

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN THỊ BÍCH VÂN

**MỐI LIÊN QUAN GIỮA MỘT SỐ YẾU TỐ
NGUY CƠ VÀ TÌNH TRẠNG RỐI LOẠN
NHIỄM SẮC THỂ TRƯỚC CHUYỂN PHÔI**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

=====

NGUYỄN THỊ BÍCH VÂN

**MỐI LIÊN QUAN GIỮA MỘT SỐ YẾU TỐ
NGUY CƠ VÀ TÌNH TRẠNG RỐI LOẠN
NHIỄM SẮC THỂ TRƯỚC CHUYỂN PHÔI**

Chuyên ngành: Sản phụ khoa

Mã số: 9720105

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. GS.TS. Nguyễn Viết Tiến
2. GS.TS. Nguyễn Duy Bắc

HÀ NỘI – 2022

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới:

Đảng ủy, Ban Giám hiệu, Phòng Sau đại học, Bộ môn Phụ Sản Trường Đại học Y Hà Nội đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và giúp tôi thực hiện luận án này.

Đảng ủy, Ban Giám đốc, Phòng Kế hoạch Tổng hợp Học viện Quân Y và Bệnh viện Đa Khoa Tâm Anh đã giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc đến GS.TS. Nguyễn Viết Tiến và GS.TS Nguyễn Duy Bắc, các Thầy đã tận tình chỉ bảo, động viên, ủng hộ, trực tiếp hướng dẫn, giúp đỡ tôi trong quá trình học tập cũng như trong suốt quá trình nghiên cứu và thực hiện luận văn này.

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn đến các Giáo sư, Phó giáo sư, Tiến sỹ trong Hội đồng chấm luận văn đã giành thời gian và công sức đóng góp những ý kiến quý báu cho luận văn của tôi được hoàn thiện. Tôi chân thành cảm ơn các đồng nghiệp, bạn bè đã luôn ủng hộ, động viên tôi trong suốt thời gian học tập và thực hiện đề tài.

Xin cảm ơn các lãnh đạo và quý đồng nghiệp Bộ môn Phụ Sản, Trường Đại học Y Hà Nội, nơi tôi công tác đã tạo điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu.

Cuối cùng với lòng biết ơn sâu sắc, tôi xin ghi nhớ công ơn của Cha, Mẹ hai bên nội ngoại, chồng và hai con những người luôn ở bên cạnh ủng hộ, động viên, là chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận án.

Hà Nội, ngày 01 tháng 6 năm 2022

Nguyễn Thị Bích Vân

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Thị Bích Vân, nghiên cứu sinh khóa 35 trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Sản phụ khoa, tôi xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Nguyễn Viết Tiến và GS.TS. Nguyễn Duy Bắc.

2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

3. Tôi xin cam đoan các số liệu được sử dụng trong luận án này là trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

4. Nghiên cứu sử dụng một phần số liệu trong đề tài cấp nhà nước: “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trong sàng lọc rối loạn nhiễm sắc thể trong chuyển phôi”.

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

Hà Nội, tháng năm 2022

Tác giả

Nguyễn Thị Bích Vân

CÁC THUẬT NGỮ VIẾT TẮT

a-CGH:	Array Comparative Genomic Hybridization (Lai so sánh) (Đổi chiều bộ gen dùng chip DNA)
ADO:	Allele Drop-Out (Mất alen)
ART:	Assisted Reproductive Technology (Kỹ thuật hỗ trợ sinh sản)
AMH:	Anti-Müllerian Hormone
a-SNP:	Array Single Nucleotide Polymorphism (Phân tích đa hình đơn dùng chip DNA)
BAC:	Bacterial Artificial Chromosome
BT:	Bất thường
DNA:	DeoxyriboNucleic Acid
FISH:	Fluorescent In Situ Hybridization (Lai huỳnh quang tại chỗ)
FSH:	Follicle-Stimulating Hormone (Hóc môn kích thích nang noãn)
ICM:	Inner Cell Mass (Nguyên bào phôi-mầm phôi)
ICSI:	Intra Cytoplasmic Sperm Injection (Tiêm tinh trùng vào bào tương của noãn)
IUI:	Intra-Uterine Insemination (Bơm tinh trùng vào buồng tử cung)
IUI-D:	Intra-Uterin Insemination -Donner (Bơm tinh trùng vào buồng tử cung sử dụng tinh trùng của người hiến)
IUI-H:	Intra-Uterin Insemination – Husband (Bơm tinh trùng vào buồng tử cung sử dụng tinh trùng của người chồng)
IVF:	In-Vitro Fertilization (Thụ tinh trong ống nghiệm)
IVM:	In vitro maturation of oocytes (Kỹ thuật nuôi noãn trưởng thành trong ống nghiệm)
LBNST:	Lịch bội nhiễm sắc thể
LH:	Luteinizing hormone (Hormone hoàng thể hóa)
KL-BoBs:	BACs - on - Beads (Phương pháp KaryoLite BoBs)

NGS:	Next Generation Sequencing (Giải trình tự thế hệ mới)
NST:	Nhiễm sắc thể
PB:	Phôi bào
PGT-A:	Preimplantation Genetic Screening for Aneuploidy (Xét nghiệm di truyền tiền làm tổ tìm rối loạn số lượng nhiễm sắc thể)
PGT-M	Preimplantation genetic testing for monogenic/single gene defects (Xét nghiệm di truyền tiền làm tổ cho các bệnh di truyền đơn gen)
PGT-SR	Preimplantation genetic testing for structural chromosomal rearrangements (Xét nghiệm di truyền tiền làm tổ cho tình trạng bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể)
qPCR:	Quantitative Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi định lượng)
RNA:	RiboNucleic Acid
RPL:	Recurrent pregnancy loss (Sảy thai tái diễn)
RLNST:	Rối loạn nhiễm sắc thể, bao gồm cả rối loạn cấu trúc và số lượng nhiễm sắc thể
RIF:	Recurrent implantation failure (Thất bại làm tổ)
TE:	Trophectoderm (Nguyên bào lá nuôi)
WGA:	Whole Genome Application (Khuếch đại bộ gen)
WHO:	World Health Organization (Tổ chức Y tế Thế giới)

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Khái quát về vô sinh.....	3
1.1.1. Định nghĩa vô sinh	3
1.1.2. Nguyên nhân vô sinh	3
1.1.3. Điều trị vô sinh.....	3
1.2. Sự phát triển bình thường của phôi trước khi làm tổ trong kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm.....	4
1.2.1. Phôi ở giai đoạn tiền nhân.....	4
1.2.2. Phôi ở giai đoạn phân chia (ngày 2-3 sau thụ tinh trong ống nghiệm) ..	5
1.2.3. Phôi dâu (ngày thứ 4 sau thụ tinh trong ống nghiệm)	5
1.2.4. Phôi nang (phôi ngày 5-6 sau thụ tinh trong ống nghiệm)	6
1.3. Các rối loạn NST ở noãn và phôi trước chuyển phôi	8
1.3.1. Rối loạn NST	8
1.3.2. Phôi thể khảm.....	8
1.3.3. Rối của phôi và noãn ở các giai đoạn phát triển của phôi	9
1.4. Các yếu tố nguy cơ rối loạn NST ở phôi thụ tinh trong ống nghiệm ..	11
1.4.1. Tuổi của người mẹ	11
1.4.2. Tiền sử sảy thai tái diễn	12
1.4.3. Tiền sử IVF và IUI thất bại.....	13
1.4.4. Loại vô sinh và rối loạn NST	14
1.4.5. Yếu tố thể chất và môi trường ảnh hưởng đến rối loạn NST.....	14
1.4.6. Các nguyên nhân gây vô sinh liên quan tới rối loạn NST	15
1.4.7. Kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm.....	16
1.4.8. Hormon kích thích và sự đáp ứng của buồng trứng.....	17

1.5. Các kỹ thuật sàng lọc di truyền trước chuyển phôi	18
1.5.1. Quy trình sinh thiết phôi để sàng lọc di truyền trước chuyển phôi	19
1.5.2. Các kỹ thuật sàng lọc di truyền trước chuyển phôi	21
1.6. Ứng dụng của kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới trong sàng lọc di truyền trước chuyển phôi trong thụ tinh ống nghiệm	33
1.6.1. Đặc điểm của kỹ thuật NGS.....	33
1.6.2. Ứng dụng kỹ thuật NGS trong sàng lọc di truyền trước chuyển phôi ..	34
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	38
2.1. Đối tượng nghiên cứu	38
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	38
2.1.2. Tiêu chuẩn lựa chọn.....	38
2.1.3. Tiêu chuẩn loại trừ	38
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	39
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	39
2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu	39
2.2.3. Chọn mẫu nghiên cứu	41
2.2.4. Phương tiện và quy trình thực hiện.....	41
2.2.5. Các biến số và chỉ số nghiên cứu.....	53
2.2.5. Địa điểm và thời gian nghiên cứu.....	55
2.2.6. Xử lý số liệu.....	55
2.2.7. Đạo đức nghiên cứu	57
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	58
3.1. Đánh giá kết quả PGT-A trước chuyển phôi của các phôi thụ tinh trong ống nghiệm.....	58
3.1.1. Kết quả khuếch đại được DNA từ mẫu phôi bào.....	58
3.1.2. Tỷ lệ rối loạn NST ở phôi ngày 5	62
3.1.3. Đặc điểm rối loạn NST ở phôi ngày 5	63

3.1.4. Mối liên quan giữa tuổi mẹ và rối loạn nhiễm sắc thể ở phôi thụ tinh ống nghiệm	68
3.2. Một số yếu tố nguy cơ rối loạn NST ở phôi thụ tinh ống nghiệm.....	72
3.2.1. Một số yếu tố tiền sử thai sản và rối loạn NST.....	72
3.3. Đánh giá kết quả áp dụng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (NGS) trong sàng lọc 24 NST trước chuyển phôi.....	75
3.3.1. Một số đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu.....	75
3.3.2. Đặc điểm về các chỉ số của noãn và phôi và chuẩn bị niêm mạc tử cung ở đối tượng nghiên cứu	78
3.3.3. Kết quả phân tích rối loạn NST của phôi blastocyst ở nhóm nghiên cứu.....	81
3.3.4. Kết quả thụ tinh trong ống nghiệm ở hai nhóm nghiên cứu.....	82
Chương 4: BÀN LUẬN.....	83
4.1. Phân tích kết quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới ở các phôi thụ tinh trong ống nghiệm	83
4.2. Đánh giá hiệu quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi đối với kết quả có thai trong thụ tinh trong ống nghiệm và một số yếu tố liên quan đến tình trạng rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi.....	91
4.2.1. Một số yếu tố liên quan đến tình trạng rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi.....	91
4.2.2. Đánh giá hiệu quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi đối với kết quả có thai trong thụ tinh trong ống nghiệm.....	102
KẾT LUẬN	115
KIẾN NGHỊ.....	116
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. So sánh các kỹ thuật sàng lọc phôi.....	33
Bảng 2.1. Đánh giá phôi nang theo tiêu chuẩn của Gardner D. K.....	44
Bảng 2.2. Xếp loại tiêu chuẩn đánh giá phôi	44
Bảng 3.1. Tỷ lệ rối loạn NST của 578 mẫu nghiên cứu.....	62
Bảng 3.2. Đặc điểm rối loạn NST của phôi 5 ngày tuổi IVF.....	63
Bảng 3.3. Tỷ lệ rối loạn số lượng NST của phôi 5 ngày tuổi IVF.....	64
Bảng 3.4. Đặc điểm rối loạn cấu trúc NST ở phôi IVF 5 ngày tuổi	66
Bảng 3.5. Tuổi người mẹ và rối loạn NST.....	68
Bảng 3.6. Tuổi người mẹ và loại rối loạn NST.....	69
Bảng 3.7: Tiền sử thất bại IUI và RLNST	72
Bảng 3.8. Tiền sử thất bại làm tổ và RLNST	73
Bảng 3.9. Tiền sử sảy thai/thai lưu và RLNST.....	74
Bảng 3.10. Loại vô sinh và RLNST	74
Bảng 3.11. Một số đặc điểm về tuổi	75
Bảng 3.12. Một số đặc điểm thể trạng của hai nhóm nghiên cứu.....	75
Bảng 3.13. Nồng độ một số hormon	76
Bảng 3.14. Tinh dịch đồ.....	77
Bảng 3.15. Kết quả kích thích buồng trứng của 2 nhóm nghiên cứu	78
Bảng 3.16. Kết quả nuôi cấy phôi của 2 nhóm nghiên cứu	79
Bảng 3.17. Số lượng noãn và phôi thu được.....	80
Bảng 3.18. Chất lượng phôi blastocyst của bệnh nhân nghiên cứu.....	80
Bảng 3.19. Độ dày niêm mạc tử cung.....	81
Bảng 3.20. Tỷ lệ rối loạn NST của phôi blastocyst	81
Bảng 3.21. Kết quả có thai của hai nhóm nghiên cứu	82

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Kết quả khuếch đại toàn bộ hệ gen của 603 mẫu nghiên cứu	59
Biểu đồ 3.2. Mức độ lệch bội NST của phôi IVF 5 ngày tuổi.....	66
Biểu đồ 3.3. Tần suất rối loạn cấu trúc NST của 578 mẫu phôi IVF.....	67
Biểu đồ 3.4. Mối tương quan giữa tuổi mẹ và tỷ lệ rối loạn số lượng NST ...	70
Biểu đồ 3.5. Đường hồi quy tuyến tính thể hiện mối tương quan giữa tuổi mẹ và tỷ lệ rối loạn số lượng NST.....	71

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Sự phát triển của phôi ngày 2 và 3	5
Hình 1.2. Phôi dâu ngày 4.....	6
Hình 1.3. Phôi giai đoạn tạo nang.....	7
Hình 1.4. Các giai đoạn phát triển phôi	7
Hình 1.5. Ba giai đoạn thực hiện sinh thiết phôi.....	21
Hình 1.6. Đầu dò huỳnh quang	24
Hình 1.7. Quy trình thực hiện giải trình tự thế hệ mới	31
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu.....	52
Hình 3.1. Phôi IVF 5 ngày tuổi không phát hiện rối loạn NST.....	60
Hình 3.2. Phôi IVF 5 ngày tuổi phát hiện lệch bội ở 1 NST	60
Hình 3.3. Phôi IVF 5 ngày tuổi phát hiện lệch bội ở 2 NST	60
Hình 3.4. Phôi IVF 5 ngày tuổi phát hiện lệch bội ở 3 NST	61
Hình 3.5. Phôi IVF 5 ngày tuổi phát hiện lệch bội ở nhiều NST.....	61
Hình 3.6. Phôi IVF 5 ngày tuổi phát hiện bất thường cấu trúc NST	61

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vô sinh là tình trạng cặp vợ chồng sau một năm chung sống, quan hệ tình dục bình thường, không sử dụng bất kỳ biện pháp tránh thai nào vào giai đoạn có thể mang thai trong chu kỳ kinh nguyệt mà người vợ vẫn không thể có thai¹. Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), tỷ lệ các cặp vợ chồng vô sinh từ 6%-12%. Tỷ lệ này ở Việt Nam là 7,7%².

Trong số các phương pháp điều trị vô sinh, thụ tinh trong ống nghiệm là một trong những phương pháp điều trị hiệu quả nhất. Tuy nhiên, mặc dù các phôi trước khi được chuyển đã được sàng lọc hình thái tốt, tỷ lệ có thai lâm sàng của IVF vẫn thấp, chỉ từ 30-35%^{3,4}. Rối loạn NST ở noãn hoặc phôi là nguyên nhân hàng đầu dẫn tới thai không làm tổ, sảy thai, thai lưu và dị tật thai nhi⁵. Tần suất rối loạn NST cao ở phôi đã đặt ra yêu cầu phải sàng lọc rối loạn NST đối với phôi trước khi chuyển vào tử cung của người phụ nữ.

Cùng với sự phát triển của khoa học, sự ra đời của kỹ thuật chẩn đoán di truyền trước làm tổ (Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy – PGT-A) giúp các nhà khoa học có thể chọn được tương đối chính xác các phôi không có các rối loạn cấu trúc và số lượng NST trước khi chuyển vào tử cung người mẹ. Phương pháp này đã được ứng dụng trên lâm sàng để tăng tỷ lệ thành công trong điều trị vô sinh, đặc biệt trên các cặp vợ chồng có nguy cơ cao rối loạn NST (mẹ lớn tuổi, chuyển phôi thất bại nhiều lần, sảy thai tái diễn...). Gần đây, tổng hợp các kết quả nghiên cứu về sàng lọc rối loạn NST trước chuyển phôi cho thấy tỷ lệ có thai trong chuyển phôi tăng lên đáng kể⁶.

Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (Fluorescence In Situ Hybridization – FISH) có thể phát hiện rối loạn NST như 21, 18, 13, X, Y. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây chỉ ra kỹ thuật FISH không làm tăng hiệu quả có thai trong kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm do hạn chế về số lượng NST được khảo sát. Để khắc phục hạn chế của FISH, nhiều kỹ thuật giúp sàng lọc 24

NST trên một tế bào như aCGH, SNP, QF-PCR, trong đó kỹ thuật aCGH hiện đang được coi là tiêu chuẩn vàng trong sàng lọc di truyền trước chuyển phôi trên thế giới⁶. Tuy vậy, kỹ thuật aCGH không phát hiện được các tái sắp xếp cân bằng NST, các mất đoạn nhỏ, giá thành cao và kém tự động hóa.

Sự ra đời của kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (Next-Generation Sequencing - NGS) đã tạo ra cuộc cách mạng trong công nghệ sinh học, được ứng dụng trong cả nghiên cứu và chẩn đoán lâm sàng. Sàng lọc rối loạn NST dựa trên kỹ thuật NGS ưu điểm hơn aCGH như giảm chi phí, có khả năng đánh giá tổn thương cấu trúc NST, tự động hóa cao giúp giảm thiểu sai sót trong quá trình thực hiện⁷.

Ở Việt Nam, kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (NGS) trong sàng lọc 24 NST ở phôi bước đầu được thực hiện tại một số trung tâm nhưng chưa có nhiều nghiên cứu nhằm đánh giá hiệu quả trên lâm sàng điều trị vô sinh. Mặt khác, thực tiễn lâm sàng đặt ra nhu cầu cần đánh giá các yếu tố liên quan tới rối loạn NST của phôi thụ tinh trong ống nghiệm nhằm tư vấn cũng như lựa chọn phương án điều trị phù hợp cho từng cặp vợ chồng điều trị vô sinh. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài **“Mối liên quan giữa một số yếu tố nguy cơ và tình trạng rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi”**, nhằm 2 mục tiêu:

Mục tiêu 1. Phân tích kết quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới ở các phôi thụ tinh trong ống nghiệm.

Mục tiêu 2. Đánh giá hiệu quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi đối với kết quả có thai trong thụ tinh trong ống nghiệm và một số yếu tố liên quan đến tình trạng rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Khái quát về vô sinh

1.1.1. Định nghĩa vô sinh

Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), vô sinh là trạng thái không có thai sau một năm chung sống vợ chồng mà không dùng một biện pháp tránh thai nào⁸.

1.1.2. Nguyên nhân vô sinh

Nguyên nhân điều trị vô sinh có thể do kết hợp nhiều nguyên nhân (40%), vô sinh nam (26-30%), rối loạn chức năng buồng trứng (21-25%), do vòi tử cung (14-20%), nguyên nhân khác (tổn thương cổ tử cung, dị dạng sinh dục...) chiếm 10-13%, có tới 25-28% vô sinh là không rõ nguyên nhân¹.

1.1.3. Điều trị vô sinh

Tùy thuộc nguyên nhân gây vô sinh mà có những biện pháp điều trị khác nhau: điều trị nội khoa đến cấy phôi thông qua kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (Assisted Reproductive Technology-ART).

1.1.3.1. Phương pháp bơm tinh trùng vào buồng tử cung (IUI)

IUI là phương pháp bơm trực tiếp tinh trùng đã được lọc rửa vào buồng tử cung của người vợ, trong khi người vợ đã được chuẩn bị trước bằng thuốc kích thích phóng noãn. Đây là một phương pháp phổ biến, đơn giản, ít nguy hiểm, ít tốn kém và hiệu quả cao. Các tai biến có thể bao gồm: lây nhiễm các bệnh lây truyền qua đường tình dục, co thắt tử cung, nhiễm trùng đường sinh dục trên, sốc phản vệ.

1.1.3.2. Phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm (IVF)

* Định nghĩa:

Thụ tinh trong ống nghiệm là phương pháp cho tinh trùng thụ tinh với noãn trong ống nghiệm thay vì trong vòi tử cung của người phụ nữ. Tiêm tinh trùng

vào bào tương trứng (ICSI) là kỹ thuật ra đời nhằm khắc phục tình trạng tỉ lệ thụ tinh thấp hoặc không thụ tinh khi thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm do bất thường quá trình thụ tinh hoặc chất lượng tinh trùng thấp.

** Chỉ định thụ tinh trong ống nghiệm:*

Kỹ thuật IVF được thực hiện để điều trị hiếm muộn cho các cặp vợ chồng có các chỉ định sau:

+ Tắc nghẽn ống dẫn trứng, lạc nội mạc tử cung, tinh trùng ít, yếu, dị dạng, không tinh trùng trong tinh dịch cần lấy tinh trùng bằng phẫu thuật mào tinh, tinh hoàn, hiếm muộn không rõ nguyên nhân, bơm tinh trùng nhiều lần thất bại, xin noãn, sàng lọc, chẩn đoán di truyền tiền làm tổ.

