR^{(-)}=0,51$  (bảng 3.17). Kết quả này cũng phù hợp với nhận định của Taylor và cộng sự khi tiến hành xét nghiệm nguyên bào lá nuôi của phôi nang ngày 5 và ngày 6 thấy là phôi nang ngày 5 có khả năng có nhiễm sắc thể bình thường cao hơn ngày 6 (54,6% và 42,8%) [90]. Kết quả này có phần khác với kết quả của Kroner và cộng sự năm 2012 cho rằng sự hình thành phôi nang chậm không liên quan tới tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể nhưng nếu không hình thành phôi nang sẽ có liên quan với tăng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể. Tuy nhiên trong nghiên cứu của Kroner, số lượng phôi nghiên cứu ít (530 phôi so với 1257 phôi trong

nghiên cứu của chúng tôi) và số phôi nang ngày 6 là 109 phôi cũng ít hơn trong nghiên cứu của chúng tôi là 234 phôi [91]. Sự khác biệt về số lượng nghiên cứu nói trên có thể là nguyên nhân khác biệt về kết quả của 2 nghiên cứu. Kết luận của nghiên cứu 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 phù hợp với nhận định của Shapiro năm 2001 và Barenetxea năm 2005 [178],[179].

#### ***4.4.8. Mức độ lệch bội nhiễm sắc thể và khả năng hình thành phôi nang.***

Cũng như nghiên cứu của Alfarawati và cộng sự (2011) [90] và của Vegas và cộng sự (2014) [174] đánh giá 23 cặp nhiễm sắc thể của phôi chúng tôi cũng thấy lệch bội 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 nhiễm sắc thể tăng. So với phôi không bị lệch bội nhiễm sắc thể, khả năng phát triển thành phôi nang giảm 22% khi phôi bị lệch bội ở một cặp nhiễm sắc thể, giảm 38% khi lệch bội xảy ra ở 2 cặp nhiễm sắc thể, giảm 54% khi lệch bội xảy ra ở 3 cặp nhiễm sắc thể và giảm 75% khi lệch bội phức tạp xảy ra trên 3 cặp nhiễm sắc thể (bảng 3.19). Kết quả này cũng thống nhất với kết quả của Vega và cộng sự cho là khả năng phát triển thành phôi nang giai đoạn 5 và 6 và tăng số lượng nhiễm sắc thể bị lệch bội có mối liên quan tuyến tính âm với nhau [174].

#### ***4.4.9. Khả năng phát triển thành phôi nang vào ngày 5 và giới tính của phôi liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.***

Nhờ vào những tiến bộ trong sự phát triển của môi trường nuôi cấy, ngày càng nhiều các trung tâm IVF trên thế giới tiến hành chuyển phôi nang. Theo lý thuyết thì chuyển phôi nang sẽ làm tăng sự đồng nhất giữa niêm mạc tử cung và phôi, cũng như tăng khả năng lựa chọn phôi. Lựa chọn phôi chỉ

dựa vào hình thái của phôi cho đến nay vẫn chưa hoàn hảo, và là nguyên nhân gây giảm tỷ lệ làm tổ. Phôi phát triển thành phôi nang ngày 5 được cho là có nhiễm sắc thể bình thường cao hơn, tuy nhiên tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi nang vẫn còn cao. Mặc dù nhiều bằng chứng chứng minh là chuyển phôi nang sẽ làm tăng kết quả điều trị IVF tuy nhiên vẫn còn những hạn chế như: nguy cơ phải hủy chu kỳ điều trị cao, ít phôi để đông lạnh hơn, và tăng nguy cơ sinh đôi (monozygotic twins), và thay đổi tỷ lệ giới tính [180]. Một cơ chế có thể gây nên sự thay đổi tỷ lệ giới tính là phôi nam giới có khả năng phát triển nhanh hơn. Một vài nghiên cứu thấy rằng phôi nam giai đoạn phân chia và làm tổ ở người có số lượng phôi bào nhiều hơn phôi nữ (phát triển nhanh hơn) vì vậy điều quan tâm là chuyển phôi nang có thể dẫn đến sự lựa chọn ưu tiên đối với phôi nam [11],[12]. Hiện nay, vẫn còn nhiều tranh cãi về chỉ định chuyển phôi nang sẽ ảnh hưởng đến tỷ lệ giới tính. Các số liệu hiện tại đều dựa vào tỷ lệ giới tính ở trẻ sinh ra [181],[182] để suy luận ra khả năng phát triển của phôi chứ không tính đến các yếu tố khác như sự khác nhau giữa khả năng làm tổ và tỷ lệ sảy giữa phôi nam và nữ.

Cho đến nay có 3 nghiên cứu về tỷ lệ giới tính của phôi nang đều cho là không có sự khác nhau về giới tính [90],[183],[184]. Tuy nhiên trong nghiên cứu của Alfarawati và cộng sự năm 2011, thấy là phôi chứa XY thường có hình thái tốt hơn [90]. Nguyên nhân sinh học cho đến nay vẫn chưa được chứng minh, có thể là do liên quan giữa số gen nằm trên nhiễm sắc thể X không hoạt động (X-chromosome inactivation) hay sự có mặt của gen hoạt hóa hormone sinh trưởng (growth factor gene) trên nhiễm sắc thể Y. Với giả thuyết là phôi nam sẽ phát triển thành phôi nang nhanh hơn phôi nữ và phôi nang ngày 5 có tỷ lệ nhiễm sắc thể bình thường cao hơn phôi ngày 3 thì khả năng phôi nam bị lệch bội nhiễm sắc thể sẽ ít hơn phôi nữ. Tuy nhiên, số liệu của chúng tôi chứng minh khác là phôi nam và phôi nữ có khả năng phát triển

thành phôi nang và khả năng bị lệch bội nhiễm sắc thể như nhau (bảng 3.20). 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 (biểu thị qua chất lượng của mầm phôi và nguyên bào lá nuôi) liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.***

Nghiên cứu này đã chứng minh là phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể có thể phát triển thành phôi nang. Tuy nhiên, có những bằng chứng cho là lệch bội nhiễm sắc thể 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 [89]. Cho đến ngày 3 sau khi thụ tinh, sự sống của phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể chủ yếu dựa vào các protein từ noãn. Tuy nhiên, sau khi phôi hoạt hóa, 4-8 tế bào, phôi chủ yếu dựa vào sản phẩm của chính nó. Vì vậy, lệch bội nhiễm sắc thể có ảnh hưởng mạnh hơn khi phôi phát triển qua ngày thứ 3. Nhiều phôi nang bất thường (trong nghiên cứu này) có nguyên bào lá nuôi chất lượng kém và có thể không làm tổ được. Một số phôi khác có mầm phôi chất lượng kém có thể làm tổ nhưng có thể dẫn đến sảy thai sớm. Khi xem xét đến hình thái của phôi nang là chỉ báo lệch bội nhiễm sắc thể, chúng tôi thấy rằng tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng khi phôi nang có chất lượng hình thái kém (bảng 3.23; 3.24; 3.25) cụ thể tỷ lệ lệch bội nhiễm thể thấp 31,1% ở phôi có chất lượng tốt so với 41,2% ở phôi có chất lượng trung bình và 78,6% ở phôi có chất lượng kém (bảng 3.21). Theo nghiên cứu này thì khả năng chuyển phôi nang bị lệch bội nhiễm sắc thể có thể giảm từ 44,2% (bảng 3.16) (nếu chỉ chuyển phôi nang giai đoạn 2-6 mà không đánh giá về chất lượng mầm phôi và nguyên bào lá nuôi) xuống còn 31,1% nếu chỉ chuyển phôi nang có chất lượng tốt (bảng 3.23). Trên thực tế, không phải chu kỳ điều trị nào cũng có thể tạo được những phôi tốt.