Chống chỉ định thụ tinh trong ống nghiệm

- Vợ có các bệnh lý nội khoa có thể nguy hiểm đến tính mạng khi kích thích buồng trứng hay khi có thai

Tỷ lệ thành công của những lần chuyển phôi thụ tinh ống nghiệm còn thấp (30-35%). Nguyên nhân chủ yếu là do rối loạn NST gây phôi không làm tổ, sảy thai, thai lưu hoặc dị tật bẩm sinh ở trẻ. Do vậy, rất cần thiết hiểu rõ các rối loạn NST của phôi thụ tinh trong ống nghiệm, cũng như áp dụng các kỹ thuật sàng lọc di truyền trước chuyển phôi nhằm nâng cao hiệu quả thụ tinh trong ống nghiệm.

1.2. Sự phát triển bình thường của phôi trước khi làm tổ trong kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm

1.2.1. Phôi ở giai đoạn tiền nhân

Noãn được thụ tinh tạo thành hợp tử và phát triển thành phôi qua nhiều giai đoạn mà 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 trong khi tiền nhân cái hình thành ở cực bào tương có thoi phân bào. Khoảng 6 giờ sau cấy noãn với tinh trùng có thể nhìn thấy 2 thể cực⁹. Khoảng 12 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 ¹⁰. Mỗi tiền nhân có từ 1 đến 9 hạt nhân, tiền nhân nhỏ thường có ít hạt nhân hơn.

1.2.2. Phôi ở giai đoạn phân chia (ngày 2-3 sau thụ tinh trong ống nghiệm)

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 này. 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 từ các chất liệu RNA của mẹ để phân chia ¹¹.



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)

1.2.3. Phôi dâu (ngày thứ 4 sau thụ tinh trong ống nghiệm)

Phôi dâu hình thành khi phôi ở giai đoạn 8 phôi bào và bắt đầu quá trình kết đặc. 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. 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 ¹¹. Khi phôi

bắt đầu kết đặc lại, các phôi bào tương tác với nhau và mất đi đặc tính toàn năng, 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 liên với nhau. Phôi dâu lúc ở giai đoạn này hoàn toàn trông như một tế bào có nhiều nhân (hình 1.2). Ở quá trình thụ tinh tự nhiên, phôi dâu xuất hiện sớm ngay từ giờ thứ 65. Tuy nhiên, trong quá trình thụ tinh trong ống nghiệm, phôi dâu xuất hiện muộn hơn, thường vào ngày 3 đến ngày 4 ¹².



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)

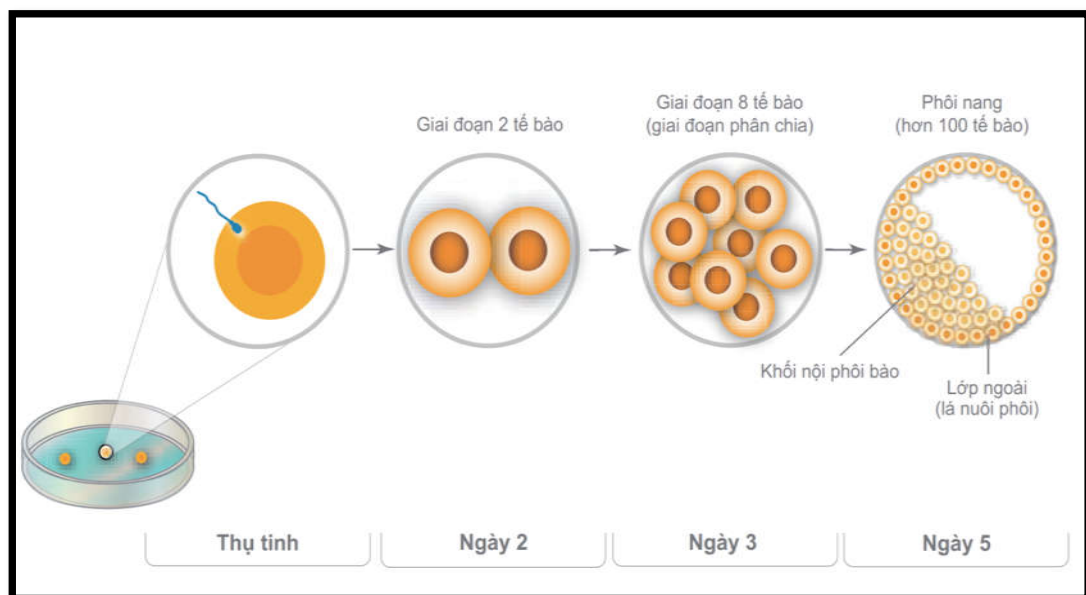
1.2.4. Phôi nang (phôi ngày 5-6 sau thụ tinh trong ống nghiệm)

Sau khi phôi kết đặc, phôi bắt đầu lớn dần và tạo nang dịch bên trong 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 ¹¹.



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 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.



Hình 1.4. Các giai đoạn phát triển phôi

1.3. Các rối loạn NST ở noãn và phôi trước chuyển phôi

1.3.1. Rối loạn NST

Hiện tượng rối loạn NST là hiện tượng số lượng NST của tế bào tăng lên hoặc giảm đi một hoặc vài NST so với bộ NST lưỡng bội. Mất cân bằng về NST sẽ dẫn đến tình trạng phôi ngừng phát triển trước khi làm tổ, sảy thai hoặc thai chết lưu hoặc phát triển thành thai bất thường như trong trường hợp hội chứng Down hoặc hội chứng Klinefelter.

Một số nghiên cứu cho rằng gần một nửa noãn người là bị rối loạn NST, tỷ lệ này tăng lên đáng kể ở phụ nữ trên 35 tuổi¹³. Ngược lại, tỷ lệ rối loạn NST ở tinh trùng của nam giới có khả năng sinh sản bình thường là tương đối thấp 4-7%¹⁴.

1.3.2. Phôi thể khảm

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

Phôi thể khảm có thể chứa dòng phôi bào bình thường và 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% lên đến trên 90%. 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. Trong 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. Tác giả này cho rằng những phôi này vẫn có khả năng phát triển bình thường¹⁵.

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 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 khảm¹⁶.

Phôi thể khảm thường phát triển chỉ đến giai đoạn phôi dâu và ngừng không phát triển đến giai đoạn phôi nang. Baart và cộng sự nghiên cứu 12 phôi dâu tan đông thấy cả 12 phôi đều là phôi thể khảm. 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 5¹⁷.

1.3.3. Rối của phôi và noãn ở các giai đoạn phát triển của phôi

- Rối loạn NST ở noãn

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

Sher và cộng sự khi sử dụng phương pháp CGH cho noãn của phụ nữ dưới 35 tuổi thấy 64% bị rối loạn NST. Noãn bị rối loạn NST sẽ dẫn tới phôi bị rối loạn NST. 80% noãn bình thường sau thụ tinh sẽ dẫn tới phôi bình thường và 87% phôi không phát triển thành phôi nang là bị rối loạn NST¹⁸.

- Rối loạn NST 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 rối loạn NST 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 rối loạn NST¹⁹.

Chen và cộng sự (2003) sử dụng phương pháp FISH cho NST 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 NST bình thường, đặc biệt là phôi có điểm Z1 (phôi tốt nhất)²⁰.

Balaban và cộng sự (2004) sử dụng phương pháp FISH 5 đầu dò (13, 18, 21, X, Y) kiểm tra 267 phôi thấy tỷ lệ rối loạn NST 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 rối loạn NST. Tỷ lệ rối loạn NST 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 thường²¹.

- Rối loạn NST 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 rối loạn NST, 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 và có tiền sử sảy thai bị rối loạn NST (thai tự nhiên hay thai tạo ra trong IVF), tỷ lệ rối loạn NST là 67,8%. NST có tỷ lệ rối loạn NST cao là 16 và 22²².

Ở Việt Nam sàng lọc phôi trước chuyển phôi đang bắt đầu phát triển, trong một nghiên cứu sơ bộ bước đầu đánh giá kết quả sàng lọc trước chuyển phôi, Nguyễn Việt Tiến và cộng sự năm 2014 sử dụng phương pháp FISH đánh giá 5 NST 13, 18, 21, XY đã công bố tỷ lệ rối loạn NST của 37 phôi ngày 3 là 45,9%, hay gặp nhất ở NST 21 và thấp nhất ở NST giới tính²³. 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 rối loạn NST là 46,4%, hay gặp nhất là NST 21, sau đó là 13 và thấp nhất là NST giới tính²⁴.

- Rối loạn NST 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 rối loạn NST, 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 rối loạn NST là 51,3%²⁵. Fragouli và cộng sự năm 2010 cũng sử dụng phương pháp CGH ở nhóm bệnh nhân tuổi trung bình 39,8 thấy tỷ lệ rối loạn NST ở phôi nang là 45,2%²⁶.

1.4. Các yếu tố nguy cơ rối loạn NST ở phôi thụ tinh trong ống nghiệm

1.4.1. Tuổi của người mẹ

Độ tuổi trung bình để mang thai của các cặp vợ chồng đã tăng lên đáng kể trong những thập kỷ gần đây với độ tuổi trung bình khoảng 30 ở nhiều nước. Trong sinh sản tự nhiên, phụ nữ càng lớn tuổi thì khả năng sinh sản càng giảm đi. Điều này cũng đúng với thụ tinh ống nghiệm, khi tuổi người mẹ càng cao thì nguy cơ gây bất thường cho phôi thụ tinh càng lớn²⁷.

Lão hóa ảnh hưởng đến số lượng tế bào noãn có thể được lấy ra khi kích thích buồng trứng. Đồng thời, số lượng trung bình của phôi chỉnh bội cũng giảm khi tuổi tăng²⁸. Ngoài ra, hiện tượng mất cân bằng oxy hóa tăng theo tuổi kết hợp tăng các chu trình chết tế bào của các tế bào nang noãn, do đó làm giảm chất lượng phôi và tỉ lệ sinh thành công. Mất cân bằng oxy hóa cũng liên quan đến việc rút ngắn các telomere, như một quá trình lâu dài trong khi các tế bào noãn vẫn còn yếu trong thời kỳ chưa sinh con, và các telomere rút ngắn liên quan tới hiện tượng lệch bội NST 23²⁹.

Một số nghiên cứu cho rằng ít nhất 20% noãn người bị lệch bội NST, tỷ lệ này tăng lên đáng kể khi người phụ nữ trên 35 tuổi và trung bình khoảng 70%^{26,30}. Tuy nhiên các tác giả này cho rằng bất thường loại thể khám thường không phụ thuộc vào tuổi, trong khi Munne lại cho rằng thể khám là do cơ chế không phân ly và có thể tăng lên cùng với tuổi mẹ tăng³¹.

Márquez 2000, sử dụng phương pháp FISH khảo sát 5 cặp NST (13, 16, 18, 21 và XY) và nhận thấy tỉ lệ lệch các loại rối loạn NST đều tăng lên theo tuổi, trong đó tỉ lệ lệch bội nhiễm sắc biến đổi rõ ràng nhất : 3,1% với phụ nữ từ 20 tới 34 tuổi và 17% với phụ nữ từ 40 tuổi trở lên³².

Năm 2007, Munne và cộng sự sử dụng phương pháp FISH để kiểm tra 8 cặp NST (13, 16, 18, 21, 22, X, Y, 15, 17) trên hơn 6000 phôi 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 rối loạn NST rất rõ ràng. Cụ thể tỉ lệ phôi bất thường là 60% với phụ nữ dưới 35 tuổi; 63% với phụ nữ từ 35 tới 38 tuổi; 72% với phụ nữ từ 38 tới 41 tuổi và 80% với phụ nữ trên 41 tuổi ²⁷.

Franasiak 2014, nghiên cứu trên 15.169 phôi thực hiện sinh thiết thể cực, hiện tượng lệch bội tăng có thể dự đoán từ sau tuổi 26. Tỷ lệ tăng nhẹ đã được ghi nhận ở độ tuổi trẻ hơn, với trên 40% trường hợp lệch bội ở phụ nữ từ 23 tuổi trở xuống. Tỷ lệ phôi bất thường thấp nhất (2% đến 6%) ở phụ nữ tuổi từ 26 đến 37, 33% ở tuổi 42, và 53% ở tuổi 44. Kết quả sinh thiết cho kết quả lệch bội, 64% liên quan đến đơn nhiễm, 20 % chỉnh bội, và 16% tam nhiễm, với tỷ lệ lệch bội nhiều NST tăng dần theo tuổi ²⁸.

1.4.2. Tiền sử sảy thai tái diễn

Sảy thai tái diễn được định nghĩa là sảy thai tái diễn dưới 20 tuần thai, từ 3 lần trở lên, gặp ở từ 1-5% các cặp vợ chồng và là vấn đề quan trọng đối với các cặp vợ chồng vô sinh ³³. Nhiều nguyên nhân có thể dẫn đến sảy tái diễn, tuy nhiên 40% số trường hợp là không rõ nguyên nhân. Một trong số nguyên nhân quan trọng là rối loạn NST ở các cặp vợ chồng. Có tới 50-70% trường hợp sảy thai sớm có rối loạn NST³³. Rối loạn NST này có thể di truyền từ bố mẹ hoặc phát sinh mới trong quá trình phân chia hình thành giao tử đực và giao tử cái.

Năm 2007, Hatem Elghezal và cộng sự nghiên cứu trên 1400 cặp vợ chồng có tiền sử sảy thai tái diễn cho kết quả 6,93 % số cặp vợ chồng có rối loạn NST, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với quần thể chung (0,5%) ³⁴. Những rối loạn NST này có thể là những rối loạn NST cân bằng, không làm

tăng hay giảm vật chất di truyền nên không biểu hiện trên các cặp vợ chồng, tuy nhiên lại biểu hiện ra trong quá trình phân chia giao tử và khi thụ tinh tạo thành hợp tử bất thường. Năm 2018, Pal thực hiện nghiên cứu tương tự trên 172 cặp vợ chồng (344 người) có tiền sử sảy thai tái diễn cũng cho kết quả là 9,88 % số cặp vợ chồng có rối loạn NST gồm cả rối loạn cấu trúc (chiếm 88,23%) và số lượng NST (chiếm 11,77%)³⁵. Từ đó khuyến cáo làm NST đồ ở tất cả các cặp vợ chồng có tiền sử sảy thai tái diễn.

1.4.3. Tiền sử IVF và IUI thất bại

Thất bại làm tổ liên tiếp (Recurrent implantation failure - RIF) được định nghĩa là thất bại làm tổ, hay không có thai lâm sàng sau thụ tinh ống nghiệm từ 3 lần liên tiếp trở lên hoặc thất bại sau chuyển 10 phôi. Thất bại làm tổ liên tiếp có thể do nhiều nguyên nhân như: mẹ lớn tuổi, vợ và chồng hút thuốc, bất thường tử cung như polyp buồng tử cung, u xơ tử cung hay dị dạng sinh dục, các yếu tố miễn dịch như có các cytokine hoặc kháng thể tự miễn, béo phì, viêm nhiễm niêm mạc tử cung, phác đồ thụ tinh ống nghiệm, Một trong những nguyên nhân quan trọng là rối loạn NST: chuyển đoạn NST, đảo đoạn, mất đoạn và thể khảm NST, những bất thường này thường gặp hơn ở những bệnh nhân có tiền sử thất bại làm tổ liên tiếp so với quần thể dân số. Năm 2012, De Sutter đã nghiên cứu trên 615 bệnh nhân có tiền sử thất bại làm tổ nhiều lần (3 lần) cho thấy tỷ lệ rối loạn NST của nhóm này cao hơn có ý nghĩa thống kê so với quần thể dân số (2,1% so với 0,6%) và thấp hơn so với các bệnh nhân thất bại làm tổ từ 4 lần trở lên, từ đó khuyến cáo nên làm NST đồ ở tất cả các cặp vợ chồng có tiền sử thất bại làm tổ liên tiếp³⁶.

Năm 2008, Blockeel và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu so sánh ngẫu nhiên có đối chứng nhằm kiểm nghiệm vai trò của sàng lọc di truyền trước chuyển phôi đối với các trường hợp thất bại làm tổ liên tiếp. Trong nghiên cứu, 139 bệnh nhân có tiền sử thất bại làm tổ nhiều lần được kích thích phóng

noãn, trong đó 72 bệnh nhân được sàng lọc di truyền trước chuyển phôi bằng kỹ thuật FISH, số bệnh nhân còn lại được chuyển phôi theo phương pháp sàng lọc hình thái cổ điển. Mặc dù số phôi cần chuyển ở nhóm nghiên cứu thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm chứng (1,4 so với 2,1, $p < 0,05$) nhưng không có sự khác biệt về tỷ lệ làm phôi làm tổ và tỷ lệ có thai lâm sàng giữa 2 nhóm ($p > 0,05$)³⁷. Điều này có thể do cỡ mẫu chưa đủ lớn để thể hiện sự khác biệt rõ rệt, cũng có thể do hạn chế trong kỹ thuật sàng lọc di truyền FISH chỉ thực hiện trên giới hạn một số nhiễm sắc thể (X, Y, 13, 16, 18, 21, 22) trong khi rối loạn NST đã được chứng minh có thể xuất hiện với tần suất cao ở tất cả các cặp nhiễm sắc thể, kỹ thuật sinh thiết phôi ngày 3 cũng ảnh hưởng đến chất lượng phôi.

1.4.4. Loại vô sinh và rối loạn NST

Tổ chức y tế thế giới ước tính có 60-80 triệu cặp vợ chồng vô sinh trên toàn thế giới. Vô sinh nguyên phát là những cặp vợ chồng vô sinh chưa từng có thai trong khi vô sinh thứ phát là những cặp vợ chồng đã ít nhất một lần có thai. Rối loạn NST là nguyên nhân quan trọng trong vô sinh nguyên phát, vô sinh thứ phát và sảy thai nhiều lần, chiếm từ 5-10% nguyên nhân vô sinh³⁸.

Đánh giá tỷ lệ rối loạn NST tùy theo nguyên nhân vô sinh là rất quan trọng trong việc lập kế hoạch can thiệp hỗ trợ sinh sản. Vô sinh nguyên phát thường ảnh hưởng tới cấu trúc các tế bào mầm hoặc rối loạn sinh lý tế bào mầm như suy buồng trứng sớm (Premature ovarian failure), hội chứng buồng trứng đa nang (polycystic ovary syndrome). Trong khi đó, vô sinh thứ phát có xu hướng tăng lên ở các bệnh nhân có bệnh lý gen hoặc hội chứng toàn thân, nội tiết. Bệnh lý về gen gây vô sinh nam như: hội chứng NST X dễ gãy (Fragile X), hội chứng Kartagener, hội chứng Noonan, thiếu máu Fanconi....

1.4.5. Yếu tố thể chất và môi trường ảnh hưởng đến rối loạn NST

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

- Hút thuốc lá: Nam giới hút thuốc có số lượng và khả năng di động của tinh trùng thấp hơn. 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 trùng³⁹. Ở người mẹ hút thuốc lá khiến cho các thoi phân bào bị tan rã và bất hoạt chức năng, làm tăng nguy cơ xuất hiện giao tử lưỡng bội và phôi tam bội; các tế bào sinh dục gốc có xu hướng bị NST không phân ly dẫn đến hình thành phôi thể khảm và rối loạn NST ở bào thai và gây sẩy thai sớm.

- 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 NST.

- Phóng xạ; tia X; tia α , tia tử ngoại: cũng liên quan đến dị tật bẩm sinh và rối loạn NST.

1.4.6. Các nguyên nhân gây vô sinh liên quan tới rối loạn NST

Fasolino 2007 quan sát thấy nguyên nhân gây vô sinh có liên quan đáng kể với những rối loạn phân bào giảm phân dẫn đến lệch bội NST ở phôi⁴⁰. Tỷ lệ lệch bội NST 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 sẩy thai. Lạc nội mạc tử cung làm ảnh hưởng đến chất lượng của noãn do làm thay đổi thành phần khung tế bào (cytoskeleton)⁴¹. Tác giả cho rằng, lạc nội mạc tử cung ảnh hưởng xấu tới thoi phân bào và NST 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 NST.

Rubio 2003 thực hiện FISH trên 6 cặp NST (13, 16, 18, 21, 22, XY) của 774 phôi và quan sát thấy những phụ nữ có tiền sử bị sẩy thai tái diễn có tỉ lệ phôi bị lệch bội NST cao hơn so với những người phụ nữ bình thường⁴². Al-Asma 2012 cũng báo cáo rằng tỉ lệ phôi bị lệch bội tăng lên rõ ràng đối với những cặp vợ chồng có tiền sử sẩy thai do thai nhi bị lệch bội NST. Bên cạnh đó, Munne 2004 cũng thấy rằng tỉ lệ lệch bội NST ở phôi cao hơn ở phụ nữ có tiền sử sinh con bị rối loạn NST⁴³.

1.4.7. Kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm

** Phương pháp sử dụng hormone kích thích.*

Phương pháp sử dụng hormone kích thích cũng ảnh hưởng tới nguy cơ rối loạn NST ở phôi. Baart 2007 đã sử dụng FISH trên 9 cặp NST (1, 7, 13, 15, 16, 18, 21, 22 và XY) để so sánh tỉ lệ bất thường về NST của phôi khi sử dụng phương pháp kích thích buồng trứng nhẹ với phương pháp cổ điển và phát hiện thấy tỉ lệ phôi bất thường về NST ở nhóm kích thích buồng trứng nhẹ thấp hơn so với nhóm còn lại ¹⁶.

Weghofer 2008 khi sử dụng FISH để so sánh chất lượng phôi giữa hai phác đồ kích thích kéo dài (FSH tái tổ hợp và hMG) đã thấy tỉ lệ phôi bình thường về NST trong phác đồ sử dụng hMG là cao hơn hẳn so với sử dụng FSH tái tổ hợp (69,8 so với 45,3%) ⁴⁴. Liều lượng hormone FSH cũng ảnh hưởng đến tỷ lệ lệch bội NST. Katz-Jaffe và cộng sự 2005 thấy rằng khi sử dụng liều FSH thấp thì nguy cơ tạo ra phôi Trisomy 21 thể khảm thấp hơn so với khi sử dụng liều cao. Fragouli và cộng sự 2009 cũng thấy rằng khi sử dụng liều FSH thấp thì nguy cơ bị lệch bội NST giảm ⁴⁵.

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

Nghiên cứu so sánh giữa IVF cổ điển và phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn thấy rằng tỷ lệ lệch bội 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 NST, có tinh trùng ít, yếu và dị dạng.

Có nhiều bằng chứng cho thấy rằng tuổi của bố có liên quan đến sự suy giảm về khả năng sinh sản và con cái, độc lập với tuổi mẹ ⁴⁶. Khi nam giới già đi, chất lượng của tinh trùng bị giảm xuống. Kết quả là tinh trùng của nam giới nhiều tuổi chứa nhiều khuyết tật DNA hơn so với khi còn trẻ. Vì thế nguy cơ tạo ra phôi chứa các rối loạn NST cũng lớn hơn.

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 NST 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 NST 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 loạn⁴⁷.

1.4.8. Hormon kích thích và sự đáp ứng của buồng trứng

Mặc dù lệch bội NST 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 NST.

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

Gianaroli năm 2001 thấy rằng những bệnh nhân buồng trứng đáp ứng kém với hormone kích thích thì phôi tạo ra có lệch bội NST là 68%. Năm 2003, De Sutter và cộng sự thấy rằng những người đáp ứng kém với hormone kích thích thì tỉ lệ mang thai thành công thấp hơn rõ rệt so với những người đáp ứng bình thường (17% so với 35%)⁴⁸.

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

Quá mẫn buồng trứng được cho là có liên quan tới sự xuất hiện của các phôi bào đa nhân và điều này có mối quan hệ với hiện tượng rối loạn NST.

Soares và cộng sự năm 2003, nghiên cứu trên những bệnh nhân quá mẫn buồng trứng, tạo ra nhiều noãn, thấy rằng tỷ lệ lệch bội NST cao hơn so với nhóm chứng⁴⁹.

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

Có nhiều cách đánh giá khả năng dự trữ buồng trứng, trong đó thường được sử dụng là đánh giá nồng độ FSH vào ngày thứ 3 của chu kỳ. Nồng độ FSH tăng cao hầu hết như đồng nghĩa với sự suy giảm dự trữ buồng trứng, dẫn đến suy giảm số lượng và chất lượng noãn tạo ra.

Một số nghiên cứu cho thấy rằng tỷ lệ trẻ sinh ra bị Trisomy 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 NST ở mọi lứa tuổi⁵⁰.

1.5. Các kỹ thuật sàng lọc di truyền trước chuyển phôi

Sàng lọc di truyền trước chuyển phôi (Preimplantation genetic testing - PGT) là xét nghiệm với mục đích xác định các bất thường về mặt di truyền của các phôi tạo ra trong quá trình thụ tinh trong ống nghiệm, trước khi được chuyển vào buồng tử cung của người mẹ. Một số phương pháp sàng lọc di truyền trước chuyển phôi:

+ PGT-m (Preimplantation genetic testing for monogenic/single gene defects): là xét nghiệm di truyền trước chuyển phôi cho các bệnh đơn gen, cho các cặp vợ chồng mang các bất thường di truyền đã biết, nhằm kiểm tra, tìm kiếm chặt chẽ đột biến đơn gen cụ thể của phôi. Các phôi làm PGT-m không xác định không bị bệnh di truyền có thể được ưu tiên lựa chọn chuyển vào buồng tử cung của người mẹ

+ PGT-sr (Preimplantation genetic testing for structural chromosomal rearrangements): Xét nghiệm di truyền trước chuyển phôi nhằm tìm kiếm bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể, bao gồm cả các rối loạn cấu trúc nhiễm sắc thể cân bằng và các bất thường cấu trúc không cân bằng như thêm hoặc mất vật liệu di truyền trên nhiễm sắc thể.

+ PGT- A (Preimplantation Genetic Screening for Aneuploidy): Xét nghiệm di truyền trước chuyển phôi nhằm tìm kiếm bất thường số lượng nhiễm sắc thể của phôi trước khi chuyển vào buồng tử cung của người mẹ.

Ba loại PGT trên là các thuật ngữ mới thay thế các thuật ngữ sàng lọc di truyền tiền làm tổ (Preimplantation Genetic Screening – PGS) và thuật ngữ chẩn đoán di truyền tiền làm tổ (Preimplantation Genetic Diagnosis – PGD).

Khái niệm PGS hiện được thực hiện thông qua PGT-A và PGD hiện được thực hiện bởi PGT-SR hoặc PGT-M.

1.5.1. Quy trình sinh thiết phôi để sàng lọc di truyền trước chuyển phôi

Sinh thiết phôi có thể thực hiện ở 3 giai đoạn khác nhau: sinh thiết trước và ngay sau khi noãn thụ tinh (sinh thiết thể cực thứ nhất và thứ hai), sinh thiết phôi ở giai đoạn phân cắt (ngày thứ 3 sau thụ tinh) hay sinh thiết ở giai đoạn phôi nang (ngày thứ 5 sau thụ tinh). Mỗi giai đoạn sinh thiết đều mang ưu điểm, khuyết điểm cũng như chỉ định riêng.

Quy trình sinh thiết bao gồm việc sử dụng kính hiển vi đảo ngược được gắn hệ thống vi thao tác để cố định mẫu vật, mở cửa sổ màng zona pellucida, dùng kim sinh thiết để lấy mẫu vật ra khỏi noãn hay phôi. Sau đó noãn hay phôi sẽ tiếp tục được nuôi cấy, mẫu vật được cố định để sàng lọc phát hiện rối loạn di truyền.

1.5.1.1. Chuẩn bị trước sinh thiết

Các tế bào ngoại lai như tinh trùng, tế bào viền cần được làm sạch trước khi sinh thiết nhằm tránh chẩn đoán nhầm DNA của các tế bào này. Do vậy, những bệnh nhân có chỉ định thực hiện chẩn đoán di truyền trước làm tử cần được thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm bằng phương pháp bơm tinh trùng vào bào tương noãn. Danh tính của noãn, phôi và mẫu vật cũng cần được xác định chính xác và kiểm tra ít nhất hai lần ở mỗi khâu trong suốt quá trình thực hiện nhằm đảm bảo kết quả sàng lọc, chẩn đoán di truyền của mẫu vật được liên hệ chính xác đến noãn hay phôi tương ứng. Môi trường nuôi cấy và sinh thiết cũng đóng vai trò quan trọng nhằm đảm bảo sự phát triển tiếp theo của phôi. Môi trường sinh thiết giúp quá trình thao tác dễ dàng hơn. Một trong những môi trường quan trọng đó là môi trường không có Ca^{2+} và Mg^{2+} (Ca^{2+} và Mg^{2+} free medium). Sau đó, phôi cần được nuôi cấy bằng hệ thống chuỗi môi trường tùy thuộc giai đoạn phát triển (ví dụ như hệ thống môi

trường G1, G2 (Vitrolife, Sweden) và được nuôi trong tủ cấy 3 loại khí (5% O₂, 6% CO₂, 89 %N₂) nhằm đảm bảo quá trình phát triển tối ưu của phôi.

1.5.1.2. Mở cửa sổ màng Zona

Là phương pháp tạo một lỗ ở màng bao ngoài của phôi và từ vị trí ấy, kim sinh thiết được đưa vào bên trong phôi để lấy mẫu vật ra ngoài. Có 3 phương pháp chính được dùng để mở cửa sổ màng zona: phương pháp cơ học, hóa học hay dùng tia laser. Đã có nhiều nghiên cứu so sánh 3 phương pháp trên về hiệu quả lâm sàng cũng như ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi, nhưng nhìn chung kết quả phụ thuộc rất nhiều vào kinh nghiệm, kỹ năng cũng như sự khéo léo của người thực hiện. Phương pháp cơ học thường được dùng trong sinh thiết thể cực nhưng tương đối phức tạp. Phương pháp hóa học là sử dụng dung dịch acid Tyrode's đơn giản hơn nhưng tỷ lệ phôi bào bị ly giải do bị tiếp xúc với dung dịch acid tương đối cao. Hiện nay, dùng tia laser để mở cửa sổ màng zona được xem là phương pháp đơn giản và dễ sử dụng nhất⁵¹.

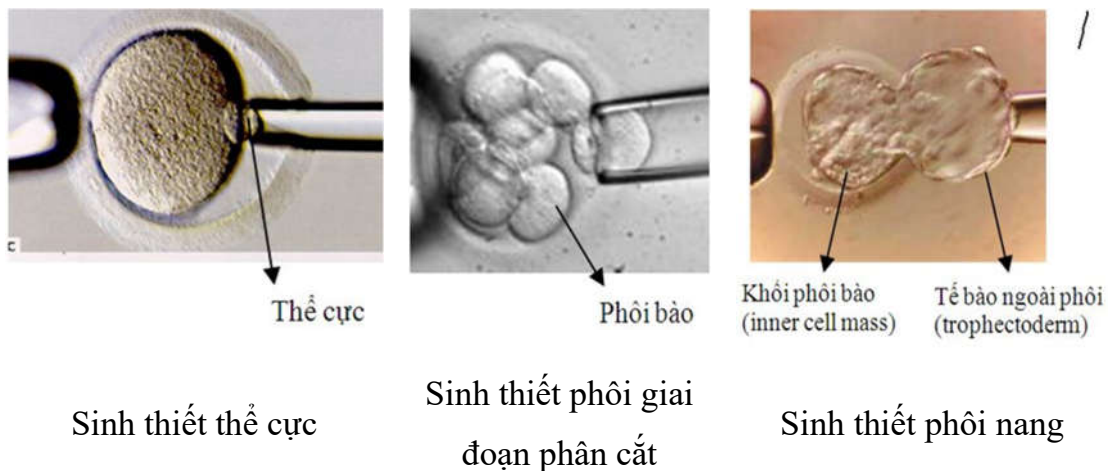
1.5.1.3. Sinh thiết mẫu vật

Sau khi mở cửa sổ màng zona, kim sinh thiết được đưa qua cửa sổ để vào khoang dưới màng zona. Đường kính trong của kim sinh thiết phụ thuộc vào loại mẫu vật muốn sinh thiết. Với sinh thiết phôi giai đoạn phân cắt, đường kính trong của kim sinh thiết thường từ 35-40 μm. Có hai phương pháp chính để lấy mẫu vật ra ngoài. Thứ nhất là tạo áp lực âm trong kim sinh thiết để hút phôi bào vào kim sinh thiết. Phôi bào có thể được hút toàn bộ hay một phần. Nếu phôi bào chỉ được hút một phần vào kim thì cần có thêm lực kéo để nhẹ nhàng vừa hút vừa kéo phôi bào ra ngoài. Cách này thường được ứng dụng nhiều nhất trên lâm sàng. Phương pháp thứ hai, ít được sử dụng hơn, là tạo một áp lực dương từ kim sinh thiết (ví dụ như đẩy môi trường vào khoang dưới màng zona, vặn xoắn bên ngoài màng zona) để đẩy phôi bào ra cửa sổ màng zona. Đối với sinh thiết phôi nang, khoảng 10-30 “tế bào ngoài” của phôi (trophectoderm)

được hút ra ngoài qua cửa sổ màng zona, sau đó liên kết giữa khối tế bào bên ngoài và bên trong sẽ được cắt bằng phương pháp cơ học hay bằng tia laser

Sau khi lấy sinh thiết, các tế bào phôi được rửa trong dung dịch đệm phosphate (PBS) vô trùng (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA), được đặt trong các ống PCR 0,2 ml chứa 2 μ l PBS và sau đó được chuyển sang phòng thí nghiệm để sàng lọc rối loạn NST.

Phương pháp sinh thiết thể cực được xem là phương pháp ít gây tổn hại, ít ảnh hưởng đến sự sống và chất lượng của noãn và phôi nhất. Tuy nhiên, kết quả chẩn đoán di truyền thể cực chỉ phản ánh sự bất thường di truyền của người mẹ mà thiếu đi thông tin di truyền của người cha và của phôi. Sinh thiết và chẩn đoán di truyền phôi ở giai đoạn phôi nang được xem là kỹ thuật mang lại kết quả di truyền chính xác nhất hiện nay với ưu điểm là nhiều tế bào được sinh thiết để sàng lọc, chẩn đoán⁵¹. Đồng thời, khi áp dụng phương pháp này, do khối phôi bào vẫn được bảo tồn nên sự phát triển tiếp theo của phôi không bị ảnh hưởng.



Hình 1.5. Ba giai đoạn thực hiện sinh thiết phôi

1.5.2. Các kỹ thuật sàng lọc di truyền trước chuyển phôi

Sự thành công của kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm phụ thuộc nhiều vào việc có chọn được phôi tốt hay không trước khi chuyển vào buồng tử cung của người vợ. Hiện tượng lệch bội NST ở phôi người trong quá trình

điều trị bằng thụ tinh trong ống nghiệm đã được nêu lên từ lâu và nhiều nghiên cứu cũng đã công nhận hiện tượng lệch bội NST xảy ra ở giai đoạn trước khi làm tổ. Từ nhiều năm nay, việc lựa chọn phôi đa phần dựa trên những tiêu chuẩn hình thái và tiêu chuẩn phát triển của phôi. Tuy nhiên, nhiều chu kỳ chuyển phôi vẫn thất bại dù các phôi đã được lựa chọn hình thái tốt. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm tìm ra mối liên quan giữa hình thái của phôi và rối loạn NST nhưng đã đưa ra kết luận rằng: hình thái phôi phát triển bình thường cũng không thể khẳng định phôi đó không có rối loạn NST và ngược lại. Thực tế cho thấy, nhiều phôi bào có rối loạn NST nhưng rối loạn này vẫn cho phép phôi đó phát triển để có hình thái tốt. Ngược lại, nhiều phôi không có rối loạn NST nhưng lại có hình thái xấu nếu dựa trên các tiêu chuẩn lựa chọn hình thái⁵². Do vậy, chỉ phân tích hình thái không đủ để đưa ra quyết định lựa chọn một phôi có vật liệu di truyền bình thường trước chuyển phôi vào buồng tử cung của người vợ.

Ở người, mỗi tế bào có $2n = 46$ NST, gồm 23 cặp NST (22 cặp NST thường và 1 cặp NST giới tính). Ở nam giới, cặp NST giới tính là XY; ở nữ giới cặp NST giới tính là XX. Do vậy nữ giới có 23 loại NST, nam giới có 24 loại NST. Sự tăng hoặc giảm số lượng một số NST trong 46 NST bình thường được gọi là dị bội NST.

Sàng lọc di truyền trước chuyển phôi (PGT-A) là phương pháp nhằm kiểm tra những rối loạn NST của phôi trước khi phôi được chuyển vào tử cung người vợ, được chỉ định cho phôi tạo ra từ cặp vợ chồng tham gia IVF. PGT-A được đặc biệt ưu tiên làm ở những bệnh nhân có tiền lượng kém trong điều trị thụ tinh trong ống nghiệm như: mẹ lớn tuổi, nhiều lần IVF thất bại làm tổ liên tiếp.

PGT-A làm tăng khả năng thành công thụ tinh ống nghiệm cho phụ nữ ở mọi lứa tuổi; giảm tỷ lệ bỏ thai do những dị tật rối loạn NST; mang lại hy vọng cho những gia đình có tiền sử sinh con dị tật, sảy thai nhiều lần hoặc

thai chết lưu không rõ nguyên nhân⁵³. Kỹ thuật này cũng hướng tới chuyển đơn phôi, giảm thiểu rủi ro đa thai, đảm bảo sức khỏe sinh sản người mẹ. Thụ tinh ống nghiệm kết hợp với xét nghiệm PGT-A được xem là biện pháp dự phòng các rối loạn di truyền sớm ở mức độ NST, là biện pháp chủ động để người mẹ sinh được con khỏe mạnh. Việc tăng tỷ lệ thành công trong IVF nhờ kỹ sàng lọc di truyền trước chuyển phôi giúp rút ngắn thời gian điều trị, giảm chi phí và hơn hết giảm thiểu tối đa những rủi ro gặp phải của việc chuyển nhiều lần những phôi không thể sống vào buồng tử cung.

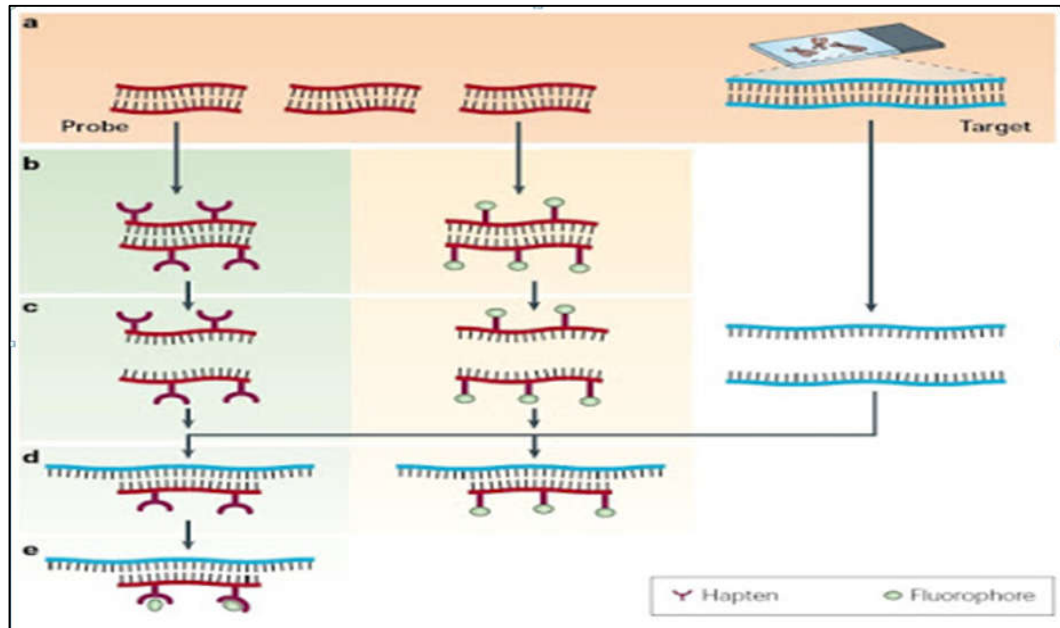
Để làm PGT-A gồm nuôi cấy phôi đến ngày thứ 3 hoặc 5 rồi làm sinh thiết phôi để xét nghiệm di truyền và phát hiện rối loạn NST. Những phôi được kết luận có vật liệu di truyền bình thường sẽ được ưu tiên chuyển vào buồng tử cung của người vợ. Như vậy để thực hiện sàng lọc di truyền trước chuyển phôi cần phải thực hiện hai kỹ thuật chính là kỹ thuật sinh thiết phôi và kỹ thuật xét nghiệm di truyền của phôi.

1.5.2.1. Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ FISH (Fluorescent in situ Hybridization)

a) Khái niệm và nguyên lý

Lai huỳnh quang tại chỗ là kỹ thuật giúp phát hiện rối loạn NST của phôi bằng phương pháp di truyền tế bào - phân tử. Kỹ thuật lai tại chỗ phổ biến nhất sử dụng các đầu dò huỳnh quang để phát hiện các trình tự DNA, và quy trình thực hiện được gọi dưới cái tên Lai huỳnh quang tại chỗ - FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Các biến thể của kỹ thuật FISH được các nhà di truyền học tế bào sử dụng để phát hiện các bất thường về NST của bệnh nhân.

Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) là kỹ thuật sử dụng đầu dò DNA gắn huỳnh quang lai với trình tự DNA đặc hiệu đích trên NST của tế bào ở gian kỳ hoặc các NST ở kỳ giữa, qua đó phát hiện được sự có mặt hay vắng mặt của một đoạn gen nào đó bằng kính hiển vi huỳnh quang.