Kết quả của nghiên cứu này cũng đã chứng minh tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng khi chất lượng của mầm phôi giảm ( $P < 0,05$ ) (bảng 3.21), tuy nhiên đối với nguyên bào lá nuôi thì tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể chỉ tăng có ý nghĩa thống kê khi chất lượng nguyên bào lá nuôi giảm xuống loại C (bảng 3.22). Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Alfarawati và Kroener [90],[91].

Chất lượng mầm phôi kém (loại C-D) là chỉ báo tiên lượng phôi bị lệch bội thể có giá trị cao hơn chất lượng nguyên bào lá nuôi kém (loại C). Giá trị chỉ báo tiên lượng lệch bội thể của mầm phôi loại C-D tương ứng với tỷ số khả năng  $LR^{(+)}=6$ ,  $LR^{(-)}=0,57$  (bảng 3.21) so với khi sử dụng chất lượng của nguyên bào lá nuôi phôi loại C làm chỉ báo lệch bội thể tương ứng với tỷ số khả năng  $LR^{(+)}=2,69$ ,  $LR^{(-)}=0,41$  (bảng 3.22). Điều này phù hợp với những kết luận lâm sàng cho rằng mầm phôi và nguyên bào lá nuôi chất lượng tốt đóng vai trò quan trọng đối với sự phát triển của phôi sau này, cũng như khả năng làm tổ của phôi [185].

#### **4.5. Bàn luận về một số yếu tố liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể qua phân tích đa biến.**

Phân tích đơn biến có giá trị nêu lên được một số yếu tố liên quan làm cho tỷ lệ lệch bội thể tăng và cho phép sử dụng các yếu tố đó như một yếu tố nguy cơ. Tuy nhiên, nguy cơ (RR) của các yếu tố chưa phản ánh đúng với thực tế vì trên thực tế lâm sàng thường có nhiều yếu tố nguy cơ cùng tác động. Do vậy phân tích đa biến sẽ giúp sự đánh giá nguy cơ gần với thực tế hơn.

Nếu lấy kết quả chẩn đoán phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể bằng kỹ thuật a-CGH làm tiêu chuẩn vàng để làm chuẩn nghiên cứu về mối liên quan giữa nhiều yếu tố đã được phân tích trong phần phân tích đơn biến cùng tác động đến phôi gây ra lệch bội nhiễm sắc thể sẽ hợp với qui luật tự nhiên và sẽ là cơ

sở đánh giá hoàn thiện hơn phương pháp chẩn đoán và tiên lượng phôi ngày 3 có giá trị. Từ phương pháp nghiên cứu và phân tích khoa học này có phần nào phức tạp nhưng sẽ làm cơ sở để đề ra một phương pháp đơn giản có giá trị thực thi tại các cơ sở lâm sàng qua các dấu hiệu quan sát phôi ngày 3 để chuyển phôi có hiệu quả, giảm tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tại các cơ sở chưa áp dụng kỹ thuật a-CGH.

**4.5.1. Hai yếu tố: tuổi mẹ và tốc độ phát triển của phôi vào ngày 3 liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.**

Từ phân tích đa biến này, chúng tôi thấy là (1) Khi tuổi mẹ tăng trên 35 tuổi, thì tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cũng tăng theo: tỷ lệ này tăng mạnh có ý nghĩa thống kê khi tuổi mẹ tăng trên 40 tuổi ở cả phôi phát triển bình thường cũng như phôi phát triển nhanh; (2) Đối với phôi phát triển chậm (một chỉ báo quan trọng trong tiên lượng phôi lệch bội nhiễm sắc thể) tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao ở tất cả các lứa tuổi mẹ. Phôi chậm phát triển ở phụ nữ lớn tuổi là chỉ báo tiên lượng phôi lệch bội nhiễm sắc thể rất cao ( $LR^{(+)}=6,75$ ;  $LR^{(-)}=0,76$  khi tuổi mẹ 35-40 tuổi và  $LR^{(+)}=8,75$ ;  $LR^{(-)}=0,88$  khi tuổi mẹ trên 40) (bảng 3.26); (3) Khi phôi phát triển nhanh vào ngày 3, kể cả ở mẹ trẻ tuổi thì khả năng lệch bội nhiễm sắc thể cao hơn phôi phát triển bình thường nhưng thấp hơn ở phôi phát triển chậm. Kết quả này khác với kết quả của Eaton và cộng sự khi cho là tuổi mẹ không có liên quan đến tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi có 7-10 phôi bào với dưới 20% mảnh vụn vào ngày 3 sau thụ tinh và hình thái của phôi ngày 3 (số lượng phôi bào, tỷ lệ mảnh vụn) [186]. Tuy nhiên, nghiên cứu của Eaton sử dụng phương pháp FISH để kiểm tra 9 cặp nhiễm sắc thể của 438 phôi ngày 3 (đồng nghĩa là số phôi của mỗi nhóm tuổi ít). Còn nghiên cứu của tôi sử dụng phương pháp a-CGH cùng lúc đánh giá 23 cặp nhiễm sắc thể và số lượng phôi nghiên cứu của chúng tôi gần gấp 3 lần nên kết quả về mối liên quan giữa tuổi mẹ, tốc độ phát triển của phôi ngày 3



và tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể có độ tin cậy cao hơn. Nhưng nếu chỉ dựa vào 2 yếu tố tuổi mẹ và tốc độ phát triển của phôi thì cũng chưa đủ để chọn lọc phôi bình thường, kể cả ở nhóm bệnh nhân trẻ tuổi, vì tỷ lệ phôi bình thường cũng chỉ là 56,6% ở phôi được cho là phát triển bình thường (7-9 phôi bào ngày 3) (bảng 3.26). Kết hợp 2 yếu tố này có thể tiên lượng thêm 6,3% - 12,9% phôi bình thường so với khi chỉ dựa vào một yếu tố tuổi mẹ trẻ (50,3% phôi bình thường) (bảng 3.10) hay tốc độ phát triển của phôi bình thường (43,7% phôi bình thường) (bảng 3.12).

#### ***4.5.2. Hai yếu tố: số lượng phôi bào và sự có mặt mảnh vụn liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.***

Số lượng phôi bào và tỷ lệ mảnh vụn là hai yếu tố rất quan trọng trong đánh giá hình thái của phôi ngày 3. Từ phân tích đơn biến chúng tôi đã thấy khi có mặt một trong hai yếu tố này thì tiên lượng phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể cũng tăng. Trong thực tiễn lâm sàng, phôi có mặt cả hai yếu tố phát triển bất thường và có nhiều mảnh vụn trong phôi thường có khả năng kết đặc hình thành phôi nang kém, khả năng làm tổ và có thai kém. Vì vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá sự có mặt của hai yếu tố này liên quan đến tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể của phôi có kết quả là: (1) phôi chậm phát triển có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể đều rất cao không phụ thuộc vào tỷ lệ mảnh vụn trong phôi; (2) Đối với phôi tuy có tốc độ phát triển bình thường mà tỷ lệ mảnh vụn tăng thì tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cũng có xu hướng tăng, đặc biệt khi số lượng mảnh vụn tăng trên 5%; tương đương với phôi phát triển nhanh có số lượng mảnh vụn ít hay trung bình; (3) Phôi phát triển nhanh thì tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng cao đáng kể khi phôi có nhiều mảnh vụn (16-30%) thì nguy cơ lệch bội nhiễm sắc thể tăng cao đáng kể, tuy nhiên tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể vẫn thấp hơn so với phôi chậm phát triển (bảng 3.27). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phần nào phù hợp với kết quả của các nghiên cứu