Hình 1.6. Đầu dò huỳnh quang

b) Ứng dụng của kỹ thuật FISH trong sàng lọc di truyền trước chuyển phôi

Năm 1992, kỹ thuật FISH lần đầu tiên được đưa vào sử dụng sàng lọc di truyền trước chuyển phôi. Những kết quả đầu tiên đã thúc đẩy việc sử dụng PGT-A trên lâm sàng với hi vọng sẽ loại trừ được các phôi rối loạn NST trước khi chuyển phôi vào buồng tử cung làm tăng tỷ lệ đậu thai và giảm tỷ lệ sẩy thai⁵. Một vài nghiên cứu đã cho thấy FISH làm giảm tỷ lệ sẩy thai, tăng tỷ lệ thai làm tổ và tỷ lệ sinh sống khi chuyển các phôi được sàng lọc bằng kỹ thuật này. Tuy nhiên, sau khi PGT-A-FISH được đưa vào sử dụng rộng rãi thì người ta nhận thấy tỷ lệ có thai trên số chu kỳ chuyển phôi khi sử dụng kỹ thuật này không hề tăng. Thực tế, nhiều nghiên cứu tiến cứu và thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên đã chỉ ra kỹ thuật này không làm cải thiện kết quả của sàng lọc di truyền trước chuyển phôi trên lâm sàng⁵⁴, mặc dù vẫn có một số nghiên cứu khác chỉ ra rằng PGT-A-FISH có thể làm tăng tỷ lệ có thai trên đối tượng là người vợ nhiều tuổi⁵⁵. Vì những ý kiến trái chiều gây nhiều tranh cãi trên mà kỹ thuật này ngày càng ít được sử dụng trên lâm sàng trên thế giới và Việt Nam.

Có nhiều giả thiết được đưa ra nhằm giải thích những yếu kém của kỹ thuật FISH trong PGT-A như: mẫu có chứa chất tự phát huỳnh quang, đầu dò thiếu tính đặc hiệu, số lượng đầu dò sử dụng quá ít, một số trình tự đích có cấu trúc quá phức tạp, hàm lượng rRNA thấp, ảnh chụp bị mất màu.

FISH chỉ kiểm tra được một lượng giới hạn NST (tối đa là 12 cặp NST) từ 1 tế bào phôi ngày 3 nên tỷ lệ chẩn đoán âm tính giả cao (phôi bị lệch bội NST mà đánh giá là bình thường), FISH chỉ là kết quả đại diện chứ không cho ra kết quả toàn diện về toàn bộ 24 NST của phôi thai⁵⁶. Các nghiên cứu đầu tiên sử dụng công nghệ sàng lọc NST toàn diện cho thấy sự rối loạn NST có thể xảy ra ở bất kỳ NST nào trong số 24 NST của phôi thai. Điều này cho thấy việc sàng lọc rối loạn của tất cả các NST là cần thiết để xác định xem phôi có NST bình thường hay không⁵².

Ngoài ra, kỹ thuật FISH là một kỹ thuật khó thực hiện, đòi hỏi kinh nghiệm của người trực tiếp làm trong khâu cố định và dãn trải phôi vào ra phiến kính. Chính những yếu tố này khiến kết quả của PGT-A-FISH trở nên khác nhau theo từng labo. Kết quả PGT-A-FISH còn phụ thuộc vào chất lượng cũng như số lượng DNA mẫu, sự chuẩn bị tiêu bản và khả năng nhận biết màu sắc tín hiệu huỳnh quang của người đọc kết quả, có thể có hiện tượng âm tính giả. Vì những khó khăn và nhược điểm trên mà kỹ thuật FISH ít được sử dụng và khó được nhân rộng trên toàn thế giới.

Do đó, trọng tâm trong lĩnh vực PGT-A giờ đây đã chuyển từ sinh thiết phôi ngày thứ 3 (blastomere) sang lấy mẫu phôi ngày 5/6 (trophectoderm) và sử dụng kỹ thuật sàng lọc toàn bộ NST, để cung cấp đánh giá chính xác hơn về chất lượng của phôi thai.

1.5.2.2. Kỹ thuật KaryoLite BoBs (BACs - on - Beads)

a) Khái niệm và nguyên lý

Hiện nay, một công nghệ mới được gọi là KaryoLiteTM trên Beads (KL-BoBs) đã được sửa đổi từ lai ghép gen so sánh đã được phát triển để phát hiện số lượng và tồn thất của bản sao DNA. Xét nghiệm này chứa độ bao

phủ độ phân giải thấp của tất cả các NST và cung cấp thông tin liều lượng về vùng gần và vùng đầu cuối của mỗi nhánh NST. Ngoài ra, có 3 đến 4 hạt trên mỗi NST và mỗi hạt chứa 3 đầu dò NST nhân tạo lân cận để mở rộng vùng đích lai.

b) Ứng dụng kỹ thuật KaryoLite BoBs trong sàng lọc phôi

Tỷ lệ thất bại của KL-BoBs™ là 2% và tỷ lệ âm tính giả và dương tính giả là <1%, ngưỡng phát hiện khảm là 50% . Ưu điểm của xét nghiệm này là những rối loạn NST có thể được phát hiện nhanh 24h , chỉ cần 50 ng DNA là đủ và không cần cấy tế bào.

Hiện nay, một số trung tâm tại Việt Nam đã tiến hành sàng lọc di truyền trước chuyển phôi ở mức độ 24 NST bằng kỹ thuật KaryoLite BoBs; kỹ thuật này sử dụng hạt Bead (BoBs, Perkin Elmer, USA) và có khả năng phát hiện thể dị bội của 24 NST. Nhưng nhược điểm của BoBs là không phát hiện được hiện tượng đa bội do phụ thuộc số lượng probe được lai. Do số lượng probe hạn chế kết hợp với việc sử dụng sản phẩm của khuếch đại toàn bộ bộ gen (Whole Genome Application /WGA) sẽ làm tăng tỷ lệ probe không được lai do tỷ lệ mất alen (Allele Drop-Out /ADO) của bộ kit PicoPlex tối thiểu là 20%.

1.5.2.3. Kỹ thuật lai so sánh bộ gen CGH (Comparative Genomic Hybridization)

a) Khái niệm và nguyên lý

Kỹ thuật lai so sánh bộ gen là một kỹ thuật 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 kỹ thuật CGH có thể kiểm tra được toàn bộ NST trong một tế bào ở bất cứ giai đoạn phân chia nào mà không cần kỹ thuật cố định tế bào. Trong kỹ thuật này, sử dụng kỹ thuật lai so sánh/đôi chiếu của DNA cần xét nghiệm đã được đánh dấu màu xanh với DNA của NST bình thường sử dụng làm chứng được đánh dấu màu đỏ. Tỷ lệ giữa phần huỳnh quang xanh/ phần huỳnh quang đỏ dọc theo NST thể hiện số lượng NST của mẫu thử với mẫu chứng. Nếu màu huỳnh quang xanh đặc hiệu cho NST tăng dư ra chứng tỏ có tăng thêm NST (thể tam nhiễm), trái lại nếu màu huỳnh quang đỏ tăng dư ra là biểu hiện thiếu NST.

b) Ứng dụng kỹ thuật CGH sàng lọc di truyền trước chuyển phôi

Kỹ thuật này được áp dụng lần đầu tiên trên phôi người vào năm 1996. Dùng kỹ thuật CGH để tầm soát phôi đã phát hiện ra sự đa dạng và tần suất rối loạn NST của phôi, khẳng định rằng tất cả các NST 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 thai ở giai đoạn rất sớm.

Kỹ thuật CGH có thể phát hiện được những rối loạn mà kỹ thuật FISH không thể phát hiện được, ví dụ như đứt đoạn NST. Tuy nhiên điểm hạn chế về lâm sàng của kỹ thuật CGH là độ phức tạp của kỹ thuật và trả lời kết quả chậm phải sau 4 ngày. Một bất lợi chính của CGH thông thường là không có khả năng phát hiện quang sai NST cấu trúc mà không có thay đổi số lượng NST, chẳng hạn như khảm, chuyển dịch NST cân bằng và nghịch đảo. Hơn nữa, độ phân giải của CGH thông thường là một vấn đề thực tế lớn làm hạn chế các ứng dụng lâm sàng của nó. Mặc dù CGH đã được chứng minh là một kỹ thuật hữu ích và đáng tin cậy trong nghiên cứu và chẩn đoán rối loạn di truyền của con người, các ứng dụng chỉ liên quan đến tổng số bất thường. Do độ phân giải giới hạn, không thể phát hiện rối loạn nhỏ hơn 5-10 Mb bằng cách sử dụng CGH thông thường. Để phát hiện những bất thường như vậy, cần có một kỹ thuật có độ phân giải cao. a- CGH vượt qua nhiều hạn chế này.

1.5.2.4. Kỹ thuật lai so sánh bộ gen dùng chip DNA (Array Comparative Genomic Hybridization-aCGH)

Trong số các kỹ thuật sàng lọc rối loạn NST, kỹ thuật lai so sánh dùng chip DNA (aCGH) là kỹ thuật đầu tiên được sử dụng rộng rãi trên lâm sàng và được coi là tiêu chuẩn vàng trong sàng lọc di truyền trước chuyển phôi từ năm 2010. Kỹ thuật aCGH đơn giản và cho kết quả nhanh hơn kỹ thuật CGH cổ điển. Nguyên lý của kỹ thuật này cũng gần giống như kỹ thuật CGH nhưng có độ nhạy cao, kỹ thuật thao tác đơn giản và nhanh hơn.

a) Khái niệm và nguyên lý

Kỹ thuật array CGH thực hiện việc so sánh mẫu ADN cần phân tích với mẫu ADN chứng và thông qua sự khác biệt giữa 2 ADN này để phát hiện các trường hợp mất đoạn hoặc nhân đoạn nếu có trên ADN. Nguyên lý của kỹ thuật array CGH được dựa trên khả năng bắt cặp (base pair) hoặc còn được gọi một cách khác là lai (hybridise) giữa một mạch đơn của ADN này và một mạch đơn của ADN khác theo nguyên tắc bổ sung giữa các bazơ adenin (A) và Tymin (T), Guanin (G) và Cytosin (C) của các nuclêotit ⁵⁷.

b) Ứng dụng kỹ thuật lai so sánh bộ gen dùng chip DNA trong sàng lọc di truyền trước chuyển phôi trong thụ tinh trong ống nghiệm

Từ năm 2010, kỹ thuật aCGH đã được kiểm chứng xác minh và ứng dụng trong điều trị lâm sàng phục vụ chẩn đoán tiền làm tổ trên toàn thế giới. Kỹ thuật lai so sánh bộ gen được đặc trưng bởi độ phân giải cao, lợi thế chính của nó đối với CGH thông thường. Độ phân giải tiêu chuẩn khác nhau giữa 1 và 5 Mb, nhưng có thể tăng lên đến khoảng 40 kb bằng cách bổ sung mảng với các dòng vô tính. aCGH được chứng minh là kỹ thuật mang lại kết quả vượt trội để phát hiện những rối loạn NST ⁵⁸.

Alfarawati đã sử dụng aCGH để kiểm tra 500 phôi ngày năm của 93 cặp vợ chồng thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm cho kết quả: hơn 1 nửa số phôi (56,7%) có lệch bội NST. Gần 1 nửa số phôi ngày năm là bình thường trong khi chỉ có 37,5% số phôi ngày 3 là bình thường về NST. Điều này chứng tỏ rối loạn NST có ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi. Nghiên cứu cũng chứng tỏ tuổi mẹ cao là yếu tố nguy cơ gây rối loạn NST: tỷ lệ này tăng giữa các nhóm 31-37 và 38-47 tuổi tương ứng là: 51 và 60,7%. Trong đó, các rối loạn NST cũng tăng tương ứng: tỷ lệ lệch bội NST 21 tăng gấp 10 lần, tỷ lệ lệch bội NST 12,14,18 tăng gấp 5-6 lần, và rối loạn NST xảy ra ở tất cả các NST⁵⁹.

Nhiều thử nghiệm lâm sàng đối chứng ngẫu nhiên đã chứng minh kỹ thuật aCGH có hiệu quả lâm sàng làm tăng tỷ lệ có thai, giảm tỷ lệ sảy thai ở phôi được chuyển so với chỉ sàng lọc hình thái đơn thuần ⁶⁰.

Kỹ thuật lai so sánh bộ gen dùng chip DNA có nhiều ưu điểm vượt trội so với các kỹ thuật trước đó như: Đánh giá trên toàn bộ 24 NST trên 1 lần xét nghiệm duy nhất. Kỹ thuật này cho phép phát phân tích toàn bộ bộ gen và phát hiện chính xác các rối loạn NST không cân bằng như: lệch bội, mất đoạn, thêm đoạn. Hơn nữa, sử dụng aCGH không đòi hỏi cần định hướng trong chẩn đoán, đây là ưu điểm vượt trội so với kỹ thuật FISH.

Mặt khác, aCGH còn cho phép phát hiện các đột biến dạng khảm với mức khảm từ 10-30% tùy thuộc đó là đột biến rối loạn số lượng hay đột biến cấu trúc NST ⁶¹.

Tuy nhiên, kỹ thuật lai so sánh bộ gen dùng chip DNA cũng thể hiện những yếu điểm như: không phát hiện sự tái sắp xếp cân (chuyển vị tương hỗ, đảo đoạn, chuyển vị Robertson và chèn đoạn tương hỗ) và một số tái sắp xếp không cân (đột biến điểm, xóa, lặp đoạn là ở ngoài độ phân giải của kỹ thuật). Cũng như đã trình bày ở trên, aCGH chỉ phát hiện được mức khảm từ 10% trở lên, do vậy sẽ bỏ sót những trường hợp có tỷ lệ khảm dưới ngưỡng đó.

1.5.2.5. Kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (Next Generation Sequencing-NGS)

a) Khái niệm và nguyên lý

A-CGH là kỹ thuật đầu tiên để cho phép sàng lọc được cả 24 NST và đã được coi là “tiêu chuẩn vàng” của PGT-A thực hành. Tuy nhiên, công nghệ giải trình tự thế hệ mới NGS gần đây đã được giới thiệu cho để ứng dụng trong PGT-A với độ chính xác và tỷ lệ thành công cao hơn a-CGH. Kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới là một cuộc cách mạng về công nghệ giải trình tự vì nếu giải trình tự Sanger chỉ cho phép giải trình tự không quá 1500bp, hay pyrosequencing không quá 100bp, thì giải trình tự thế hệ mới cho phép giải được từ 36 Gb đến 600Gb, có nghĩa là cho phép giải trình tự nguyên bộ gen. Công nghệ này thực tế là phương thức giải trình tự đồng thời và lượng lớn các đoạn ngắn nucleotide. Do vậy kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới còn được gọi là giải trình tự bộ gen. Kỹ thuật NGS được kỳ vọng là làm giảm giá thành cho PGT-A và có độ chính xác cao.

b) Quy trình hoạt động của giải trình tự thế hệ mới

Giải trình tự thế hệ mới (NGS) yêu cầu tối ưu hóa việc khuếch đại DNA để giảm các sản phẩm giả (artifact) trong suốt quá trình khuếch đại. Sau khi khuếch đại DNA, các sản phẩm giả có thể được xác định và loại bỏ bởi các phần mềm tin sinh. Có hai thiết bị chính được sử dụng gần đây cho PGT-A là Miseq của Illumina và PGM của Thermo. Sau khi khuếch đại DNA, khoảng 50 ng mỗi mẫu DNA được cắt bằng enzyme thành hàng triệu đoạn và tập hợp lại (pooled) cho việc chuẩn bị thư viện. Chuẩn bị thư viện là tất cả các đoạn DNA được gắn với adapter và một mã vạch. Sau khi tạo thư viện, hoặc bước nhũ tương PCR được thực hiện với PGM, hoặc bước PCR cầu nối được thực hiện với Miseq. NGS cung cấp thông tin tại mỗi locus chứ không phải giữa các locus. Kỹ thuật này đã được chuẩn hóa cho phát hiện dị bội toàn bộ bộ NST, dị bội không phân mảnh (>50 Mb), hoặc các đoạn mất, lặp đáng kể về mặt lâm sàng. Kỹ thuật này không thể phát hiện thể khảm nếu khoảng 50% mẫu là thể khảm, mẫu sẽ được cho là phôi bất thường hoặc bất thường thể khảm⁶².

Quy trình hoạt động của NGS bao gồm 4 giai đoạn chính sau đây:

Bước 1: Chuẩn bị thư viện

Thư viện là các phân đoạn DNA. Các mẫu DNA được kiểm tra chất lượng bằng phương pháp điện di và được phân đoạn (fragmentation) bằng siêu âm. Tiếp theo các phân đoạn DNA này được kết nối với các mã vạch (barcode) và được đánh dấu (indexing) cho các bước phân tích máy tính tiếp theo.

Bước 2: Lai với các mẫu DNA dò (probe) đặc hiệu (2):

Sau khi đã chuẩn bị được thư viện là các phân đoạn DNA, các thư viện này sẽ được dùng để lai với các mẫu dò được thiết kế đặc hiệu cho các locus quan tâm. Trước khi đọc, các thư viện này được kiểm tra chất lượng trên thiết bị TapeStation (Agilent) và định lượng bằng máy Qubit (Life Technologies). Dùng PCR với mỗi đặc hiệu adapter để khuếch đại các đoạn DNA trên giá bám thành từng clone.

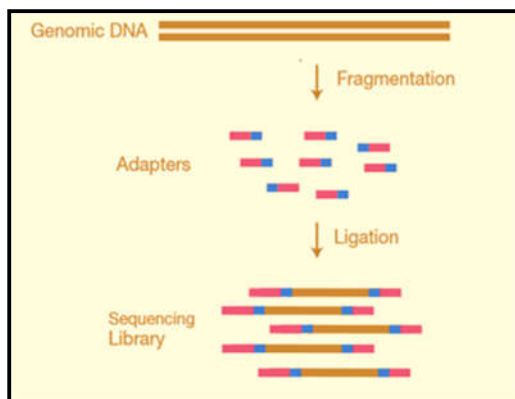
Bước 3: Đọc trình tự

Thư viện được đọc trên thiết bị giải trình tự thế hệ mới như NextSeq HiSeq hoặc Miseq. Việc đọc trình tự được thực hiện theo quy trình 2x150 chu kì, kết quả nhận được sẽ là 3.5 Gb trình tự.

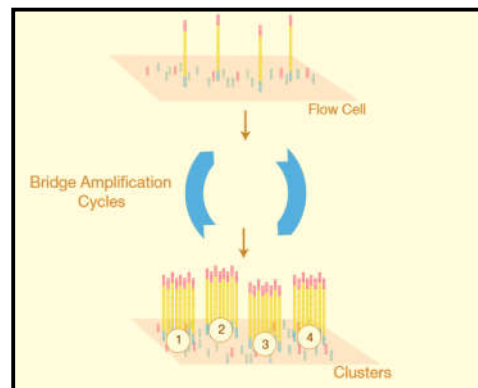
Bước 4: Phân tích số liệu

Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm Bluefuse Multi. Phần mềm này cho phép phát hiện các đột biến, tính toán thống kê ý nghĩa giữa các mẫu nghiên cứu.

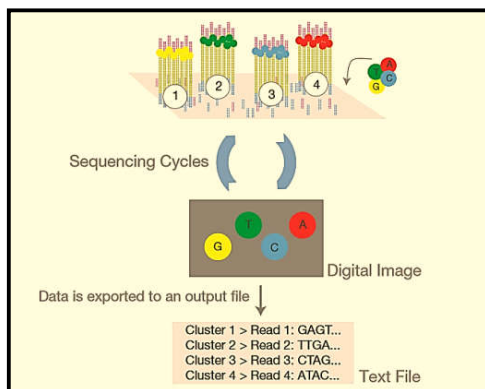
Những sai khác hay đột biến phát hiện sẽ được so sánh và kiểm chứng với cơ sở dữ liệu đột biến gen người (HGMD) tại <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.



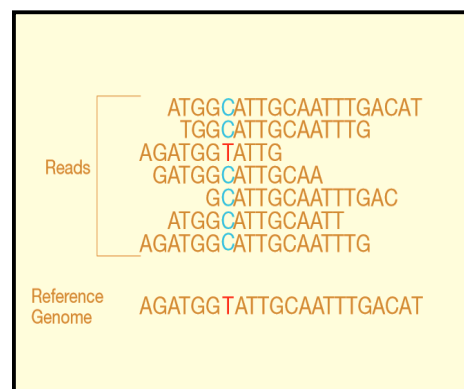
Bước 1: Chuẩn bị thư viện



Bước 2: Lai với các mẫu DNA dò



Bước 3: Đọc trình tự



Bước 4: Phân tích số liệu

Hình 1.7. Quy trình thực hiện giải trình tự thế hệ mới

c) Ứng dụng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới trong sàng lọc di truyền trước chuyển phôi trong thụ tinh trong ống nghiệm

Kỹ thuật này bắt đầu được áp dụng rộng rãi ở một số nước châu Âu và Mỹ từ năm 2014 để phân tích NST của phôi nang. Sàng lọc rối loạn NST trước chuyển phôi dựa trên kỹ thuật NGS khác rất nhiều so với các kỹ thuật khác. NGS thực hiện chỉ trên một vài tế bào phôi, dữ liệu chính xác, kỹ thuật phân tích đơn giản, các thiết bị đáng tin cậy và có giá thành hợp lý. Sàng lọc rối loạn NST dựa trên kỹ thuật NGS tạo ra nhiều lợi ích hơn aCGH như giảm chi phí giải trình tự, có khả năng đánh giá tổn thương cấu trúc NST, khả năng tự động hóa cao giúp giảm thiểu những sai sót trong quá trình thực hiện. Đánh giá số lượng bản sao NST dựa trên NGS có thể mang lại nhiều lợi ích cho mảng-CGH bao gồm: (i) giảm chi phí trình tự DNA có thể thực hiện bằng công nghệ phân tích thông lượng cao và số lượng mẫu có thể được giải trình tự đồng thời trong một thử nghiệm; (ii) tăng cường phát hiện một phần hoặc phân đoạn aneuploidies như là kết quả của sự gia tăng tiềm năng trong độ phân giải phân tích NST đến một vài megabases; (iii) tăng phạm vi động cho phép phát hiện khả năng phát hiện khám trong các mẫu đa bào; (iv) khả năng tự động hóa khả năng chuẩn bị thư viện sắp xếp để giảm thiểu lỗi của con người, giảm thời gian thực hành và cho phép thông lượng và tính nhất quán cao hơn. Gần đây chúng tôi đã nghiên cứu liệu NGS có thể được áp dụng đáng tin cậy cho PGT-A hay không bằng cách thực hiện xác nhận tiền lâm sàng rộng rãi của một giao thức sàng lọc aneuploidy 24-NST dựa trên NGS. Nghiên cứu đã chứng minh rằng NGS là một phương pháp mạnh mẽ có thể tìm thấy một nơi trong ứng dụng lâm sàng thông thường.