trước đây sử dụng phương pháp FISH [2],[69]. Munne và cộng sự khi sử dụng phương pháp FISH (đánh giá 9 cặp nhiễm sắc thể) kết luận là có sự khác nhau đáng kể về tỷ lệ phôi bình thường ở nhóm phôi phát triển có  $\geq 6$  phôi bào và tỷ lệ mảnh vụn  $<20\%$  so với nhóm phôi phát triển chậm (bất kể tỷ lệ mảnh vụn nhiều hay ít) và nhóm phát triển có  $\geq 6$  phôi bào và nhiều mảnh vụn  $>20\%$  [69]. Trong nghiên cứu của Magli và cộng sự cũng sử dụng phương pháp FISH (đánh giá 8 cặp nhiễm sắc thể) kết luận là khi phôi không có mảnh vụn tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể dường như thay đổi theo số lượng phôi bào. Mặt khác, ở phôi chậm phát triển, không có mối liên quan giữa mảnh vụn và tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể; có thể là do yếu tố chậm phát triển là yếu tố mạnh ảnh hưởng tới lệch bội nhiễm sắc thể. Khi phôi có hình thái tốt (8 phôi bào không có mảnh vụn) thì tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể vẫn gần 50%. Vì vậy, sàng lọc phôi trước làm tổ vẫn là sự lựa chọn tốt nhất hiện nay [2]. Cũng giống kết quả của Magli, trong nghiên cứu của chúng tôi thấy phôi phát triển bình thường không có hay có ít mảnh vụn thì vẫn có gần một nửa số phôi (49,2%) là bị lệch bội nhiễm sắc thể và 50,8% phôi bình thường (bảng 3.27). 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 phôi có ít mảnh vụn (45,9% phôi bình thường) (bảng 3.14) hay tốc độ phát triển của phôi bình thường (43,7% phôi bình thường) (bảng 3.12).

#### ***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 nhiễm sắc thể.***

Phôi có kích thước phôi bào không đều có tỷ lệ có thai thấp, tỷ lệ làm tổ thấp hơn phôi có phôi bào đồng đều [74]. Phôi có kích thước phôi bào không đều thường liên quan đến tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao như đã nêu trong phân tích đơn biến. Tỷ lệ mảnh vụn ở phôi ngày 3 là chỉ báo có giá trị để tiên lượng tình trạng nhiễm sắc thể của phôi [187]. Trong nghiên cứu này

chúng tôi thấy khi phôi có cả 2 yếu tố có mảnh vụn >5% và kích thước phôi bào không đồng đều thì tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng gần 2 lần (bảng 3.28; 3.29), đặc biệt khi những phôi này có nhiều mảnh vụn (16-30%) thì khả năng tiên lượng phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể càng cao tương ứng với tỷ số khả năng  $LR^{(+)}=5,36$  và  $LR^{(-)}=0,66$  (bảng 3.28). Khi kích thước phôi bào đồng đều, số lượng mảnh vụn ít thì tỷ lệ phôi bình thường là 56,4%. Kết hợp 2 yếu tố này có thể tiên lượng thêm 0,5% - 10,5% phôi bình thường so với khi chỉ dựa vào một yếu tố kích thước phôi đồng đều (55,9% phôi bình thường) (bảng 3.13) hay chỉ dựa vào phôi có ít mảnh vụn (45,9% phôi bình thường) (bảng 3.14). Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với kết quả của Moayeri và cộng sự khi họ thấy rằng phôi có kích thước phôi bào đồng đều không có hay có ít mảnh vụn (dưới 10%) tương đương với tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể thấp nhất. Tỷ lệ mảnh vụn ở phôi ngày 3 là chỉ số có giá trị hơn để tiên lượng tình trạng nhiễm sắc thể của phôi [187].

***4.5.4. Ba yếu tố: số lượng phôi bào, độ đồng đều và sự có mặt của mảnh vụn liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.***

Số lượng phôi bào, độ đồng đều về kích thước của phôi bào cũng như tỷ lệ mảnh vụn là 3 yếu tố rất quan trọng để đánh giá chất lượng hình thái của phôi giai đoạn phân chia trong bất kể hệ thống đánh giá phôi nào. Trong nghiên cứu này chúng tôi thấy khi phôi phát triển quá nhanh hay chậm, có kích thước phôi bào không đều và có tỷ lệ mảnh vụn trung bình hay nhiều thì tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng trên 2 lần so với phôi bình thường, có kích thước phôi bào đều và ít mảnh vụn (bảng 3.30; 3.31). Khi kết hợp cả 3 yếu tố trong đó có yếu tố mảnh vụn >15% này thì khả năng tiên lượng phôi bị lệch bội thể cao tương ứng với tỷ số khả năng  $LR^{(+)}= 12$  và  $6,75$ ;  $LR^{(-)}= 0,88$  và  $0,76$  tương ứng với phôi phát triển nhanh và chậm (bảng 3.30). Tuy nhiên khi phôi phát triển bình thường, kích thước phôi bào đồng đều, có ít mảnh vụn,

thì tỷ lệ phôi bình thường là 61,8% (bảng 3.31). Kết hợp 3 yếu tố có thể tiên lượng thêm khoảng 6,1% - 18,1% phôi bình thường so với khi chỉ dựa vào một yếu tố như kích thước phôi đồng đều (55,9% phôi bình thường) (bảng 3.15) hay phôi có ít mảnh vụn (45,9% phôi bình thường) (bảng 3.16), hay tốc độ phát triển của phôi bình thường (43,7% phôi bình thường) (bảng 3.14).

**4.5.5. Ba yếu tố: số lượng phôi bào, sự có mặt mảnh vụn và vị trí mảnh vụn liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.**

Đối với phôi chậm phát triển, có số lượng mảnh vụn >5% nằm rải rác thì tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng gần 2,5 lần so với phôi phát triển bình thường có ít mảnh vụn nằm tập trung. Khi kết hợp cả 3 yếu tố này thì khả năng tiên lượng phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể cao tương ứng với tỷ số khả năng  $LR^{(+)} = 5,74$ ,  $LR^{(-)} = 0,5$  (bảng 3.33). Đối với phôi phát triển nhanh thì khi mảnh vụn nhiều hơn (>5%) nằm rải rác thì tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cũng tăng 2 lần so với phôi phát triển bình thường, mảnh vụn  $\leq 5\%$  nằm tập trung.

Kết hợp cả 3 yếu tố phôi phát triển nhanh, có số lượng mảnh vụn >5% nằm rải rác này thì khả năng tiên lượng phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể trung bình tương ứng với tỷ số khả năng  $LR^{(+)} = 2,84$  và  $LR^{(-)} = 0,6$  (bảng 3.33). Tuy nhiên nếu mảnh vụn tăng trên 15%, thì có giá trị tiên lượng phôi lệch bội nhiễm sắc thể cao với  $LR^{(+)} = 5,61$  và  $LR^{(-)} = 0,8$  (bảng 3.32). Kết quả này cũng gần giống với kết quả của Magli và cộng sự khi sử dụng phương pháp FISH (phân tích 8 cặp nhiễm sắc thể) thấy là ở phôi 7-8 phôi bào, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao hơn ở phôi có 21-40% mảnh vụn khi mảnh vụn nằm rải rác so với mảnh vụn nằm tập trung [2]. Phôi phát triển bình thường có ít mảnh vụn nằm tập trung, tỷ lệ phôi bình thường là 63,8%. Kết hợp 3 yếu tố có thể tiên lượng thêm khoảng 3,9% - 20,1% phôi bình thường so với khi chỉ dựa vào một yếu tố như mảnh vụn nằm tập trung (59,9% phôi bình thường) (bảng

3.15) hay phôi có ít mảnh vụn (45,9% phôi bình thường) (bảng 3.14), hay tốc độ phát triển của phôi bình thường (43,7% phôi bình thường) (bảng 3.12).

Tóm lại khi kết hợp càng nhiều yếu tố thì khả năng chọn lọc phôi không bị lệch bội nhiễm sắc thể càng cao. Tuy nhiên có một số yếu tố đơn biến cũng có giá trị tiên lượng phôi bị lệch bội nhiễm sắc thể cao như tuổi mẹ trên 40; Phôi phát triển chậm vào ngày 3 và ngày 5 và chất lượng của phôi nang kém (xem bảng 3.34 xếp thứ tự về giá trị tiên lượng dự đoán lệch bội nhiễm sắc thể của các chỉ báo từ cao xuống thấp sau khi phân tích đơn biến và đa biến).

## 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:

### Mục tiêu 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 (3,3%-8,4%); cao nhất là cặp 22.

- 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 47,8% xuống 22% và 0% tương ứng lần lượt với tuổi mẹ dưới 35 tuổi, 35-40 tuổi và trên 40 tuổi.

### Mục tiêu 2. Một số yếu tố liên quan với lệch bội nhiễm sắc thể

- Bệnh nhân vô sinh có tiền sử thất bại điều trị thụ tinh trong ống nghiệm, rối loạn phóng noãn, buồng trứng đa nang, tinh trùng bất thường và không rõ nguyên nhân tương ứng lần lượt với tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể là 66,7%; 60,3%; 61,7% và 65,9%.

- Tuổi mẹ dưới 35, 35-40 và trên 40 tương ứng với tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng dần từ 49,7% lên 70,7% và 90%.

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

- Phôi phát triển chậm hay nhanh có tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng tương ứng là 83,1% và 65,7% (so với phôi phát triển bình thường là 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 (tương ứng 81,6%; 75,1% và 77,6%).

- 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 (66,7% so với 28,7%).

- Chất lượng của mầm phôi giảm từ loại A xuống loại B, C tương ứng với tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng từ 29,5% lên 46,3% và 80,6%.

- Chất lượng của nguyên bào lá nuôi giảm xuống loại C tương ứng với tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể tăng 79,8% so với 38% (loại A-B).

- 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: 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%.

- \* Phôi chậm phát triển và có mảnh vụn >5 %, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể 86,2%.

- \* Kích thước phôi bào không đều và có mảnh vụn >15 %, tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể cao 86,3%.

- \* Tốc độ phát triển của phôi chậm/nhanh, phôi bào không đều, mảnh vụn > 5% làm tăng tỷ lệ lệch bội thể tương ứng là 86,1% và 80,6%.

- \* 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%.

## NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA NGHIÊN CỨU

1. Áp dụng phương pháp a-CGH là phương pháp hiện đại xét nghiệm cho toàn bộ 23 đôi nhiễm sắc thể của 1257 phôi cho kết quả khá chính xác về tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể của phôi ngày 3 và các yếu tố liên quan đến lệch bội nhiễm sắc thể.
2. Xác định được giá trị của một số chỉ báo quan trọng và khoa học để dự đoán phôi lệch bội nhiễm sắc thể dựa vào phân tích đơn biến, đa biến kết hợp với phân tích tỷ số khả năng LR. Những chỉ báo này có giá trị ứng dụng lâm sàng cao.
3. Chứng minh được khả năng tự sửa chữa của phôi ngày 3 khi phát triển thành phôi nang và khả năng này liên quan chặt chẽ với tuổi mẹ.



## KIẾN NGHỊ

Do tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể của phôi ngày 3 tương đối cao và có nhiều yếu tố liên quan đến tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể của phôi, khi chọn lọc phôi đặc biệt ở các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm chưa thực hiện được kỹ thuật sàng lọc phôi trước làm tổ cần phải chú ý đến những chỉ báo tiên lượng phôi lệch bội nhiễm sắc thể có giá trị cao; kết hợp đánh giá các yếu tố cùng một lúc (xếp hạng trong bảng 3.34) để có khả năng chọn phôi ít bị rối loạn nhiễm sắc thể hơn.

Tiến hành nuôi cấy và chuyển phôi vào giai đoạn phôi nang giúp cho khả năng lựa chọn phôi ít bị lệch bội nhiễm sắc thể cao hơn.

Đồng thời 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.

Mặc dù có mối liên quan giữa hình thái, tốc độ phát triển của phôi nhưng mối liên quan này không hoàn toàn chặt chẽ, phôi có hình thái và tốc độ phát triển tốt vẫn có khả năng bị lệch bội nhiễm sắc thể khá cao. Vì vậy, hiện nay sàng lọc trước làm tổ vẫn là phương pháp có khả năng chẩn đoán phôi lệch bội nhiễm sắc 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 lệch bội nhiễm sắc thể, góp phần chọn phôi ít bị lệch bội nhiễm sắc thể 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 nhiễm sắc thể của phôi ở giai đoạn phôi nang (sinh thiết nguyên bào lá nuôi) nhằm 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...

Nghiên cứu sinh thiết lại phôi ngày 3 bị lệch bội nhiễm sắc thể ở giai đoạn phôi nang nhiều hơn để tìm ra thêm các yếu tố liên quan đến khả năng tự sửa chữa của phôi như chất lượng của phôi nang, mức độ lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3, tình trạng lệch bội nhiễm sắc thể: thể đơn nhiễm (monosomy) hay thể tam nhiễm (trisomy).

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Littman E, La A, Harris D, Lopez C, **Phan V** (2012). Comprehensive genomic screening reanalysis of day 5 and day 6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3. *Fertility and Sterility*, 98, S138.
2. **Phan V**, Littman E, Harris D, Lopez C, La A (2012). Correlation between embryo morphology and development and chromosomal complement. *Fertility and Sterility*, 98, 3, S227.
3. Littman E, **Phan V**, Harris D, Lopez C, La A (2012). Age related correction of mosaicism in day 5 and day 6 blastocysts reanalyzed for aneuploidy. *Fertility and Sterility*, 98, 3, S283.
4. Littman E, **Phan V**, Harris D, Severino M, La A (2013). Blastocysts formed on day 5 have more chance to be euploid. *Fertility and Sterility*, 100, 3, S526.
5. **Phan V**, Littman E, Harris D, Severino M, La A (2013). Correlation between aneuploidy and blastocyst quality. *Fertility and Sterility*, 100, 3, S525-526.
6. **Phan V**, Littman E, Harris D, Severino M, La A (2013). Can day 3 serum follicle stimulating hormone be a predictor for embryo aneuploidy rate? *Fertility and Sterility*, 100, 3, S504.
7. **Vy Phan**, Eva Littman, Dee Harris, Antoine La (2014). Correlation between embryo morphology and development and chromosomal complement. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 3, 85-89.

8. **Vy Phan**, Eva Littman, Dee Harris, Antoine La (2014). Correlation between aneuploidy and blastocyst quality. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 3, 253-257.
9. Littman E, **Phan V**, Harris D, Severino M, La A (2014). The most frequent aneuploidies in human embryo are similar to those observed in the early pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, 102, 3, e344.
10. **Phan Thị Khánh Vy**, Eva Littman, Nguyễn Thị Bình (2014). Liên quan giữa hình thái, sự phát triển phôi tạo ra trong ống nghiệm và tỷ lệ lệch bội thể. *Y học Việt nam*, 424, 165-169.

## DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vernon M, Stern J.E, Ball G D et al (2011). Utility of the national embryo morphology data collection by the Society for Assisted Reproductive Technologies (SART): correlation between day 3 morphology grade and live birth outcome. *Fertility and Sterility*, 95, 2761-2763.
2. Magli C, Giannaroli L, Ferraretti A.P et al (2007). Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertility and Sterility*, 87, 534-541.
3. Nicoli A, Capodanno F, Valli B et al (2010). Impact of insemination technique, semen quality and oocyte cryopreservation on pronuclear morphology of zygote derived from sibling oocytes. *Zygote*, 18(1), 61-68.
4. Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen A.L (2012). The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Human Reproduction*, 27(9), 2649-2657.
5. Debec A, Sullivan W, Bettencourt M (2010). Centrioles: active players or passengers during mitosis?. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 2173-2194.
6. Niakan K, Han J, Roger A et al (2012). Human pre-implantation embryo development. *Development*, 139, 829-841.
7. Figueira R, Selti A, Baraga D et al (2010). Blastomere multinucleation: Contributing factors and effects on embryo development and clinical outcome. *Human Fertility*, 13(3), 143-150.

8. Vergouw C, Nofal M, Kosteljik H et al (2013). The association of the blastomere volume index (BVI), the blastomere symmetry index (BSI) and the mean ovality (MO) with ongoing implantation after single embryo transfer. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(4), 587-592.
9. Magli C, Jones G, Lundin K et al (2012). Atlas of human embryology: from oocytes to preimplantation embryos. *Human Reproduction*, 27(supl 1), 2-21.
10. Magli M.C, Gianaroli L, Ferrareti A.P (2001). Chromosomal abnormalities in embryos. *Molecular Cell Endocrinology*, 183, 29-34.
11. Ray P.F, Conaghan J, Winston R.M et al (1995). Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following in vitro fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility*, 104, 165-171.
12. Dumoulin J, Derhaag J, Bras M et al (2005). Growth rate of human preimplantation embryos is sex dependent after ICSI but not after IVF. *Human Reproduction*, 20(2), 484-491.
13. Lee M, Lee R, Lin M et al (2012). Cleavage speed and implantation potential of early-cleavage embryos in IVF or ICSI cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(8), 745-750.
14. Iwata K, Yumoto K, Sugishima M et al (2014). Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(4), 421-426.
15. Ivec M, Kovacic B, Vlasisavljevic V (2011). Prediction of human blastocyst development from morulas with delayed and/or incomplete compaction. *Fertility and Sterility*, 96(6), 1473-1478.

16. Xu K and Montag M (2012). New perspectives on embryo biopsy: not how, but when and why?. *Seminars in Reproductive Medicine*, 30(4), 259-266.
17. Scott L.A (2000). Oocyte and embryo polarity. *Seminars in Reproductive Medicine*, 18, 171-183.
18. Hardy K, Handyside A.H, Winston R.M (1989). The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development*, 107, 597-604.
19. Alpha Scientists in Reproductive medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*, 26, 1270-1283.
20. Gardner D.K, Lane M, Stevens J et al (2000). Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility*, 73, 1155-1158.
21. Sher G, Keskindepe L, Keskindepe M et al (2007). Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization [correction of hybridization] provides a highly reliable method for selecting competent embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study. *Fertility and Sterility*, 87, 1033–1040.
22. Munne S, Held K, Magli C et al (2012). Intra-age, intercenter, and intercycle differences in chromosome abnormalities in oocytes. *Fertility and Sterility*, 97, 935-942.
23. Martin R.H, Ko E, Rademaker A (1991). Distribution of aneuploidy in human gametes: comparison between human sperm and oocytes. *American Journal of Medicine and Genetics*, 39, 321-331.

24. Shi Q, Martin R.H (2000). Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 90, 219-226.
25. Egozcue S, Blanco J, Vidal F et al (2002). Diploid sperm and the origin of triploidy. *Human Reproduction*, 17, 5-7.
26. Delhanty J.D, Griffin D.K, Handyside A.H et al (1993). Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation, (FISH). *Human Molecular of Genetics*, 2, 1183–1185.
27. Harper J.C, Coonen E, Handyside A.H et al (1995). Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, onospermic preimplantation human embryos. *Prenatal Diagnostics*, 15, 41–49.
28. Daphnis D.D, Delhanty J.D, Jerkovic S et al (2005). Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy. *Human Reproduction*, 20, 129–137.
29. Baart E.B, Martini E, Van den Berg I et al (2006). Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Human Reproduction*, 21, 223–233.
30. Ziebe S, Lundin K, Loft A et al (2003). FISH analysis for chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X and Y in all blastomeres of IVF pre-embryos from 144 randomly selected donated human oocytes and impact on pre-embryo morphology. *Human Reproduction*, 18, 2575–2581.



31. Van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkes Raddatz B et al (2011). Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 17 (5), 620-627.
32. Bean C.J, Hassold T.J, Judis L et al (2002). Fertilization in vitro increases non- isjunction during early cleavage divisions in a mouse model system. *Human Reproduction*, 17, 2362–2367.
33. Baart E.B, Martini E, Eijkemans M.J et al (2007). Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Human Reproduction*, 22, 980–988.
34. Baart E.B, Berg I.V.D, Martini E et al (2007). FISH analysis of 15 chromosomes in human day 4 and 5 preimplantation embryos: the added value of extended aneuploidy detection. *Prenatal Diagnostics*, 27, 55–63.
35. Santos M.A, Teklenburg G, Macklon N.S et al (2010). The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of Day 4, 5 and 8 human embryos. *Human Reproduction*, 25, 1916–1926.
36. Griffin D.K (1992). Dual fluorescent in situ hybridisation for simultaneous detection of X and Y chromosome-specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Human Genetic*, 89, 18–22.
37. Colls P, Escudero T, Cekleniak N et al (2007). Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using ‘no result rescue’. *Fertility and Sterility*, 88, 53–61.

38. Wells D and Delhanty J (1996). Evaluating comparative genomic hybridisation (CGH) as a strategy for preimplantation diagnosis of unbalanced chromosome complements. *European Journal of Human Genetic*, 4(Suppl 1): 125.
39. Wells D and Delhanty J (2000). Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Molecular Human Reproduction*, 6, 1055–1062.
40. Wells D, Bermudez M.G, Steuerwald N et al (2004). Microarrays for analysis and diagnosis of human embryos. *Recent Advances in Prenatal Genetic Diagnosis*, Medimond, Bologna, 9–17.
41. Gutierrez C and Munne S (2011). Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertility and Sterility*, 95(3), 953-958.
42. Mariona R and Joaquina N (2011). Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age–related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization. *Fertility and Sterility*, 95(1), 413-441.
43. Gianaroli L, Magli M.C, Ferraretti A.P et al (2003). Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertility and Sterility*, 80, 341–349.
44. Chen C.K, Shen G.Y, Hong S.G et al (2003). The relationship of pronuclear stage morphology and chromosome status at cleavage stage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 20, 413-420.
45. Balaban B, Yakin K, Urman B et al (2004) Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. *Reproductive Biomedicine Online*, 8, 695–700.