Bảng 1.1: So sánh các kỹ thuật sàng lọc phôi

	FISH	BACs-on-Beads	Next Generation Sequencing
Độ chính xác	★ ★ ★	★ ★ ★ ★	★ ★ ★ ★ ★
Phân tích toàn bộ 24 cặp NST	✗	✓	✓
Xét nghiệm từ mẫu đơn bào (1 tế bào)	✗	✓ Vài điểm	✓ Độ chi tiết rất cao
Xét nghiệm dị bội (k nguyên chiếc)	✓	✓	✓
Xét nghiệm NST bất thường nhiều hơn 2 bộ	✓	✗	✗

1.6. Ứng dụng của kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới trong sàng lọc di truyền trước chuyển phôi trong thụ tinh ống nghiệm

FISH là kỹ thuật đầu tiên được sử dụng trong PGT-A, nhưng đã sớm bộc lộ các nhược điểm lớn trong xét nghiệm sàng lọc và hiện nay ít còn được áp dụng trên thực tiễn lâm sàng. A-CGH là kỹ thuật đầu tiên để cho phép sàng lọc được cả 24 NST và hiện tại được coi là “tiêu chuẩn vàng” của PGT-A thực hành. Tuy nhiên, công nghệ giải trình tự thế hệ mới NGS gần đây đã được giới thiệu cho để ứng dụng trong PGT-A với độ chính xác và tỷ lệ thành công rất cao, chi phí phù hợp trong thực tiễn lâm sàng.

1.6.1. Đặc điểm của kỹ thuật NGS

Giống như các kỹ thuật trên, PGT-A sử dụng NGS cần thực hiện WGA với tế bào được sinh thiết để tạo ra đủ lượng DNA cho xét nghiệm.

Sau khi được khuếch đại, DNA phôi được phân mảnh và gắn barcode đặc trưng để theo dõi. Hàng trăm nghìn những đoạn nhỏ DNA phôi đã được gắn barcode (từ nhiều mẫu sinh thiết phôi) được trộn và giải trình tự song song.

Sau khi giải trình tự, phần mềm máy tính chuyên dụng được sử dụng để phân biệt các mã vạch theo dõi mẫu, do đó có khả năng tách biệt các kết quả theo mẫu sinh thiết.

Sau khi tách biệt, mỗi đoạn trình tự từ mỗi mẫu sẽ được so sánh với hệ gen tham chiếu và đóng với vùng NST tương ứng của nó.

Số lượng những trình tự đã được đóng dọc theo chiều dài của mỗi NST sau đó được tính toán.

Vì số lượng trình tự đã được đóng nên tỷ lệ với số bản copy trong mẫu gốc, thể một nhiễm và thể 3 nhiễm có thể được phân biệt rõ ràng dựa trên sự tăng hoặc giảm số lượng các trình tự đã được đóng dọc theo chiều dài của NST.

1.6.2. Ứng dụng kỹ thuật NGS trong sàng lọc di truyền trước chuyển phôi

Nhiều nghiên cứu gần đây đã chứng tỏ giải trình tự thế hệ mới là một công nghệ mang tính đột phá và sẽ giữ một vị trí quan trọng trong thực hành lâm sàng thụ tinh trong ống nghiệm. Các kết quả lâm sàng thu được trong nghiên cứu từ kỹ thuật PGT-A sử dụng phương pháp NGS là rất đáng khích lệ.

Vai trò tiềm năng của NGS trong PGT-A đã được Yin và cs⁶³ đánh giá, qua việc phân tích 38 mẫu sinh thiết phôi nang dùng cả SNP array và NGS. Tất cả 26 phôi lưỡng bội và 6 phôi lệch bội đồng nhất đều được xác định chính xác bằng cả SNP array và NGS. Hơn nữa, NGS cũng phát hiện được tất cả 6 phôi có sự chuyển vị NST không cân bằng, một trong số đó không được phát hiện bởi SNP array.

Năm 2014, Fiorentino và cộng sự đã thực hiện một nghiên cứu hồi cứu để xác nhận việc sử dụng NGS cho PGT-A trên những tế bào đơn: 18 dòng tế bào đơn có bất thường về NST và đã biết NST đồ; 190 sản phẩm khuếch đại toàn bộ hệ gen từ một phôi bào (được phân tích trước đó bằng aCGH) từ 68 chu kỳ PGT-A được đánh giá bằng NGS. Tổng thể, 4993 NST đã được kiểm tra, có tới 402 NST bất thường. Xét trên tổng số 4993 NST được kiểm tra, NGS có độ nhạy là 100% và độ đặc hiệu 99,98%. Xét trên tổng thể 208 mẫu được kiểm tra, cả độ nhạy và độ đặc hiệu là 100%. Đối với NST không tương xứng với aCGH, NGS đã được xác minh là cho kết quả trisomy 18 dương tính giả (không được

phát hiện khi sử dụng a CGH và được kiểm tra bằng kỹ thuật thứ ba là q PCR thì là bình thường). Tuy nhiên, vì hiện tượng dương tính giả này xảy ra trong mẫu sinh thiết có rất nhiều những lệch bội khác, nên về tổng thể sự đồng nhất về sự lệch bội NST của phôi giữa các kỹ thuật này là 100% (208/208) ⁶⁴.

Dựa trên thành công của các đánh giá tiền lâm sàng ban đầu này, Fiorentino và cs ⁵² đã thực hiện một nghiên cứu tiền cứu để đánh giá tiềm năng lâm sàng NGS khi thực hiện song song với a CGH trên các mẫu sinh thiết phôi nang. Tổng số 192 phôi nang từ 55 chu kỳ PGT-A được sinh thiết và được đánh giá bởi cả NGS và a CGH. Những kết quả phù hợp tương đương giữa 2 phương pháp là 191/192 phôi nang (99.5%). Xét trên tổng thể 192 phôi nang, cả độ nhạy và độ đặc hiệu của NGS đều là 100%, Trong tổng số 4608 NST được kiểm tra, có 211 NST (4,6%) là bất thường. Xét trên tổng 4608 NST, độ nhạy của NGS là 100% (221/221, 95CI: 99,25-100) và độ đặc hiệu là 99,98% (4333/4334, 95 CI:99,87-100). Trường hợp duy nhất có sự không tương đồng giữa 2 phương pháp là trường hợp lệch bội nhiều NST, và có sự sai chẩn đoán ở NST số 22 và cả 2 phương pháp đều đưa ra khuyến cáo không chuyển phôi này. Một lần nữa, một mẫu có sự không trùng khớp về một vài lệch bội, do đó NGS đạt được tổng thể 100% cả độ nhạy và độ đặc hiệu. Chuyển 50 phôi của 47 phụ nữ cho kết quả: 34 trường hợp có thai sinh hóa bao gồm 30 trường hợp có túi thai và tim thai (64%), 3 trường hợp chỉ có thai sinh hóa và 1 trường hợp sảy thai. Tổng cộng cho ra 32 phôi có túi thai (tỷ lệ làm tổ 62%) và sinh ra 31 đứa trẻ khỏe mạnh.

Yang và cs thực hiện một nghiên cứu lâm sàng ngẫu nhiên nhằm kiểm chứng hiệu quả của NGS dùng trong PGT-A so sánh với a CGH. Trong nghiên cứu này, 172 bệnh nhân (độ tuổi trung bình của mẹ là 35.2 ± 3.5) được chia ngẫu nhiên vào 2 nhóm. Nhóm thứ nhất (n=86) được sàng lọc phôi nang NGS, trong khi nhóm thứ hai (n=86) phôi nang được sàng lọc bằng a CGH. Tất cả phôi nang đã được đông phôi sau khi sinh thiết và chờ kết quả PGT-A. Sau đó, 1 hoặc 2

phôi nang lưỡng bội được rã đông để chuyển trong chu kỳ chuyển phôi đông lạnh tiếp theo. Kết quả tương đương nhau 100% về kết quả sàng lọc di truyền giữa NGS và aCGH. Hơn nữa, kết quả chuyển phôi cũng cho kết quả tương đương nhau về tỷ lệ có tim thai (74.7 so với 69.2%, $p > 0.05$) và tỷ lệ làm tổ (70.5 so với 66.2%, $p > 0.05$), lần lượt của NGS và aCGH ⁶⁵.

Năm 2018, Friedenthal đã thực hiện nghiên cứu đánh giá hiệu quả của PGT-A-NGS trong thụ tinh ống nghiệm chuyển đơn phôi, có so sánh với PGT-A – aCGH. Nghiên cứu trên 916 chu kỳ chuyển đơn phôi đông, bao gồm 548 chu kỳ PGT-A-NGS và 368 chu kỳ PGT-ACGH. Kết quả là tỷ lệ làm tổ của trong nhóm được làm PGT-A-NGS cao hơn nhóm được làm PGT-ACGH (71,6 so với 64,6). Tỷ lệ có thai tiến triển trên số trẻ sống và tỷ lệ có thai sinh hóa của 2 nhóm PGT-A-NGS và PGT-ACGH lần lượt là: 62% so với 54,4% và 8,7% so với 15,1%. Tỷ lệ sảy thai ở 2 nhóm là tương đương nhau :12,4% và 12,7%. Những kết quả trên dẫn đến kết luận sàng lọc di truyền trước chuyển phôi bằng NGS có những kết quả tốt hơn trên tỷ lệ có thai và tỷ lệ trẻ sinh sống so với kỹ thuật aCGH ⁶⁶.

Năm 2017, Coates và cộng sự đã tiến hành thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng so sánh hiệu quả PGT-A-NGS trên 2 nhóm chuyển phôi đông và phôi tươi trên 179 bệnh nhân. Tỷ lệ làm tổ, tỷ lệ có thai và tỷ lệ trẻ sống ở nhóm phôi đông và phôi tươi lần lượt là 75% so với 67%, 80% so với 61% và 77% so với 59%. Kết quả cho thấy có sự tiến bộ đáng kể trong thụ tinh ống nghiệm dù có dùng chuyển phôi đông hay phôi tươi có làm PGT-A-NGS mặc dù kết quả của chuyển phôi đông có tốt hơn so với chuyển phôi tươi ⁶⁷.

Để đánh giá tỷ lệ có thai của PGT-A-NGS so với thụ tinh ống nghiệm thông thường, Liss và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu thuần tập tiên cứu trên 197 cặp vợ chồng, 112 người vợ được chuyển phôi đông đã được sàng lọc di truyền bằng NGS, nhóm chứng gồm 85 người vợ được chuyển phôi đông chỉ được sàng lọc hình thái trước chuyển phôi. Kết quả cho thấy PGT-A-NGS mang lại hiệu quả vượt trội so với IVF đơn thuần. Tỷ lệ thai làm tổ, tỷ lệ thai

lâm sàng lần lượt là 41,2% so với 22,2% và 42% so với 23,5% ($p < 0,05$). Tỷ lệ trẻ sinh sống cũng cao hơn hẳn (42% so với 23,5%). Hơn nữa, PGT-A-NGS giúp giảm tỷ lệ sảy thai (9,6% so với 28,6% ở nhóm không làm sàng lọc trước chuyển phôi, $p = 0,027$)⁶⁸.

Dựa trên kết quả của những nghiên cứu trên, tác giả kết luận rằng NGS là kỹ thuật có độ chính xác, hiệu quả và có triển vọng sử dụng thường quy trong sàng lọc di truyền trước chuyển phôi nhằm tăng hiệu quả của kỹ thuật thụ tinh ống nghiệm^{52,69}.

Tại Việt Nam, hầu như chưa có công bố nào về xây dựng, đánh giá qui trình và độ tin cậy của xét nghiệm này tại Việt Nam, do vậy việc nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật NGS trong sàng lọc 24 NST trước chuyển phôi cũng như sử dụng kỹ thuật này đánh giá các yếu tố ảnh hưởng tới kết quả thụ tinh ống nghiệm là cần thiết.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu của mục tiêu phân tích kết quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới ở các phôi thụ tinh trong ống nghiệm bao gồm các phôi của các cặp vợ chồng có nguy cơ cao, thực hiện sàng lọc phôi.

- Đối tượng nghiên cứu của mục tiêu đánh giá hiệu quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi đối với kết quả có thai trong thụ tinh trong ống nghiệm và một số yếu tố liên quan đến tình trạng rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi gồm các cặp vợ chồng thực hiện kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.1.2. Tiêu chuẩn lựa chọn

- Lựa chọn đối tượng nghiên cứu phục vụ sàng lọc: đạt **từ một** trong các tiêu chuẩn sau:

- + Người vợ trên 35 tuổi.
- + Tiền sử thất bại làm tổ liên tiếp
- + Tiền sử sảy thai tái diễn (từ 2 lần).
- + Cặp vợ chồng đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.1.3. Tiêu chuẩn loại trừ

- Các đối tượng sau sẽ bị loại trừ khỏi nhóm theo dõi để đánh giá hiệu quả của phương pháp sàng lọc khi vi phạm từ một trong các tiêu chuẩn sau:

- + Dị dạng tử cung
- + Người xin noãn, xin phôi.
- + Bệnh nhân bị lạc nội mạc tử cung tại tử cung hoặc buồng trứng
- + Tinh dịch đồ người chồng bất thường
- + Trường hợp không thực hiện theo chỉ dẫn của bác sĩ và nghiên cứu
- + Không đủ hồ sơ nghiên cứu hỗ trợ sinh sản.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả

2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

2.2.2.2. Cơ mẫu nghiên cứu mục tiêu 1: Phân tích kết quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới ở các phôi thụ tinh trong ống nghiệm

Nội dung nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang có phân tích. Do vậy, chúng tôi tính cỡ mẫu cho nghiên cứu theo công thức trên phần mềm Sample Size của tổ chức Y tế Thế giới WHO:

$$n = Z_{(1-\alpha/2)}^2 \times \frac{p(1-p)}{d^2}$$

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 $Z_{(1-\alpha/2)} = 1,96$

d là độ sai lệch của nghiên cứu so với thực tế (vì khi nghiên cứu là kết quả của một quần thể = N, mà không phải toàn bộ cộng đồng nên khi áp dụng cho cộng đồng sẽ có sai lệch d nhất định. Độ sai lệch này chỉ trong giới hạn 0,1% tới 10%. Chúng tôi chọn giá trị $d = 0,055$ để đảm bảo giới hạn cho phép về thống kê.

p là tỷ lệ đại diện cho tiêu thức nghiên cứu (tỷ lệ rối loạn NST) được xác định ở mục tiêu nghiên cứu và liên quan đến độ sâu của nghiên cứu.

1 – p biểu thị tỷ lệ bình thường.

Áp dụng vào nghiên cứu này:

Độ tin cậy = 95% tương ứng với $\alpha = 5\%$ thì $Z_{(1-\alpha/2)} = 1,96$

$p = 56\% = 0,56$ (tỷ lệ phôi nang có rối loạn NST theo nghiên cứu của F

E. Fragouli D. Wells ⁷⁰.

$q = 1 - 0,56 = 0,44$

$d = 0,055$

Từ công thức trên, tính được cỡ mẫu tối thiểu cho nghiên cứu là 313 phôi. Ở nghiên cứu này, thực tế 603 phôi nang đã được sử dụng đánh giá.

2.2.2.1. Cỡ mẫu nghiên cứu cho mục tiêu 2: *Đánh giá hiệu quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi đối với kết quả có thai trong thụ tinh trong ống nghiệm và một số yếu tố liên quan đến tình trạng rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi.*

Cỡ mẫu ước lượng được tính theo công thức:

$$n = \frac{\left\{ z_{1-\alpha/2} \sqrt{2\bar{P}(1-\bar{P})} + z_{1-\beta} \sqrt{P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)} \right\}^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

Trong đó:

- Độ tin cậy $(1-\alpha) = 0,95$.
- Độ mạnh kiểm định $(1-\beta) = 80\%$.
- P_1 : Tỷ lệ có thai tiến triển của nhóm không sàng lọc di truyền 24 NST trước chuyển phôi, trong nghiên cứu lấy $P_1 = 41,7\%$ theo tác giả Yang (2012) ⁵⁸
- P_2 : Tỷ lệ có thai tiến triển của nhóm được sàng lọc 24 NST trước chuyển phôi, trong nghiên cứu lấy $P_2 = 69,1\%$ theo tác giả Yang (2012) ⁵⁸.

Thay vào công thức tính được cỡ mẫu tối thiểu cho mỗi nhóm là 51.

Trên thực tế, nghiên cứu này tiến hành trên 60 cặp vợ chồng mỗi nhóm.

2.2.3. Chọn mẫu nghiên cứu

2.2.3.1. Mục tiêu 1: *Phân tích kết quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới ở các phôi thụ tinh trong ống nghiệm*

Lựa chọn đối tượng nghiên cứu gồm các phôi của các cặp vợ chồng thực hiện kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm có phôi nang tạo ra bằng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) tại Viện Mô phôi lâm sàng Quân đội – Học viện Quân Y trong thời gian từ tháng 10 năm 2017 đến tháng 8 năm 2018. Số phôi này bao gồm cả 288 phôi được sàng lọc nhiễm sắc thể ở mục tiêu 2. Toàn bộ các phôi nang lấy lần lượt từ khi nghiên cứu cho đến khi đủ số lượng nghiên cứu.

2.2.3.2. Mục tiêu 2: *Đánh giá hiệu quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi đối với kết quả có thai trong thụ tinh trong ống nghiệm và một số yếu tố liên quan đến tình trạng rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi:*

+ Nhóm 1 (Nhóm sàng lọc di truyền bằng PGT-A): 60 cặp vợ chồng hiếm muộn thỏa mãn tiêu chuẩn lựa chọn được áp dụng phương pháp sàng lọc PGT-A-NGS

+ Nhóm 2 (Nhóm không được sàng lọc bằng PGT-A): 60 cặp vợ chồng vô sinh đạt tiêu chuẩn nghiên cứu. Tiến hành các bước tương tự như đối tượng nghiên cứu nhưng không tiến hành sàng lọc di truyền rối loạn 24 NST.

2.2.4. Phương tiện và quy trình thực hiện

Để thu thập các thông tin lựa chọn bệnh nhân vào mẫu nghiên cứu đúng tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ, đồng thời thu nhập các biến số nghiên cứu: tuổi, tính chất kinh nguyệt, tình trạng vô sinh, loại vô sinh, thời gian vô sinh, tiền sử sảy thai, tiền sử IUI thất bại, tiền sử thất bại làm tổ thụ tinh ống nghiệm.

Giai đoạn 1: Khám và điều trị kích thích phóng noãn

- Khám: đánh giá chiều cao, cân nặng của bệnh nhân, đo huyết áp

- Tiến hành các xét nghiệm:

+ Xét nghiệm đối với người vợ:

1. Siêu âm kiểm tra tử cung, phần phụ

2. Chụp XQ vòi tử cung

3. Xét nghiệm nội tiết người vợ (FSH, E₂, LH, TSH, AMH, beta hCG, Progesteron, Prolactin).

+ Xét nghiệm đối với người chồng: Xét nghiệm tinh dịch đồ

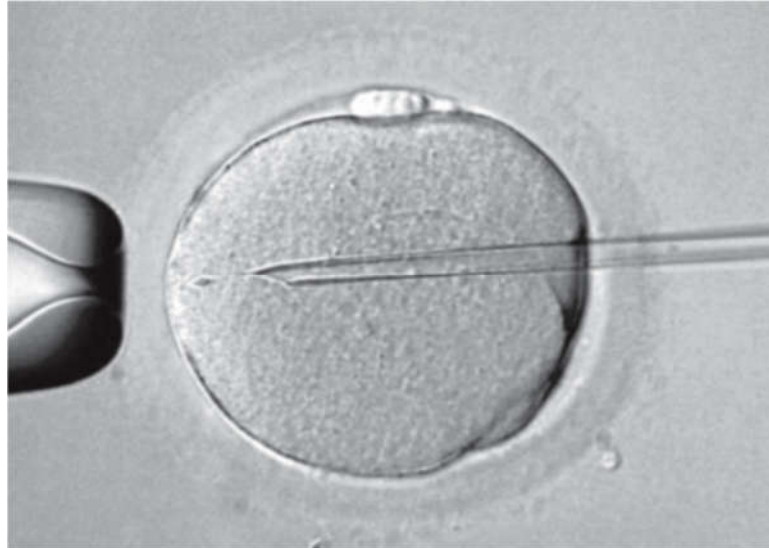
- Kích thích phóng noãn, thu noãn trên bệnh nhân làm IVF

Tiến hành kích thích phóng noãn theo phác đồ đang được sử dụng rộng rãi hiện nay trên thế giới cũng như Việt Nam (phác đồ long protocol, phác đồ flare-up, phác đồ antagonist).