46. Al-Asmar N, Peinado V, Vera M et al (2012). Chromosomal abnormalities in embryos from couples with a previous aneuploidy miscarriage. *Fertility and Sterility*, 98, 145-150.
47. Rabinowitz M, Ryan A, Gemelos G et al (2012). Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres. *Fertility and Sterility*, 97, 395-401.
48. Rubio C, Bellver J, Rodrigo L et al (2013). Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertility and Sterility*, 99, 1400-1407.
49. Rubio C, Rodrigo L, Mir P et al (2013). Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertility and Sterility*, 99, 1044-1048.
50. Nguyễn Việt Tiến và Nguyễn Thị Minh (2014). Bước đầu đánh giá kết quả chẩn đoán di truyền tiền làm tổ tại bệnh viện phụ sản trung ương. *Tạp chí phụ sản*, 12, 173-175.
51. Hoàng Thị Hương, Nguyễn Việt Tiến và Đặng Thu Hằng (2014). Ứng dụng kỹ thuật FISH trong sàng lọc một số lệch bội nhiễm sắc thể cho chẩn đoán di truyền tiền làm tổ. *Tạp chí phụ sản*, 12, 176-178.
52. Schoolcraft W, Fragouli E, Stevens J et al (2010). Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertility and Sterility*, 94, 1700-1706.
53. Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S et al (2010). Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertility and Sterility*, 94, 875-887.

54. Traversa M.V, Marshall J, McAthur S et al (2011). The genetic screening of preimplantation embryos by comparative genomic hybridization. *Reproductive Biology*, 11 (suppl 3), 51-60.
55. Mertzaniidou A, Wilton L, Cheng J et al (2013). Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Human Reproduction*, 28, 256–264.
56. Fragouli E, Alfarawati S, Daphnis D.D et al (2011). Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Human Reproduction*, 26, 480–490.
57. Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M (2001). Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Human Reproduction*, 16, 1954–1958.
58. Li M, DeUgarte C.M, Surrey M et al (2005). Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3. *Fertility and Sterility*, 84, 1395–1400.
59. Fragouli E, Lenzi M, Ross R et al (2008). Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Human Reproduction*, 23, 2596–2608.
60. Barbash-Hazan S, Frumkin T, Malcov M et al (2009). Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertility and Sterility*, 92, 890–896.
61. Vassena R, Boue S, Gonzalez-Roca E et al (2011). Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development*, 138, 3699–3709.

62. Munne S, Alikani M, Tomkin G (1995) Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertility and Sterility*, 64, 382-391.
63. Alikani M, Calderon G, Tomkin G (2000). Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in vitro. *Human Reproduction*, 15, 2634-2643.
64. Racowsky C, Combelles C.M.H, Nureddin A (2003). Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reproductive BiMedicine Online*, 6, 323-331.
65. Finn A, Scott L, Leary T et al (2010). Sequential embryo scoring as a predictor of aneuploidy in poor-prognosis patients. *Reproductive BiMedicine Online*, 21, 381-390.
66. Munne S, Sandalinas M, Cohen J (2001). Chromosome abnormalities in human embryos. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Laboratory and Clinical Perspective*, Martin Dunitz, London, 297-318.
67. Munne S and Cohen J (2002). Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reproductive Biomedicine online*, 4 (3), 223-232.
68. Munne S, Velilla E, Colls P (2005). Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implications for stem cell production. *Fertility and Sterility*, 84, 1328–1334.
69. Munne S, Chen S, Colls P et al (2007). Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reproductive Biomedicine Online*, 14, 628–634.
70. Coonen E, Derhaag J.G, Dumoulin J.C.M (2004). Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. *Human Reproduction*, 19, 316–324.

71. Evsikov S and Verlinsky Y (1998). Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Human Reproduction*, 11, 3151–3155.
72. Magli M.C, Jones G.M, Gras L (2000). Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that developed to morphologically normal blastocyst in vitro. *Human Reproduction*, 15, 1781-1786.
73. Rubio C, Simon C, Vidal F (2003). Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples”. *Human Reproduction*, 18, 182-188.
74. Hardarson T, Hanson C, Sjogren A (2001). Human embryos with uneven sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indication for aneuploidy and multinucleation. *Human Reproduction*, 16, 313-318.
75. Munne S and Cohen. J (1998). Chromosome abnormalities in human embryos. *Human Reproduction Update*, 4 (6), 842-855.
76. Balakier H and Cadesky K (1997). The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Human Reproduction*, 12, 800–804.
77. Meriano J, Clark C, Cadesky K et al (2004). Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reproductive BioMedicine Online*, 9, 511–520.
78. Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M (2003). Multinucleation in cleavage stage embryos. *Human Reproduction*, 18, 1062–1069.
79. Munne S, Magli C, Adler A (1997). Treatment-related chromosome abnormalities in human embryos, *Human Reproduction*, 12, 780–784.

80. Walmsley R (2007). Multinucleation and mosaicism in the human preimplantation embryo. *Human preimplantation embryo selection*, first edition, Informal Health care, Lodon, 41-50.
81. Jackson K.V, Ginsburg E.S, Hornstein D (1998). Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertility and Sterility*, 70, 60–66.
82. Kligman I, Benadiva C, Alikani M et al (1996). The presence of multinucleated blastomeres in human embryos correlates with chromosomal abnormalities. *Human Reproduction*, 11, 1492–1498.
83. Laverge H, De Sutter P, Verschraegen-Spae M.R (1997). Triple colour fluorescent in situ hybridization for chromosomes X, Y and 1 on spare human embryos. *Human Reproduction*, 12, 809–814.
84. Staessen C and Van Steirteghem A.C (1998). The genetic constitution of multinucleated blastomeres and their derivative daughter blastomeres. *Human Reproduction*, 13, 1625–1631.
85. Alikani M, Cohen J, Tomkin G (1999). Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertility and Sterility*, 71, 836–842.
86. Balakier H, Bouman D, Sojecki A (2002). Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Human Reproduction*, 17, 2394-2401.
87. Munne S, Weier H.U.G, Grifo J et al (1994). Chromosome mosaicism in human embryos. *Biology of Reproduction*, 51, 373-379.

88. Esfandiari N, Ryan E.A.J, Gotlieb L et al (2005). Case report: successful pregnancy following transfer of embryos from oocytes with abnormal zona pellucida and cytoplasm morphology. *Reproductive BioMedicine Online*, 11, 555-561.
89. Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D et al (2014). Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Human Reproduction*, 29, 1173-1181.
90. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P et al (2011). The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertility and Sterility*, 95, 520-524.
91. Kroener L, Ambartsumyan G, Briton-Jones C et al (2012). The effect of timing of embryonic progression on chromosomal abnormality. *Fertility and Sterility*, 98, 876-880.
92. Gianaroli L, Magli M.C, Ferraretti A.P (2001). The role of preimplantation diagnosis for aneuploidy. *Reproductive BioMedicine Online*, 4, 31-36.
93. Biljan M.M, Buckett W.M, Dean N et al (2000). The outcome of IVF-embryo transfer treatment in patients who develop three follicles or less. *Human Reproduction*, 15(10), 2140-2144.
94. Khalifa E, Toner JP, Muasher S.J et al (1992). Significance of basal follicle-stimulating hormone levels in women with one ovary in a program of in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 57, 835–839.
95. Kline J, Kinney A, Levin B et al (2000). Trisomic pregnancy and early age of menopause. *American Journal of Human Genetics*, 67, 395–404.



96. Van Montfrans J.M, Dorland M, Oosterhuis G.J.E (1999). Increased concentrations of follicle-stimulating hormone in mothers of children with Down's syndrome. *Lancet*, 353, 1853-1854.
97. Reis Soares S, Rubio C, Rodrigo L (2003). High frequency of chromosomal abnormalities in embryos obtained from oocyte donation cycles. *Fertility and Sterility*, 80, 656-657.
98. Sadowy S, Tomkin G, Munne S (1998), Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote*, 6, 137-141.
99. Fasolino M.C, Ferraretti A.P, Farfalli V.I et al (2007). Incidence of oocyte aneuploidy by first polar body FISH analysis in relation to the type of GnRH analogue. *Human Reproduction*, 22 (suppl 1), 82.
100. Mansour G, Sharma R.K, Agarwal A et al (2010). Endometriosis-induced alterations in mouse metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: a possible cause of infertility. *Fertility and Sterility*, 94(5), 1894-1899.
101. Weghofer A, Munne S, Chen S et al (2007). Lack of association between polycystic ovary syndrome and embryonic aneuploidy. *Fertility and Sterility*, 88, 900-905.
102. Warburton D (1989). The effect of maternal age on the frequency of trisomy: change in meiosis or in utero selection?. *Progress in Clinical Biology Research*, 311, 165-168.
103. Munne S, Sandalinas M, Magli M.C et al (2004). Increased rate of aneuploidy embryos in young women with previous aneuploidy conceptions. *Prenatal Diagnosis*, 24, 638-643.
104. Fragouli E, Escalona A, Gutierrez-Mateo C et al (2009). Comparative genomic hybridization of oocytes and first polar bodies from young donors. *Reproductive Biomedicine Online*, 19, 228-237.