Giai đoạn 2: Tiến hành kỹ thuật IVF/ICSI (thụ tinh ống nghiệm/ Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn)

Noãn được gột sạch các tế bào nang xung quanh, mỗi noãn trưởng thành được đặt vào trong một giọt G-IVF plus có thể tích 5 μ l, tinh trùng sau lọc rửa cho vào giọt dầu PVP dần mỏng đặt tại trung tâm đĩa petri có đường kính 3 cm có phủ dầu Ovoil. Kỹ thuật ICSI thực hiện trên đĩa nhiệt của kính hiển vi đảo ngược Nikon TE2000, độ phóng đại 200 lần có gắn bộ vi thao tác. Noãn được xoay sao cho thể cực ở vị trí 6 hoặc 12 giờ rồi cố định bằng kim giữ tại điểm 9 giờ. Tinh trùng được hút vào kim tiêm, và tiêm tinh trùng vào trong bào tương của noãn tại điểm 3 giờ. Noãn sau khi thực hiện ICSI được rửa 2 lần trong môi trường G-IVF plus sau đó tiếp tục được

nuôi cấy trong môi trường G1, trong tủ ẩm Bench-top, Origio BT37 khí trộn 6% CO₂, 5% O₂, 37°C.



Hình 2.4. Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn

** Nguồn: Phôi bệnh nhân nghiên cứu*

- *Nuôi cấy phôi:*

Sau 16 - 18 giờ thực hiện kỹ thuật ICSI (tiêm tinh trùng vào bào tương noãn), noãn được đánh giá thụ tinh, noãn thụ tinh bình thường được nuôi cấy trong môi trường G2 đến ngày 3, đánh giá chất lượng và đục lỗ màng trong suốt có kích thước 7 μ m rồi tiếp tục nuôi cấy đến giai đoạn phôi túi.

Phôi đến ngày thứ 5 khi trở thành blastocyst sẽ được lựa chọn theo các tiêu chuẩn hình thái của tác giả Gardner để sinh thiết sàng lọc gen trước khi trữ đông. Phôi ngày 5 được đánh giá theo hệ thống đánh giá điểm của tác giả David K Gardner tại các thời điểm trước sinh thiết, sau sinh thiết và sau rã đông⁷¹.

Bảng 2.1: Đánh giá phôi nang theo tiêu chuẩn của Gardner D. K (1999)

Sự phát triển của khoang phôi nang	
1	Giai đoạn sớm phôi nang: khoang phôi <50% thể tích của phôi.
2	Phôi nang: khoang phôi \geq 50% thể tích của phôi.
3	Phôi nang đầy đủ: khoang phôi chiếm hoàn toàn thể tích phôi.
4	Phôi nang mở rộng: khoang phôi phát triển, màng trong suốt mỏng.
5	Phôi nang đang thoát màng: lá nuôi bắt đầu thoát khỏi màng trong suốt.
6	Phôi nang đã thoát màng: phôi nang đã thoát khỏi màng trong suốt.
Xếp loại cho nụ phôi (ICM)	
A	Khi có nhiều tế bào, gắn kết chặt với nhau.
B	Khi chỉ có vài tế bào gắn kết lỏng lẻo.
C	Khi có rất ít tế bào.
Xếp loại cho lá nuôi (TE)	
A	Có nhiều tế bào tạo nên biểu mô liên kết chặt chẽ với nhau.
B	Có ít tế bào; liên kết lỏng lẻo.
C	Có rất ít tế bào tạo nên một biểu mô lỏng lẻo.

ICM: Inner Cell Mass

TE: Trophectoderm Epithelium

Bảng 2.2. Xếp loại tiêu chuẩn đánh giá phôi

Xếp loại	Tiêu chuẩn
Tốt	Phôi có độ giãn nở \geq 3. Phân loại ICM và TE là: AA; AB; BA
Trung bình	Phôi có độ giãn nở \geq 3. Phân loại ICM và TE là: BB; CA
Xấu	Phôi có độ giãn nở < 3. Hoặc phôi có độ giãn nở \geq 3 nhưng phân loại ICM và TE là: AC; BC; CB; CC

- Sinh thiết phôi nang và rửa mẫu chứa tế bào phôi sinh thiết được:

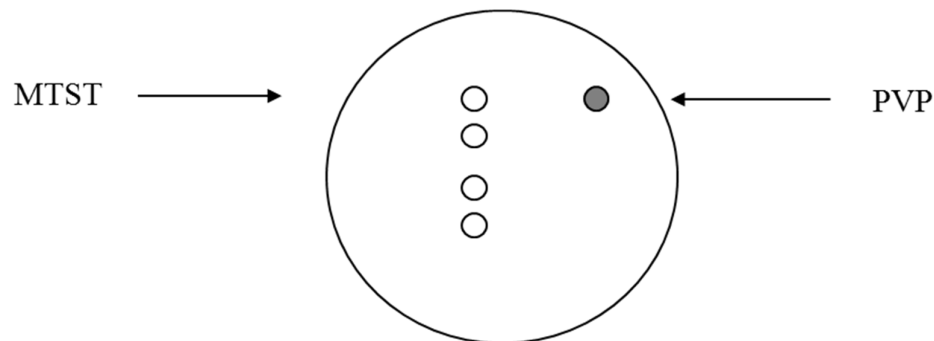
Các phôi thụ tinh trong ống nghiệm đạt mốc thời gian 5 ngày tuổi (khoảng 60 tế bào) sẽ được sinh thiết để lấy ra khoảng 3 đến 5 tế bào bởi các chuyên viên phôi học tại phòng nuôi cấy phôi của Trung tâm Thụ tinh nhân tạo. Quá trình sinh thiết được tiến hành như sau:

+ Chuẩn bị đĩa sinh thiết:

Sử dụng đĩa petri sinh thiết phôi 30x10mm (Falcon) vô trùng và đánh số.

Dùng micropipet tạo 4 giọt môi trường sinh thiết phôi và 1 giọt môi trường PVP, thể tích mỗi giọt là 5 μ l.

Phủ dầu OVOIL dạng lỏng và để ổn định một giờ trong tủ cấy 37 $^{\circ}$ C không có CO₂.



Hình 2.1. Chuẩn bị đĩa sinh thiết phôi

MTST. Môi trường sinh thiết - G2.

+ Kỹ thuật sinh thiết:

Khởi động máy vi tính và phần mềm laser.

Gắn kim giữ (bên trái) và kim sinh thiết (bên phải) vào hệ thống vi thao tác.

Chỉnh áp lực của kim sinh thiết: hút 1 đoạn dầu OVOIL vào kim, tiếp theo hút 1 đoạn PVP (môi trường này có độ nhớt cao sẽ giúp cho áp lực của kim ổn định hơn).

Chờ cho hình thành phôi nang và có 6 - 10 tế bào lá nuôi chui qua lỗ thủng thì tiến hành sinh thiết.

Chuẩn bị đĩa sinh thiết.

Đặt từng phôi túi vào từng giọt môi trường sinh thiết, để ủ ấm 37°C, trong thời gian 10 phút.

Xoay phôi nang để đưa các tế bào lá nuôi chui qua lỗ thủng ở vị trí 3 giờ.

Cố định phôi bằng kim giữ tại vị trí 9 giờ.

Dùng kim sinh thiết có đường kính 20µm vừa hút vừa kéo tế bào lá nuôi, kết hợp với laser để cắt rời khỏi phôi túi.

Các tế bào lá nuôi sinh thiết được rửa qua 3 giọt môi trường PBS1X+ 1% PVP (30µl/1 giọt) rồi chuyển vào tuýp eppendorf cùng với thể tích PBS 2,4µl, cất trong hộp chuyên dụng và gửi đến labo di truyền.

Các tế bào sinh thiết được sẽ được chuyển về Labo sinh học phân tử thuộc Bộ môn Giải phẫu của Học viện Quân Y để kiểm tra bất thường về mặt di truyền.



Hình 2.2. Sinh thiết phôi bào từ phôi túi

** Nguồn: Bệnh nhân nghiên cứu*

1. Kim giữ

3. Tế bào lá nuôi được sinh thiết

2. Phôi túi

4. Kim giữ

Phôi túi sau sinh thiết, rửa qua 4 giọt môi trường G2 và chuẩn bị đông lạnh bằng kỹ thuật thủy tinh hóa.

- Quy trình đông lạnh phôi túi bằng kỹ thuật thủy tinh hoá theo phương pháp Cryotop của Masashige Kuwayama (2005).

Đông lạnh phôi túi thường quy sử dụng bộ kit đông lạnh của hãng Kitazato, của Nhật Bản sản xuất. Áp dụng quy trình đông lạnh cực nhanh theo phương pháp Cryotop của Masashige Kuwayama (2005)



Hình 2.3. Bộ môi trường và dụng cụ lưu trữ phôi
1. Môi trường đông lạnh 2. Cryotop 3. Đĩa repro

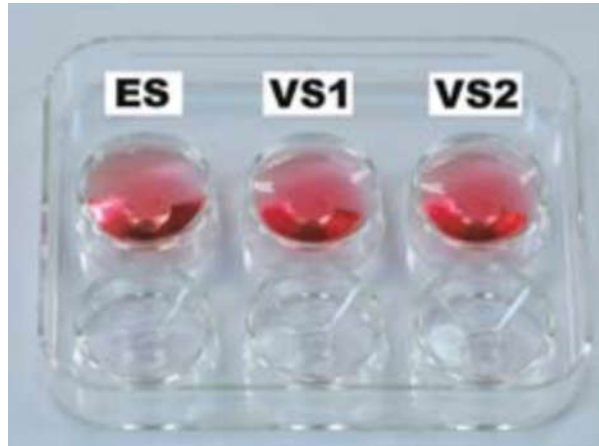


Hình 2.4. Bộ môi trường và dụng cụ rã đông phôi
1. Môi trường rã đông 2. Đĩa repro 3. Đĩa petri

+ Chuẩn bị môi trường:

Môi trường cân bằng (ES) và môi trường thủy tinh hóa (VS) được chuẩn bị khoảng 30 phút trước khi sử dụng và giữ ở nhiệt độ phòng (25 - 27°C).

Ghi nhãn ES, VS1, VS2, mỗi giếng chứa 300 μ l môi trường.



Hình 2.5. Chuẩn bị môi trường đông lạnh

+ Cân bằng thẩm thấu:

Đặt phôi túi vào giếng ES, ngay sau khi tiếp xúc với môi trường cân bằng, thể tích phôi sẽ giảm đi nhanh chóng do hiện tượng mất nước và từ từ trở về trạng thái ban đầu, thời gian trong ES là 15 phút.

+ Thủy tinh hoá:

Sau khi hoàn thành bước cân bằng, chuyển phôi sang giếng VS1, sau 60 giây, chuyển phôi sang giếng VS2 trong 30 giây, lúc này thể tích phôi sẽ giảm thêm lần nữa, phôi bị co rút lại. Nhanh chóng đặt phôi lên phần đầu của cryotop với lượng rất ít môi trường thủy tinh hóa, rồi nhúng trực tiếp vào nitơ lỏng, toàn bộ quá trình diễn ra trong vòng 1 phút 30 giây.

+ Lưu trữ:

Sau khi đặt nắp dụng cụ chứa phôi cho vào cassette đã ghi đầy đủ thông tin bệnh nhân và cất vào thùng ni tơ lỏng.

Giai đoạn 3: Giải trình tự gen (mô tả chi tiết ở phụ lục 2)

- *Khuếch đại toàn bộ hệ gen*
- *Điện di gel agarose*
- *Kiểm tra nồng độ ADN sau quá trình khuếch đại toàn bộ hệ gen bằng Qbit*
- *Chuẩn bị thư viện cho quá trình giải trình tự trên hệ thống NGS*
- *Giải trình tự*
- *Phương pháp phân tích dữ liệu giải trình tự và xác định rối loạn NST*

Trong suốt quá trình giải trình tự, phần mềm Real-time Analysis sẽ tạo ra các file dữ liệu bao gồm thông số được sử dụng cho phần mềm Miseq Reporter để phân tích thứ cấp. Cả hai phần mềm này đều được cài tích hợp sẵn trong hệ thống giải trình tự Miseq. Các chỉ số bao gồm: các cluster đạt tiêu chuẩn, chất lượng trình tự nucleotide đạt độ chính xác 99,999% (Q30), giá trị phasing và pre-phasing trong quá trình giải trình tự⁷².

Chúng tôi sử dụng phần mềm Miseq Reporter phiên bản 2.6 để phân tích dữ liệu giải trình tự thứ cấp. Quá trình này bao gồm: phân tách dữ liệu của các mẫu trong cùng 1 lần chạy thành các file dữ liệu riêng, chuyển dữ liệu dạng ảnh chụp thành file trình tự chữ có dạng FASTQ file, so sánh và căn chỉnh theo trình tự tham chiếu và gọi tên các nucleotide hoàn chỉnh và các đa hình nucleotide. Từ đó, đưa ra kết luận về phân tích nhiễm sắc thể của phôi.

Giai đoạn 4: Chuyển phôi vào buồng tử cung của người vợ sau khi đã sàng lọc rối loạn NST

1. Quy trình chuẩn bị niêm mạc chuyển phôi lưu cho người vợ

Bệnh nhân được dùng liệu pháp hormone ngoại sinh trong quy trình chuẩn bị nội mạc tử cung theo phác đồ chung của bệnh viện, cụ thể như sau:

+ Vào ngày 2-3 của chu kỳ kinh, bệnh nhân được tiến hành siêu âm đánh giá tử cung, niêm mạc tử cung, 2 buồng trứng. Dựa vào kết quả

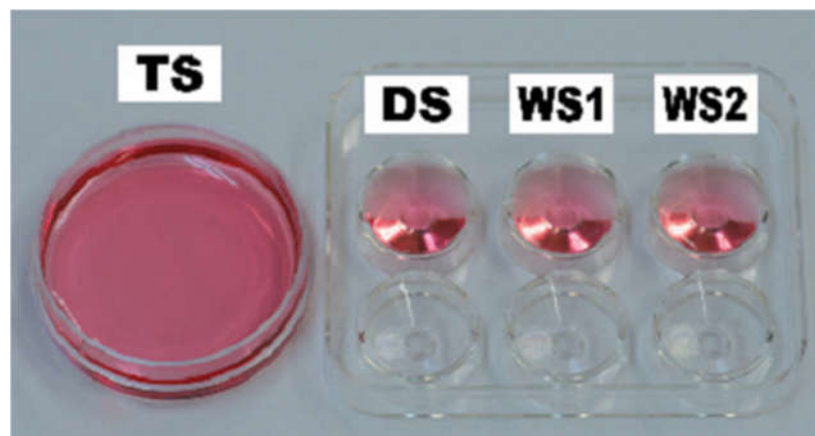
thăm khám và tiền sử của người bệnh bắt đầu dùng thuốc với liều estrogen phù hợp.

+ Khám các ngày 7 và 10 để đánh giá NMTC. Tại các ngày 7 và 10 nếu NMTC < 7 mm, xem xét tăng liều estrogen.

+ Khám các ngày 14, 16 nếu NMTC đủ dày (7-14 mm) và không có bất thường thì cho đơn thuốc thêm progesteron để mở cửa sổ làm tổ. Nếu chưa đủ dày thì cho thuốc hẹn khám tiếp theo sau mỗi 2-5 ngày. Nếu siêu âm ở các lần tái khám, niêm mạc tử cung < 7 mm thì quyết định huỷ chu kì do niêm mạc tử cung mỏng (có thể theo dõi tối đa đến ngày 28, trong các lần tái khám, nếu tiền lượng niêm mạc không thể đủ dày để chuyển phôi thì có thể huỷ chu kì sớm hơn mà không chờ đến ngày 28).

2. Quy trình rã đông phôi túi bằng kỹ thuật thủy tinh hoá theo phương pháp Cryotop của Massashige Kuwayama (2005)

+ Chuẩn bị môi trường rã đông:



Hình 2.6. Chuẩn bị môi trường rã đông

Môi trường rã đông (TS) được chuẩn bị trong đĩa petri đường kính 35mm.

Môi trường hòa tan (DS), môi trường rửa (WS) lần lượt được cho vào các giếng DS, WS1, WS2 của đĩa repro, mỗi giếng chứa 300 μ l môi trường.

Môi trường rã đông được làm ấm đến 37⁰C trong thời gian ít nhất là 1,5 giờ. Các môi trường còn lại được làm ấm đến nhiệt độ phòng (25 - 27⁰C).

+ Rã đông phôi túi: Cryotop chứa phôi lấy từ trong nitơ lỏng, được nhúng trực tiếp vào môi trường rã đông TS, phôi sẽ rời khỏi cryotop vào trong môi trường. Sau 1 phút, chuyển phôi sang môi trường hòa tan DS.

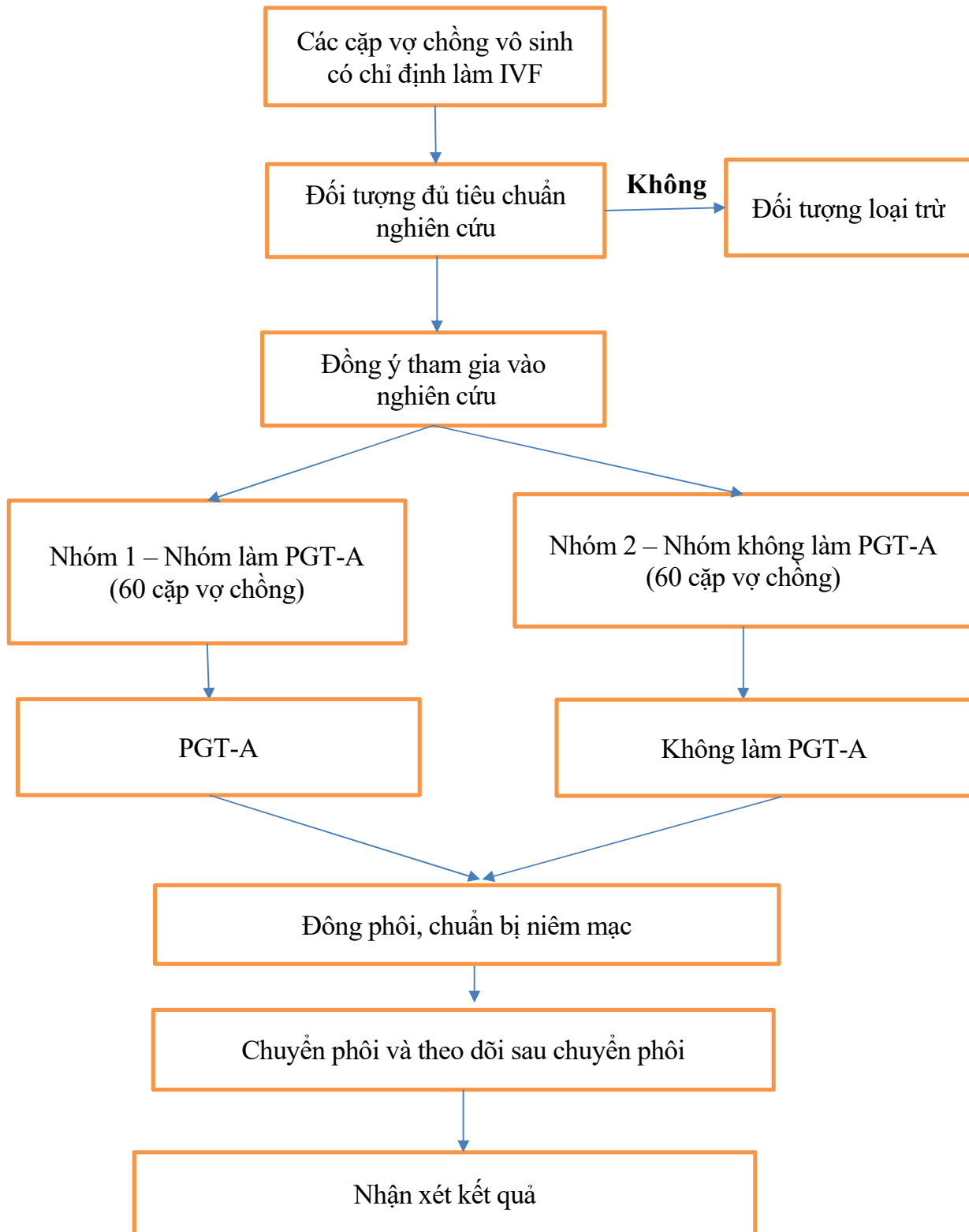
+ Pha loãng: Phôi được để trong môi trường hòa tan trong 3 phút, ở đây nồng độ của chất bảo quản bên trong phôi sẽ được hòa loãng, hình dạng của phôi dần được phục hồi.

+ Rửa: Từ môi trường hòa tan, phôi lần lượt chuyển sang WS1 trong 5 phút và WS2 trong 1 phút, trong giai đoạn này phôi sẽ được khôi phục lại hoàn toàn hình thái như trước khi trữ lạnh, chất bảo quản lạnh trong phôi được kéo hết ra môi trường. Sau đó phôi được chuyển sang môi trường nuôi cấy G2 và nuôi trong tủ cấy Benchtop ở nhiệt độ 37⁰C, 6% CO₂, 5% O₂ trong thời gian 2 giờ trước khi tiến hành chuyển phôi.

3. Chuyển phôi

Phôi có kết quả xét nghiệm NST bình thường sẽ được rã đông và chuyển vào buồng tử cung cho bệnh nhân sau khi niêm mạc bệnh nhân đã đạt đủ tiêu chuẩn. Đánh giá kết quả sau 14 ngày chuyển phôi. Theo dõi kết quả có thai sinh hoá, có thai lâm sàng và tỉ lệ thai tiến triển.

Dưới đây là sơ đồ nghiên cứu áp dụng và đánh giá kỹ thuật sàng lọc rối loạn NST trước chuyển phôi trong thụ tinh ống nghiệm



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

2.2.5. Các biến số và chỉ số nghiên cứu

2.2.5.1. Đặc điểm của bệnh nhân

- Tuổi vợ: phân thành các nhóm <35 tuổi, 35-39 tuổi, 40-45 tuổi và >45 tuổi.
- Loại vô sinh:
 - + Vô sinh nguyên phát (vô sinh I): hai vợ chồng chưa từng có thai, mặc dù đã sống với nhau trên một năm và không dùng biện pháp tránh thai nào.
 - + Vô sinh thứ phát (vô sinh II): hai cặp vợ chồng có ít nhất một lần thụ thai tự nhiên trước đây (bao gồm cả sảy thai, thai lưu, thai ngoài tử cung), nhưng sau đó không thể có thai lại dù sống với nhau trên một năm và không sử dụng biện pháp tránh thai nào.
- Tiền sử sản khoa:
 - + Thai lưu: Thai chết mà còn lưu lại trong buồng tử cung ở bất kỳ tuổi thai nào.
 - + Tiền sử sảy thai: tiền sử sảy thai là khi thai nhi được tống ra khỏi tử cung khi chưa có khả năng sống độc lập, trong nghiên cứu này chúng tôi lấy mốc thai nhi trước tuần 20 của thai kỳ.
 - + Thất bại IUI: Cặp vợ chồng từng thực hiện IUI nhưng không có thai lâm sàng, không có xuất hiện túi ối trong buồng tử cung.
 - + Thất bại làm tổ IVF: Không có thai lâm sàng sau chuyển phôi
- Nồng độ FSH cơ bản (baseline plasma FSH – b FSH) là nồng độ FSH trong máu tại thời điểm ngày 2-3 của chu kỳ kinh.
- Nồng độ E2: định lượng vào ngày bổ sung progesteron trong chu kỳ chuẩn bị niêm mạc tử cung bằng E2 và P4.
- Độ dày niêm mạc tử cung: Khoảng cách xa nhất giữa vùng cản âm giữa cơ tử cung và niêm mạc tử cung đo trên mặt phẳng vuông góc với trục dọc giữa trung tâm của tử cung trên siêu âm. Được xác định trong ngày bổ sung P4. Tính bằng đơn vị mm.

2.2.5.2. Đặc điểm của phôi và rối loạn NST của phôi.

- Tỷ lệ phôi bị rối loạn NST: số phôi có rối loạn NST (bao gồm dị bội, đa bội, rối loạn cấu trúc NST) trên tổng số phôi được kiểm tra bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới.

- Với phôi bị rối loạn NST, tiến hành khảo sát:

+ Số lượng NST bị rối loạn: 1 NST hay nhiều hơn: được phân thành bất thường xảy ra trên 1 NST, xảy ra trên 2 NST và ≥ 3 NST.

+ Rối loạn nhiễm sắc thể: Bao gồm cả rối loạn cấu trúc và rối loạn số lượng nhiễm sắc thể

+ Rối loạn số lượng hay rối loạn cấu trúc NST, với mỗi rối loạn NST, tiến hành xác định rối loạn xảy ra trên NST nào và là loại rối loạn nào? Từ đó đưa ra nhận định.

+ Lệch bội nhiễm sắc thể: Thêm hoặc mất từ một nhiễm sắc thể trở lên trong phôi.

+ Đa bội: nhiễm sắc thể là bội số của n lớn hơn $2n$ của bộ nhiễm sắc thể đơn bội.

- Rối loạn về số lượng NST:

+ Thẻ không nhiễm là rối loạn mất cả 2 NST của một cặp NST.

+ Thẻ đơn nhiễm là rối loạn mất 1 NST của một cặp NST.

+ Thêm tam nhiễm là thêm một NST của một cặp NST.

- Rối loạn cấu trúc NST:

+ Mất đoạn: là mất đi một đoạn NST của một NST.

+ Thêm đoạn: thêm một đoạn NST vào một NST.

2.2.5.3. Đặc điểm phát triển của phôi được chuyển của cả 2 nhóm

- Tổng số phôi là tổng số phôi được chuyển vào buồng tử cung của người vợ sau khi được sàng lọc bằng NGS hoặc sàng lọc hình thái

- Thai sinh hóa: Được chẩn đoán khi xét nghiệm $\beta\text{HCG} > 25 \text{ UI/ml}$ rồi giảm βHCG nhưng không phát triển thành thai lâm sàng.
- Thai lâm sàng: được chẩn đoán khi siêu âm đầu dò đường âm đạo có túi ối trong buồng tử cung.
- Sảy thai: có túi ối hoặc các thành phần của thai rồi sảy thai (trước 20 tuần)
- Sảy thai tái diễn: sảy thai liên tiếp từ 3 lần trở lên.
- Thai tiến triển: thai phát triển sau tuần 12.
- Đa thai là hiện tượng có sự phát triển của nhiều thai trong buồng tử cung, tính cả song thai cùng trứng và khác trứng.
- Chửa ngoài tử cung: trường hợp phôi làm tổ và phát triển ngoài buồng tử cung

$$\text{- Tỷ lệ có thai sinh hóa} = \frac{\text{Số chu kỳ có thai sinh hóa}}{\text{Tổng số chu kỳ chuyển phôi}} \times 100$$

$$\text{- Tỷ lệ làm tổ:} = \frac{\text{Tổng số túi thai siêu âm được}}{\text{Tổng số phôi chuyển vào tử cung}} \times 100$$

$$\text{- Tỷ lệ có thai lâm sàng:} = \frac{\text{Tổng số chu kỳ siêu âm thấy túi ối sau chuyển phôi}}{\text{Tổng số chu kỳ chuyển phôi}} \times 100$$

$$\text{- Tỷ lệ thai tiến triển:} = \frac{\text{Số chu kỳ có thai tiến triển}}{\text{Tổng số chu kỳ chuyển phôi}} \times 100$$

$$\text{- Tỷ lệ sinh con sống:} = \frac{\text{Số chu kỳ có sơ sinh sống sau đẻ}}{\text{Tổng số chu kỳ chuyển phôi}} \times 100$$

2.2.5. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm: Bệnh viện Tâm Anh, Viện Mô phôi lâm sàng Quân đội – Học viện Quân Y

- Thời gian nghiên cứu: từ tháng 10 năm 2017 đến tháng 8 năm 2018.

2.2.6. Xử lý số liệu

Dữ liệu giải trình tự được phân tích bằng phần mềm Miseq Reporter 2.6 và BlueFuse Multi 4.0 của hãng Illumina Mỹ.

- Số liệu khảo sát được phân tích bằng phần mềm STATA 12.0.

Số liệu được nhập vào hệ thống cơ sở dữ liệu bằng cách mã hóa cho từng bệnh nhân, từng phôi và lưu trong file dưới dạng file excel. Đề tài sử dụng các thuật toán về phân tích thống kê mô tả, thống kê suy luận và phân tích tương quan (các thuật toán có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$). Trong đó, phân tích thống kê mô tả đối với biến định tính được thực hiện thông qua dưới dạng tần số và tỷ lệ phần trăm, dạng độ tập trung (trung bình, trung vị) và độ phân tán (biên độ, độ lệch chuẩn, phương sai) với các biến định lượng⁷³. Sử dụng các kiểm định phù hợp với từng loại số liệu và đặc điểm phân bố của dữ liệu.

Xác định tương quan, liên quan giữa các biến định lượng qua hệ số tương quan và hồi quy tuyến tính. Sử dụng hệ số tương quan Pearson r để đánh giá mối tương quan giữa các biến định lượng có phân phối chuẩn.

Hệ số tương quan r có giá trị $(-1) \rightarrow (+1)$, $r > 0$ tương quan là đồng biến, $r < 0$ tương quan là nghịch biến.

$r < 0,3$: tương quan yếu

$0,3 \leq r < 0,5$: tương quan trung bình

$0,5 \leq r < 0,7$: tương quan chặt

$r \geq 0,7$: tương quan rất chặt.

Đối với phân tích hồi quy tuyến tính: xây dựng phương trình toán học thể hiện mối quan hệ giữa 1 biến số định lượng với một hay nhiều biến khác (biến độc lập): $Y = a + bx_1 + cx_2 + dx_3 + \dots$

Y: biến số phụ thuộc (là biến định lượng, phân bố chuẩn)

X: biến độc lập (có thể là biến định lượng hoặc định tính)

a: hằng số

b, c, d: hệ số

2.2.7. Đạo đức nghiên cứu

- Nghiên cứu đã được chấp thuận bởi Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Học Viện Quân Y số 3985/QĐ-HVQY ngày 06/4/2017.

- Nghiên cứu này sử dụng một phần số liệu trong đề tài nghiên cứu cấp Nhà nước: “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trong sàng lọc rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi”.

- Nghiên cứu được sự chấp thuận của các cơ sở thực hiện IVF

- Trước khi tiến hành nghiên cứu, các đối tượng nghiên cứu được tư vấn về mục đích nghiên cứu, quyền lợi và trách nhiệm khi tham gia nghiên cứu.

- Các thông tin riêng liên quan tới đối tượng nghiên cứu được giữ kín.

- Các đối tượng nghiên cứu có nhu cầu điều trị, chẩn đoán hoàn toàn tự nguyện, không lựa chọn giới tính khi sinh.

- Đối tượng được đọc kỹ và ký các văn bản cung cấp thông tin về nghiên cứu cho đối tượng nghiên cứu trước khi tham gia, thảo luận thuận tham gia nghiên cứu, phiếu đồng ý tham gia.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu bao gồm hai mục tiêu nghiên cứu với hai nhóm đối tượng nghiên cứu:

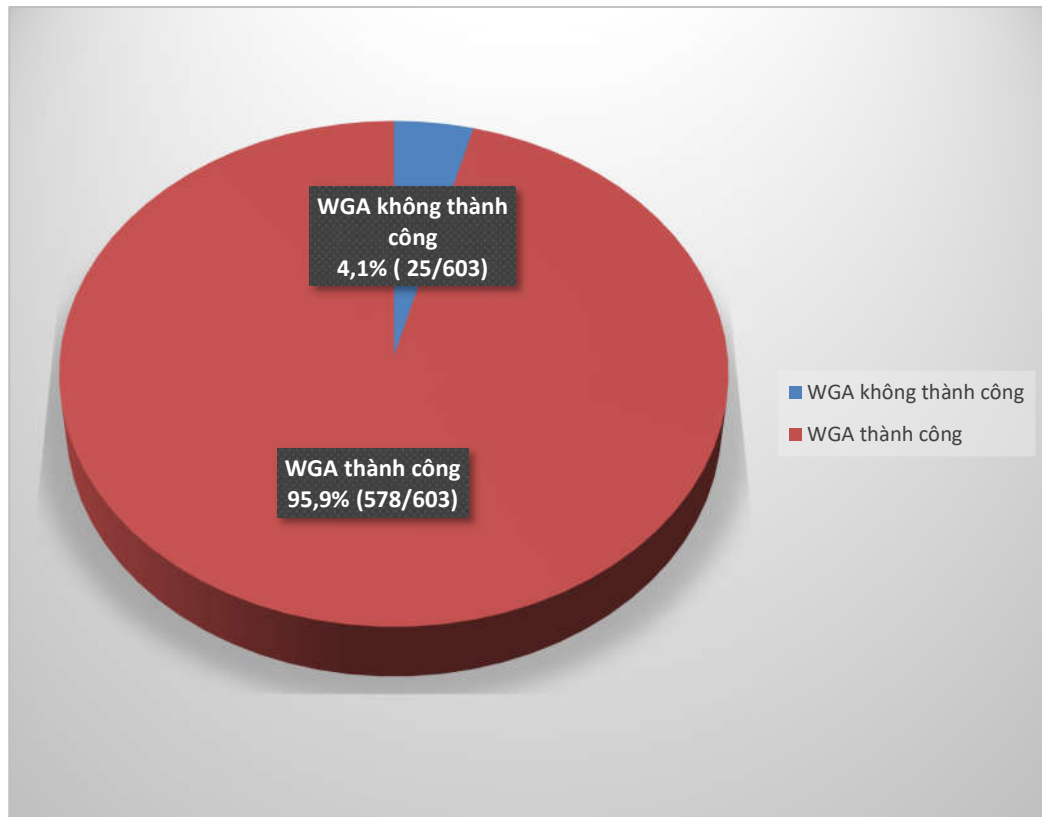
+ Mục tiêu 1: Tiến hành phân tích kết quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới ở các phôi thụ tinh trong ống nghiệm trên 603 phôi của các cặp vợ chồng thực hiện kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm có phôi nang tạo ra bằng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) tại Viện mô phôi quân đội – Học viện Quân Y.

+ Mục tiêu 2: Đánh giá hiệu quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi đối với kết quả có thai trong thụ tinh trong ống nghiệm và một số yếu tố liên quan đến tình trạng rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi trên 60 cặp vợ chồng được làm PGT-A và 60 cặp vợ chồng không làm PGT-A tại Bệnh viện Tâm Anh.

3.1. Đánh giá kết quả PGT-A trước chuyển phôi của các phôi thụ tinh trong ống nghiệm.

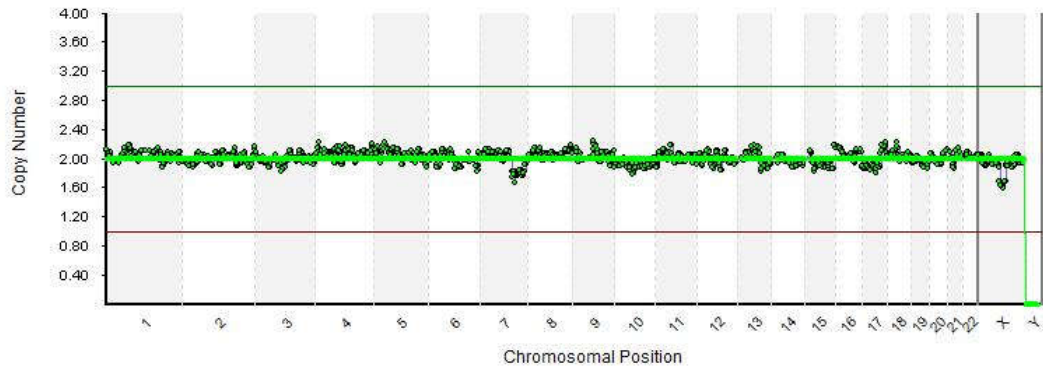
3.1.1. Kết quả khuếch đại được DNA từ mẫu phôi bào

Kết quả áp dụng trên 603 mẫu phôi nghiên cứu có 578 mẫu phôi (chiếm 95,9%) đã khuếch đại thành công hệ gen và được phân tích sự rối loạn ở cả 24 NST sử dụng phương pháp NGS-PGT-A. Chỉ có 4,1% tương ứng với 25 mẫu phôi không thành công trong bước khuếch đại toàn bộ hệ gen. 25 mẫu này không được tiếp tục phân tích trong các bước sau đó.



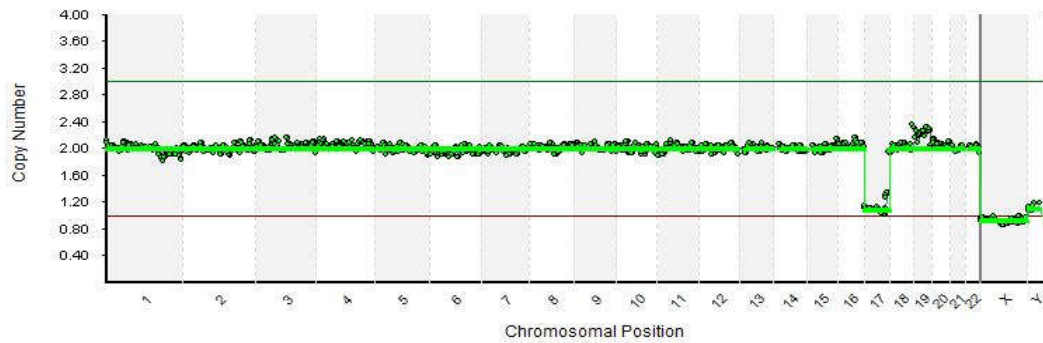
Biểu đồ 3.1. Kết quả khuếch đại toàn bộ hệ gen của 603 mẫu nghiên cứu

Tất cả 578 sản phẩm WGA đủ điều kiện thực hiện trong các bước tiếp theo (bước chuẩn bị thư viện và giải trình tự). Các dữ liệu giải trình tự đáng tin cậy ($> Q30$) mới được sử dụng cho các bước phân tích tiếp theo. Kết quả cho thấy kỹ thuật NGS cho phép phát hiện bất thường về số lượng của tất cả 24 NST của phôi người với độ tin cậy khá cao (confidence $> 75\%$). Đặc biệt, kỹ thuật này có thể phát hiện các bất thường liên quan tới cấu trúc NST với kích thước lớn (≥ 20 Mb).



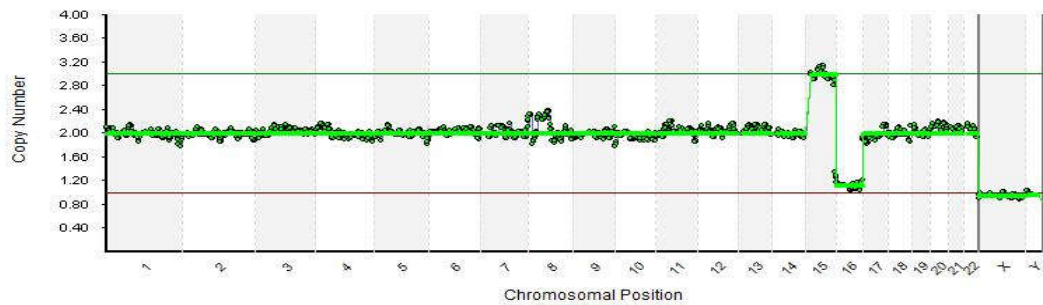
Hình 3.1. Phôi IVF 5 ngày tuổi không phát hiện rối loạn NST

(Nguồn: Kết quả phôi AM3 của bệnh nhân V. T. M.A: 46,XX)



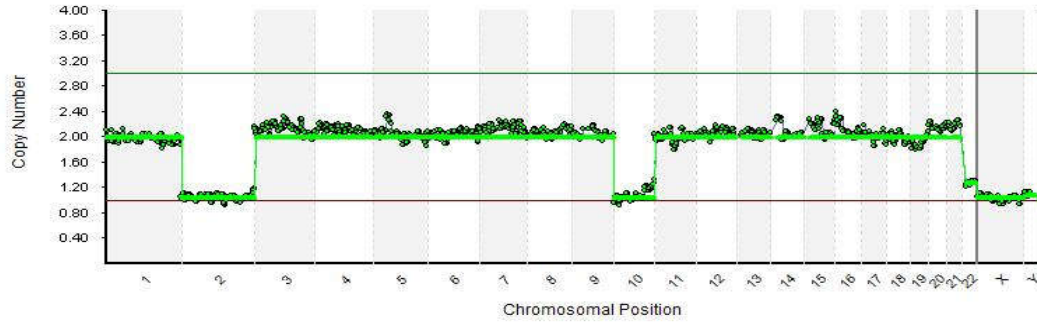
Hình 3.2. Phôi IVF 5 ngày tuổi phát hiện lệch bội ở 1 NST

(Nguồn: Kết quả phôi T3 của bệnh nhân D. T. T.: 45, XY, -17)



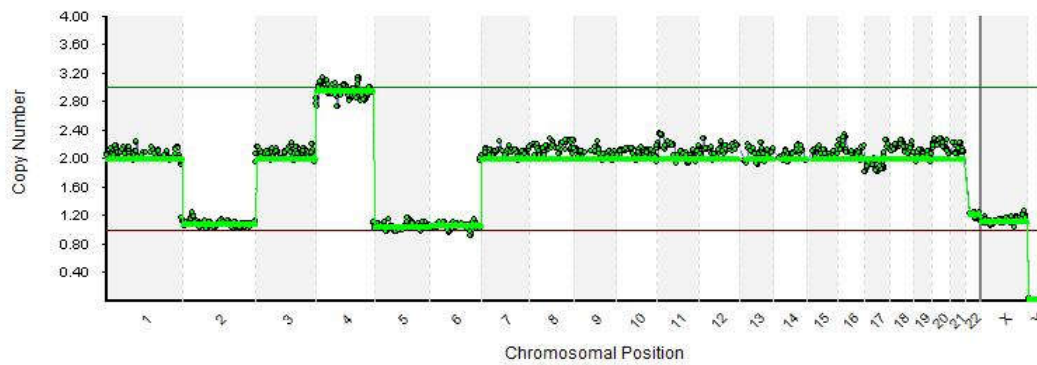
Hình 3.3. Phôi IVF 5 ngày tuổi phát hiện lệch bội ở 2 NST

(Nguồn: Kết quả phôi H2 của bệnh nhân N. T. H.: 46, XY, -16, +15)



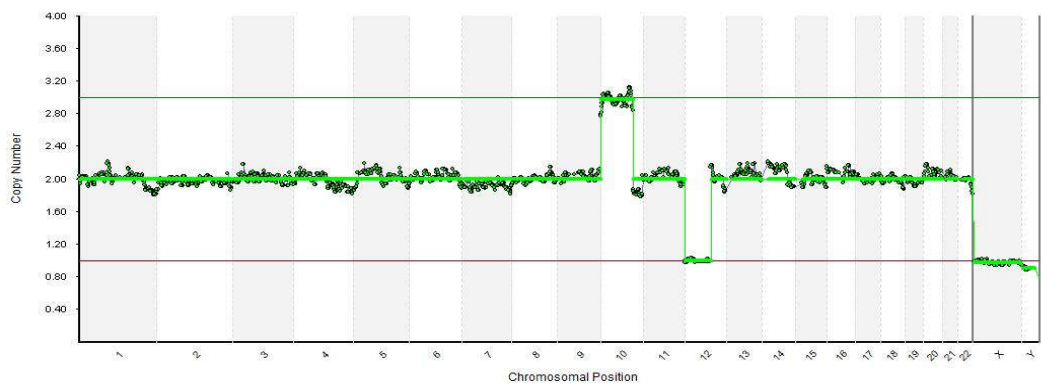
Hình 3.4. Phôi IVF 5 ngày tuổi phát hiện lệch bội ở 3 NST

(Nguồn: Kết quả phôi HI2 của bệnh nhân T. T. H.: 43, XY, -2, -10, -22)



Hình 3.5. Phôi IVF 5 ngày tuổi phát hiện lệch bội ở nhiều NST

(Nguồn: Kết quả phôi HU3 của bệnh nhân N. T. H.: 42, XY, -2, -5, -6, -22, +4)



Hình 3.6. Phôi IVF 5 ngày tuổi phát hiện bất thường cấu trúc NST

(Nguồn: Kết quả phôi HU3 của bệnh nhân D. T. B. T.: 46, XY, +10pq 103.48 Mb, -12pq 83.59 Mb)

3.1.2. Tỷ lệ rối loạn NST ở phôi ngày 5

Bảng 3.1. Tỷ lệ rối loạn NST của 578 mẫu nghiên cứu

Thông số NST	Số phôi (n)	Tỷ lệ (%)	Sai số chuẩn	95% khoảng tin cậy
Rối loạn NST	247	42,7	2,1	39,7 – 47,8
Không rối loạn NST	331	57,3	2,1	53,2 – 61,3
Tổng số	578	100		

Nhận xét: Trong tổng số 578 mẫu được phân tích, phát hiện có 331 mẫu phôi không phát hiện rối loạn NST (chiếm 57,3%) và 247 mẫu phôi phát hiện rối loạn NST (chiếm 42,7% tổng số phôi).