105. Pickering S.J, Braude P.R, Johnson M.H et al (1990). Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertility and Sterility*, 54, 102-108.
106. Cohen J, Gilligan A, Esposito W et al (1997). Ambient air and its potential effects on conception. *Human Reproduction*, 12, 1742-1749.
107. Veek L (1999). The cleaving human embryo. *An atlas of human Gametes and conceptuses*, Parthenon, New York, 40-45.
108. Adams C, Anderson L, Wood S (2007). Paternal Factors, Specifically Low Sperm Motility, and High Levels of Moderate DNA Damage Predict Increased Rates of Aneuploidy in Embryos from Egg Donor Cycles. *Fertility and Sterility*, 87 (4), (suppl 2), S7.
109. Munne S, Sandalinas M, Alikani M et al (2004). Chromosome abnormalities in human embryo. *Textbook of Assisted Reproduction*, second edition, Martin Dunitz, London, 355-377.
110. Dailey T, Dale B, Cohen J et al (1996). Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *American Journal of Human Genetics*, 59, 176-84.
111. Fragouli E, Wells D, Thornhill A et al (2006). Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Human Reproduction*, 21, 2319-2328.
112. Selva J, Martin Pont B, Hugues J.N et al (1991). Cytogenetic study of human oocytes uncleaved after in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, 6, 709-713.
113. Angell R.R, Xian J, Keith J (1993). Chromosome anomalies in human oocytes in relation to age. *Human Reproduction*, 8, 1047-1054.

114. Gutierrez-Mateo C, Benet J, Wells D et al (2004). Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis. *Human Reproduction*, 19, 2859-2868.
115. Kuliev A, Cieslak J, Ilkevitch Y et al (2003). Chromosomal abnormalities in a series of 6,733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reproductive Biomedicine Online*, 6, 54-59.
116. Shi Q, Ko E, Barclay L (2001). Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. *Molecular of Reproduction and Development*, 59(4), 417-421.
117. Vorsanova S.G (2008). Maternal smoking as a cause of mosaic aneuploidy in spontaneous abortions. *Medical Hypotheses*, 71, 607-612.
118. Branch D.W and Hauser C (2010). Recurrent miscarriage, *Reproductive Endocrinology and infertility: Integrating Modern Clinical and Laboratory Practice*, Springer, London, 281-296.
119. Liebaers I, Desmyttere S, Verpoest W et al (2010). Report on a consecutive series of 581 children born after Blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Human Reproduction*, 25, 275-282.
120. Schoolcraft W.B, Fragouli E, Stevens J et al (2009). Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertility and Sterility*, 94, 1700–1706.
121. Scott R, Upham K, Forman E et al (2013). Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*, 100, 697-703.

122. Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C et al (2007). Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia: a pilot study. *Human Reproduction*, 22, 1443-1449.
123. Cieslak-Janzen J, Tur-Kaspa I, Ilkevitch Y et al (2006). Multiple micromanipulations for preimplantation genetic diagnosis do not affect embryo development to the blastocyst stage. *Fertility and Sterility*, 85, 1826-1829.
124. Vu T.B, Bui T.K.Y, Tran D.H et al (2012). Validation of preimplantation genetic screening competence and safety as a prelude to preimplantation genetic diagnosis approval in Vietnam. *Reproductive Biomedicine Online*, 24, suppl 2, S55.
125. Nguyễn Ngọc Diệp, Nguyễn Thanh Tùng và Quân Hoàng Lâm (2013). Kết quả bước đầu nghiên cứu hình thái phôi sau sinh thiết để chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi. *Tạp chí Y-Dược học quân sự*, 6, 33-38.
126. Nguyen N.D, Nguyen T.T, Nguyen D.T et al (2013). Study on some factors affecting embryo morphology after biopsy for genetic diagnosis before embryo transfer. *Journal of Military Pharmacology*, 7, 50-57.
127. Scott R.T Jr, Upham K., Forman E.J et al (2013). Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertility and Sterility*, 100, 624-630.
128. Brezina P, Sun Y, Anchan M et al (2012). Aneuploid embryos as determined by 23 single nucleotide polymorphism (SNP) microarray preimplantation genetic screening (PGS) possess the potential to genetically normalize during early development. *Fertility and Sterility*, 98, S108.

129. Brezina P, Ke R, and Kuttah W (2013). Preimplantation Genetic Screening: A Practical Guide. *Clinical Medicine Insights Reproductive Health*, 7, 37-42.
130. Novik V, Moulton E, Sisson M et al (2014). The accuracy of chromosomal microarray testing for identification of embryonic mosaicism in human blastocysts. *Molecular Cytogenetics*, 7: 18, 1-9.
131. Adler A, Lee H, McCulloh d et al (2014). Blastocyst culture selects for euploid embryos: comparison of blastomere and trophectoderm biopsies. *Reproductive BioMedicine Online*, 28, 485-491.
132. Keltz M, Vega M, Sirota I et al (2013). Preimplantation Genetic screening (PGS) with comparative genomic hybridization (CGH) following day 3 single cell blastomere biopsy markedly improves IVF outcomes while lowering multiple pregnancies and miscarriage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30, 1333-1339.
133. Franasiak J, Forman E, Hong K et al (2014). Aneuploidy across individual chromosomes at the embryonic level in trophectoderm biopsies: changes with patient age and chromosome structure. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31, 1501-1509.
134. Thornhill A.R, deDie-Smulders C.E, Geraedts J.P et al (2005). ESHRE PGD Consortium “Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS). *Human Reproduction*, 20, 35-48.
135. Peura T, Bosman A, Chami O et al (2008). Karyotypically normal and abnormal human embryonic stem cell lines derived from PGD-analyzed embryos. *Cloning Stem Cells*, 10, 203-216.

136. Mantikou E, Wong K.M, Repping S et al (2012). Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822, 1921-1930.
137. Sirchia S.M, Garagiola I, Colucci G et al (1998). Trisomic zygote rescue revealed by DNA polymorphism analysis in confined placental mosaicism. *Prenatal Diagnostics*, 18, 201–206.
138. Hsu LY, Kaffe S, Perlis TE (1991). A revisit of trisomy 20 mosaicism in prenatal diagnosis—an overview of 103 cases. *Prenatal Diagnostic*, 11, 7–15.
139. Johnson D.S, Cinnioglu C, Ross R et al (2010). Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. *Molecular of Human Reproduction*, 16, 944-949.
140. Rubio C, Rodrigo L, Mercader A et al (2007). Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenatal Diagnosis*, 27, 748-756.
141. Capalbo A, Wright G, Elliott T et al (2013). FISH reanalysis of inner cell mass and trophectoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage. *Human Reproduction*, 28, 2298-2307.
142. Hanson C, Hardarson T, Lundin K et al (2009). Re-analysis of 166 embryos not transferred after PGS with advanced reproductive maternal age as indication. *Human Reproduction*, 24, 2960-2964.
143. Delhanty J.D.A (2005). Mechanisms of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis. *Cytogenetic and Genome Research*, 111, 237–244.

144. Wilding M, De Placido G, De Matteo L et al (2003). Chaotic mosaicism in human preimplantation embryos is correlated with a low mitochondrial membrane potential. *Fertility and Sterility*, 79, 340–346.
145. Gianaroli L, Magli M.C, Cavallini G et al (2010). Predicting aneuploidy in human oocytes: key factors which affect the meiotic process. *Human Reproduction*, 25, 2374-2386.
146. Magli M.C, Gianaroli L, Ferraretti A.P et al (2009). Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos. *Reproductive Biomedicine Online*, 18, 536-542.
147. Harton G and Tempest H (2012). Chromosomal disorders and male infertility. *Asian Journal of Andrology*, 14, 32-39.
148. Bonduelle M, Van Assche E, Joris H et al (2002). Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Human Reproduction*, 17, 2600-2614.
149. Schwartz D and Mayaux M.J (1982). Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands, Federation CECOS. *New England Journal of Medicine*, 306, 404-406.
150. Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology: 2012 assisted reproductive technology - fertility clinic success rates report. Atlanta (GA): CDC (2014). Available at: [http://www.cdc.gov/art/ART2012/PDF/ART\\_2012\\_Clinic\\_Report-Full.pdf](http://www.cdc.gov/art/ART2012/PDF/ART_2012_Clinic_Report-Full.pdf) [Accessed 13 October 2014].
151. American College of Obstetricians and Gynecologists – Committee on Gynecologic Practice and Practice Committee (2014). Female age-related fertility decline. Committee Opinion No.589. *Fertility and Sterility*, 101, 633-634.

152. Franasiak J, Forman E, Hong K et al (2014). The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertility and Sterility*, 101, 656-663.
153. Wagner-Coughlin C, Kaplan B, Maravilla A et al (2008). Preimplantation genetic screening (PGS) in donor egg cycles: evidence for a beneficial effect. *Fertility and Sterility*, 90, S308.
154. Forman E.J, Hong K.H, Ferry K.M et al (2013). In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*, 100, 100-107.
155. Nasser A, Mukherjee T, Grifo J et al (1999). Elevated day 3 serum follicle stimulating hormone and/or estradiol may predict fetal aneuploidy. *Fertility and Sterility*, 71, 715-718
156. El-Toukhy T, Khalaf Y, Hart R et al (2002). Young age does not protect against the adverse effects of reduced ovarian reserve—an eight year study. *Human Reproduction*, 17, 1519-24.
157. Thum M, Abdalla H, Taylor D (2008). Relationship between women's age and basal folliclae-stimulating hormone levels with aneuploidy risk in in vitro fertilization treatment. *Fertility and Sterility*, 90, 315-321.
158. Shapiro B, Richter K, Harris D et al (2000). Predictive value of 72-hour blastomere cell number on blastocyst development and success of a subsequent transfer based on the degree of blastocyst development. *Fertility and Sterility*, 73, 582-586.
159. Van Royen E, Mangelshots K, De Neuborg D et al (2001). Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. *Human Reproduction*, 16, 326-332.



160. Racowsky C, Stern J.E, Gibbons W. et al (2011). National collection of embryo morphology data into Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System: associations among day 3 cell number, fragmentation and blastomere asymmetry, and live birth rate. *Fertility and Sterility*, 95, 1985-1989.
161. Luna M, Copperman A, Duke M et al (2008). Human blastocyst morphological quality is significantly improved in embryos classified as fast on day 3 ( $\geq 10$  cells), bringing into question current embryological dogma. *Fertility and Sterility*, 89, 358-363.
162. Le Cruguel S, Ferre-L'Hotellier V, Moriniere C et al (2013). Early compaction at day 3 may be a useful additional criterion for embryo transfer. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30, 683-690.
163. Munne S (2006). Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reproductive Biomedicine Online*, 12, 234-253.
164. Campbell A, Fishel S, Bowman N et al (2013). Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. *Reproductive Biomedicine Online*, 27, 140-146.
165. Pickering S.J, Taylor A, Johnson M.H et al (1995). An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos. *Human Reproduction*, 10, 1912-1922.
166. Van Blerkom J, Antczak M, Schroder R (1997). The development potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perfollicular blood flow characteristics. *Human Reproduction*, 12, 1047-1055.

167. Sathananthan H, Ratnam S.S, Ng S.C et al (1996). The sperm centriole: its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos. *Human Reproduction*, 345-356.
168. Johansson M, Hardarson T, Lundin K (2003). There is a cut off limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 20, 309–313.
169. Racowsky C, Jackson K.V, Cekleniak N.A et al (2000). The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertility and Sterility*, 73, 558–564.
170. Hardy K, Stark J, Winston R.M.L (2003). Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos. *Biology of Reproduction*, 68, 1165–1169.
171. Wilton L, Voullaire L, Sargeant P et al (2003). Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertility and Sterility*, 80, 860-868.
172. Magli M.C, Giannaroli L, Munne S et al (1998). Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 15, 297-301.
173. Antczak M and Van Blerkom J (1999). Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Human Reproduction*, 14, 429-447.
174. Vega M, Breborowicz A, Moshier E et al (2014). Blastulation rates decline in a linear fashion from euploid to aneuploidy embryos with single versus multiple chromosomal error. *Fertility and Sterility*, 102, 394-398.

175. Basile N, Nogales M, Bronet F et al (2014). Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertility and Sterility*, 101, 699-704.
176. Debrock S, Melotte C, Spiessens C et al (2010). Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial. *Fertility and Sterility*, 93, 364-373.
177. Taylor T, Patrick J, Gitlin S et al (2014). Comparison of aneuploidy, pregnancy and live birth rates between day 5 and day 6 blastocysts. *Reproductive Biomedicine Online*, 29, 305-310.
178. Shapiro B, Richter K, Harris D et al (2001). A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. *Fertility and Sterility*, 75, 1126-1130.
179. Barrenetxea G, Lopez de Jarruzea A, Ganzabal T et al (2005). Blastocyst culture after repeated failure of cleavage-stage embryo transfers: a comparison of day 5 and day 6 transfers. *Fertility and Sterility*, 83, 49-53.
180. Chang H.J, Lee JR, Jee B.C et al (2009). Impact of blastocyst transfer on offspring sex ratio and the monozygotic twinning rate: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 91, 2381-2390.
181. Luna M, Duke M, Copperman A et al (2007). Blastocyst embryo transfer is associated with a sex-ratio imbalance in favor of male offspring. *Fertility and Sterility*, 87, 519-523.
182. Hentemann M.A, Briskemyr S and Bertheussen K (2009). Blastocyst transfer and gender: IVF versus ICSI. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26, 433-436.

183. Csokmay JM, Hill M.J, Cioppettini F.V et al (2009). Live birth sex ratio are not influenced by blastocyst stage embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 92, 913-917.
184. Eaton J, Hacker M, Barrett B et al (2011). Influence of embryo sex on development of the blastocyst stage and euploidy. *Fertility and Sterility*, 95, 936-939.
185. Kovacic B and Vlaisavljevic V (2012). Importance of blastocyst morphology in selection for transfer. *Advances in embryo transfer*, InTech, Rijeka, Croatia, 161-176.
186. Eaton J, Hacker M, Barrett B et al (2010). Influence of patient age on the association between euploidy and day-3 embryo morphology. *Fertility and Sterility*, 94, 365-367.
187. Moayeri S, Allen R, Brewster W et al (2008). Day-3 embryo morphology predicts euploidy among older subjects. *Fertility and Sterility*, 89, 118-123.