3.1.3. Đặc điểm rối loạn NST ở phôi ngày 5

Bảng 3.2. Đặc điểm rối loạn NST của phôi 5 ngày tuổi IVF

Rối loạn NST	Số phôi	Tỷ lệ
Chỉ rối loạn số lượng NST	173	70,04%
Chỉ rối loạn cấu trúc NST	28	11,34%
Phôi thể khảm	36	14,57%
Rối loạn cả số lượng và cấu trúc NST	8	3,24%
Dạng thể khảm có kèm rối loạn số lượng NST	2	0,81%
	247	100,0%

Nhận xét: Trong 247 mẫu phôi mang rối loạn NST có 173 mẫu có bất thường về số lượng, 28 mẫu có bất thường về cấu trúc NST, 36 mẫu dạng thể khảm NST, 8 mẫu vừa có bất thường về cấu trúc vừa có bất thường về số lượng NST và 2 mẫu phôi dạng thể khảm mang bất thường số lượng NST.

Dạng bất thường số lượng NST là dạng phổ biến nhất ở các mẫu phôi IVF 5 ngày tuổi (chiếm 70%). Các trường hợp về bất thường cấu trúc hoặc thể khảm thì ít gặp hơn. Các dạng như bất thường kết hợp như bất thường số lượng và cấu trúc cùng trong 1 phôi hoặc dạng thể khảm có kèm theo bất thường số lượng thì hiếm khi gặp, chỉ chiếm lần lượt là 3,2 % và 0,8% trong tổng số 578 trường hợp được đánh giá.

Bảng 3.3. Tỷ lệ rối loạn số lượng NST của phôi 5 ngày tuổi IVF

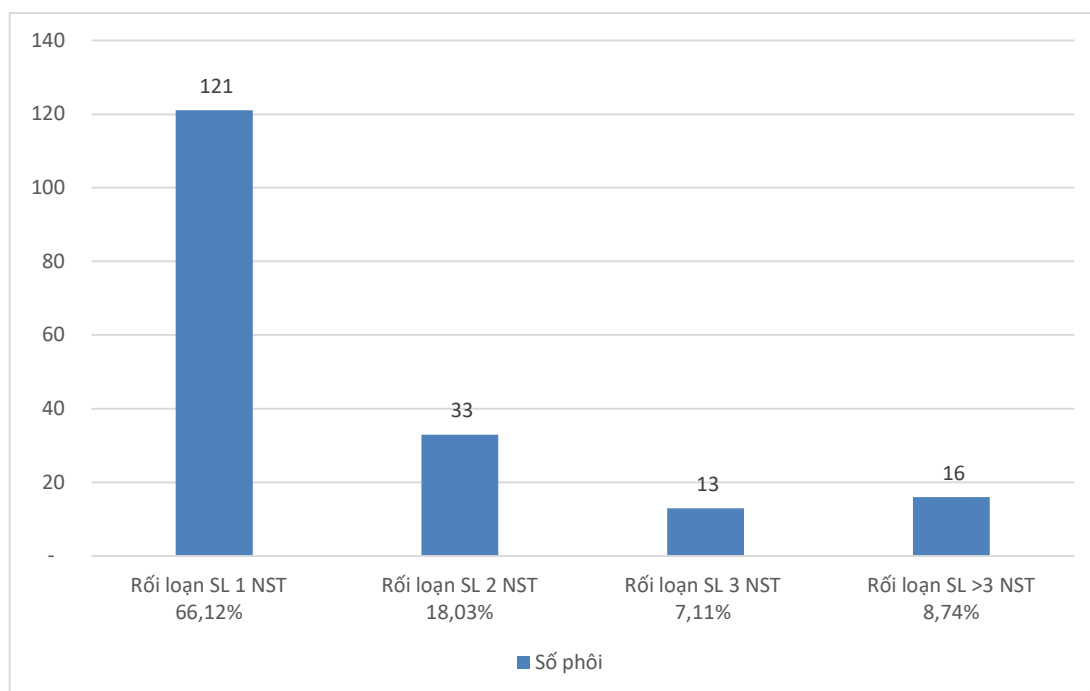
NST	Tổng số phôi	BT SLNST		Không BT SLNST	
		Số phôi BT	%	Số phôi không BT	%
1	578	9	1,56%	569	98,44%
2	578	11	1,90%	567	98,10%
3	578	12	2,08%	566	97,92%
4	578	15	2,60%	563	97,40%
5	578	13	2,25%	565	97,75%
6	578	9	1,56%	569	98,44%
7	578	7	1,21%	571	98,79%
8	578	17	2,94%	561	97,06%
9	578	6	1,04%	572	98,96%
10	578	17	2,94%	561	97,06%
11	578	5	0,87%	573	99,13%
12	578	12	2,08%	566	97,92%
13	578	15	2,60%	563	97,40%
14	578	10	1,73%	568	98,27%
15	578	19	3,29%	559	96,71%
16	578	32	5,54%	546	94,46%
17	578	10	1,73%	568	98,27%
18	578	11	1,90%	567	98,10%
19	578	7	1,21%	571	98,79%
20	578	8	1,38%	570	98,62%
21	578	24	4,15%	554	95,85%
22	578	35	6,06%	543	93,94%
23	578	18	3,11%	560	96,89%

Ghi chú: BT: bất thường

Nhận xét: Lệch bội NST ở các phôi thụ tinh trong ống nghiệm 5 ngày tuổi xảy ra ở tất cả các NST với tỷ lệ khác nhau được trình bày trên Bảng 3.3.

Tỷ lệ NST hay bị lệch bội NST nhất là các NST số 15, 16, 21, 22 và NST giới tính với tần suất xuất hiện $\geq 3,0\%$. Trong đó NST số 22 là NST có tỷ lệ bất thường số lượng NST cao nhất (6,06%), sau đó tới NST số 16 (5,54%). Tỷ lệ lệch bội NST ít gặp là nhóm các NST số 7, 9, 11 và 19 với tần suất xuất hiện $\leq 1,2\%$. Khi đánh giá tỷ lệ bất thường số lượng ở NST số 11 thấy 99,13% trường hợp không phát hiện rối loạn NST. Đây cũng là NST duy nhất có tỷ lệ bất thường số lượng NST nhỏ hơn 1%.

Xét 18 trường hợp bất thường số lượng ở NST giới tính, có tới 17 trường hợp là bất thường số lượng NST X và chỉ phát hiện 1 trường hợp rối loạn NST Y. Các dạng rối loạn NST X hay gặp nhất là dạng mất 1 NST giới tính X, trong đó tất cả là OX (13 trường hợp), dạng bất thường này là biểu hiện di truyền của hội chứng Turner. Phôi mang bất thường này rất cao đối với các phôi IVF 5 ngày tuổi, chiếm khoảng 2,2% (13/578). Dạng bất thường phổ biến thứ hai được phát hiện là dạng 3 NST X với tỷ lệ khoảng 0,69% (4/578). Trong tổng số 578 mẫu được phân tích, chỉ phát hiện duy nhất 1 trường hợp bất thường dạng 2 NST X và 2 NST Y chiếm 0,158%. Và không phát hiện trường hợp nào OY. Chủ yếu sự rối loạn số lượng NST được phát hiện là dưới các dạng đơn nhiễm và dạng tam NST. Chỉ có 1 trường hợp phát hiện có rối loạn NST dạng 4 NST và 1 trường hợp có 5 NST. Các bất thường này có thể xảy ra đơn lẻ hoặc tồn tại kết hợp với nhau trong phôi.



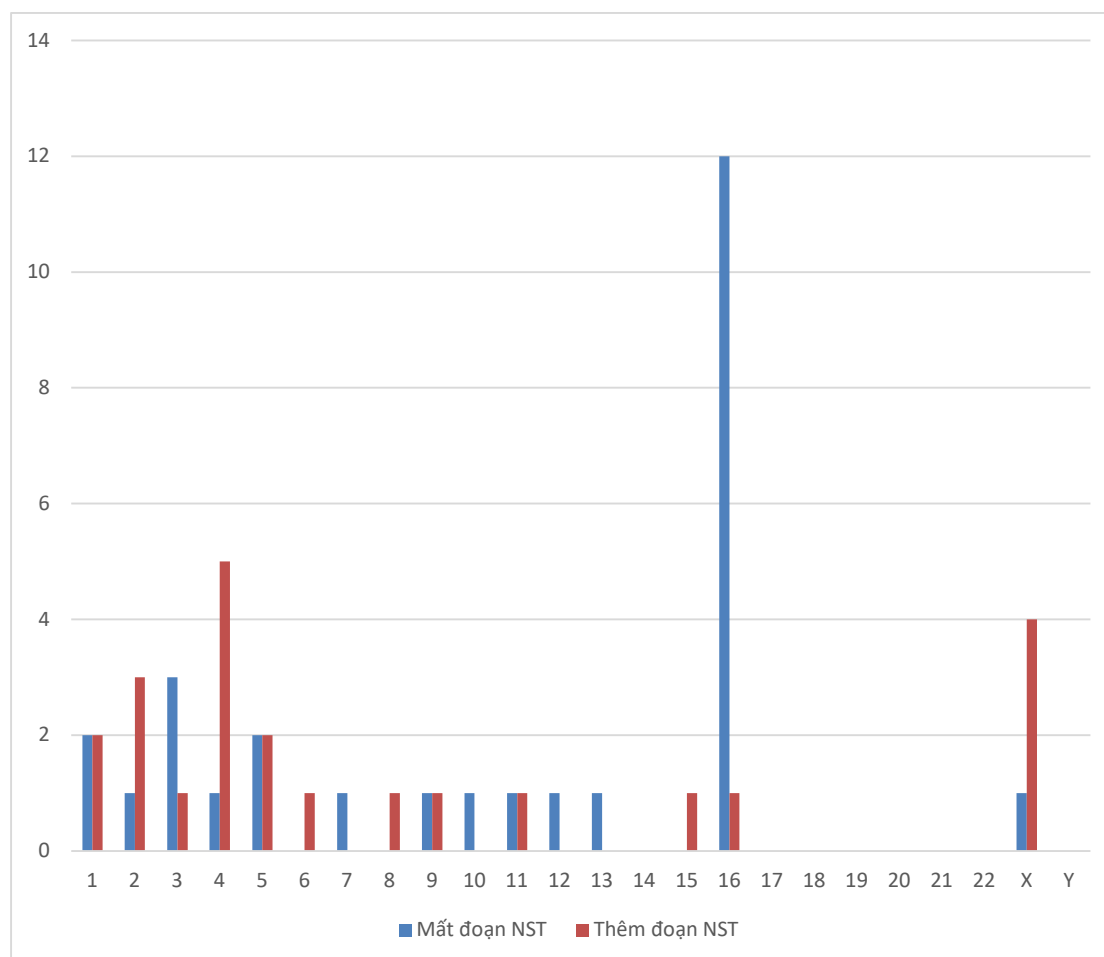
Biểu đồ 3.2. Mức độ lệch bội NST của phôi IVF 5 ngày tuổi

Nhận xét: Trong các phôi mang lệch bội NST có 66,12% phôi ngày 5 được kiểm tra sử dụng kỹ thuật PGT-A-NGS có rối loạn số lượng 1 NST (121/183), 18,03% phôi có rối loạn số lượng ở 2 NST (33/183), 7,1% và 8,74% lần lượt là tỷ lệ rối loạn số lượng NST ở đồng thời 3 và nhiều hơn 3 NST (Biểu đồ 3.3).

Bảng 3.4. Đặc điểm rối loạn cấu trúc NST ở phôi IVF 5 ngày tuổi

Số phôi có rối loạn cấu trúc NST	Số mẫu phôi	Tỷ lệ %
Rối loạn 1 NST	33	91,67%
Rối loạn 2 NST	2	5,56%
Rối loạn 3 NST	1	2,77%
Tổng số	36	100%

Nhận xét: Trong các bất thường cấu trúc phát hiện, có 91,67% là đơn bất thường, tức chỉ xuất hiện một loại hoặc thêm hoặc mất trên chỉ 1 NST. Do vậy, những bất thường này hiếm gặp do phôi nghiên cứu là mẫu phôi 5 ngày tuổi, nên chỉ chiếm dưới 6% các phôi có hơn 1 bất thường trên ≥ 2 NST khác nhau.



Biểu đồ 3.3. Tần suất rối loạn cấu trúc NST của 578 mẫu phôi IVF

Nhận xét: Nhìn chung, bất thường cấu trúc NST xảy ra tại các NST không có quy luật rõ ràng ở phôi IVF 5 ngày tuổi. Tuy nhiên, đối với đột biến mất đoạn NST, xảy ra nhiều nhất là ở NST số 16 (12 trường hợp) sau đó tới các NST số 3, 5 và NST số 1. Đột biến thêm đoạn thường hay gặp ở NST số 1, 2, 4, 5 và NST X. Xét tổng thể, NST 4, 16 là các NST có tỷ lệ gặp bất thường cấu trúc NST dạng thêm và mất đoạn nhiều nhất. Trong hai NST giới tính, thì NST X phát hiện nhiều bất thường về cấu trúc hơn NST Y. Nhóm các NST không phát hiện bất thường cấu trúc nào trong tổng số 578 mẫu nghiên cứu là NST 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22.

3.1.4. Mối liên quan giữa tuổi mẹ và rối loạn nhiễm sắc thể ở phôi thụ tinh ống nghiệm

Bảng 3.5. Tuổi người mẹ và rối loạn NST

Tuổi Số phôi	Dưới 35 n (%)	35-39 n (%)	Trên 40 n (%)	Tổng số n (%)
Phôi lưỡng bội	195 (63,72)	113 (50,90)	23 (46,00)	331 (57,27)
Phôi RLNST	111 (36,28)	109 (49,10)	27 (54,00)	247 (42,73)
Tổng	306 (100)	222 (100)	50 (100)	578 (100)
$X^2=11,7; p=0,003$				

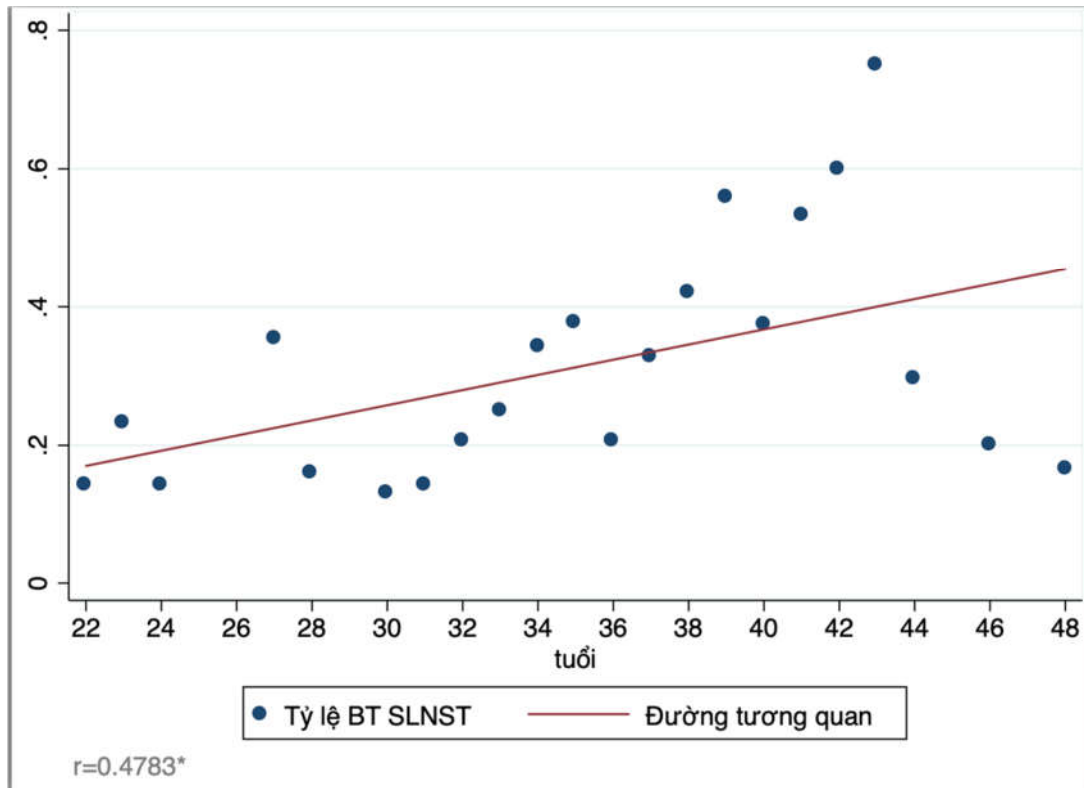
Nhận xét: Kết quả trên Bảng 3.5 trong nghiên cứu này cho thấy, tỷ lệ phôi lưỡng bội ở nhóm phụ nữ dưới 35 tuổi là 63,72%, nhóm 35 đến 39 tuổi là 50,09%, ở nhóm trên 40 tuổi chỉ có 46%, nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Tỷ lệ phôi rối loạn NST ở nhóm tuổi dưới 35 là 36,28%, ở nhóm 35-39 là 49,1% và nhóm trên 40 tuổi là 54,0%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$. Như vậy, có sự liên quan của tuổi người mẹ với rối loạn NST.

Bảng 3.6. Tuổi người mẹ và loại rối loạn NST

Tuổi \ BT NST	Đơn vị	Số lượng	Cấu trúc	Số lượng và cấu trúc	Số lượng và thể khảm	Thể khảm	No WGA	Tổng
Dưới 35	n	73	16	2	0	20	17	128
	%	(57,03)	(12,50)	(1,56)	(0)	(15,63)	(13,28)	(100)
35-39	n	82	10	3	2	12	6	115
	%	(71,30)	(8,7)	(2,61)	(1,74)	(10,43)	(5,22)	(100)
Trên 40	n	18	2	3	0	4	2	29
	%	(62,07)	(6,9)	(10,34)	(0)	(13,79)	(6,9)	(100)
Tổng số	n	173	28	8	2	36	25	272
	%	(63,60)	(10,29)	(2,94)	(0,74)	(13,24)	(9,19)	(100)

Nhận xét: Kết quả trên Bảng 3.6 nghiên cứu này cho thấy có sự khác biệt ở 3 nhóm tuổi của người phụ nữ với các loại rối loạn NST (số lượng, cấu trúc, số lượng và cấu trúc, số lượng và thể khảm, thể khảm, No WGA).

Bên cạnh đó đi sâu vào việc đánh giá mức độ tương quan giữa yếu tố tuổi người mẹ và tỷ lệ bất thường số lượng NST chúng tôi tiến hành thống kê và xây dựng hệ số tương quan r.

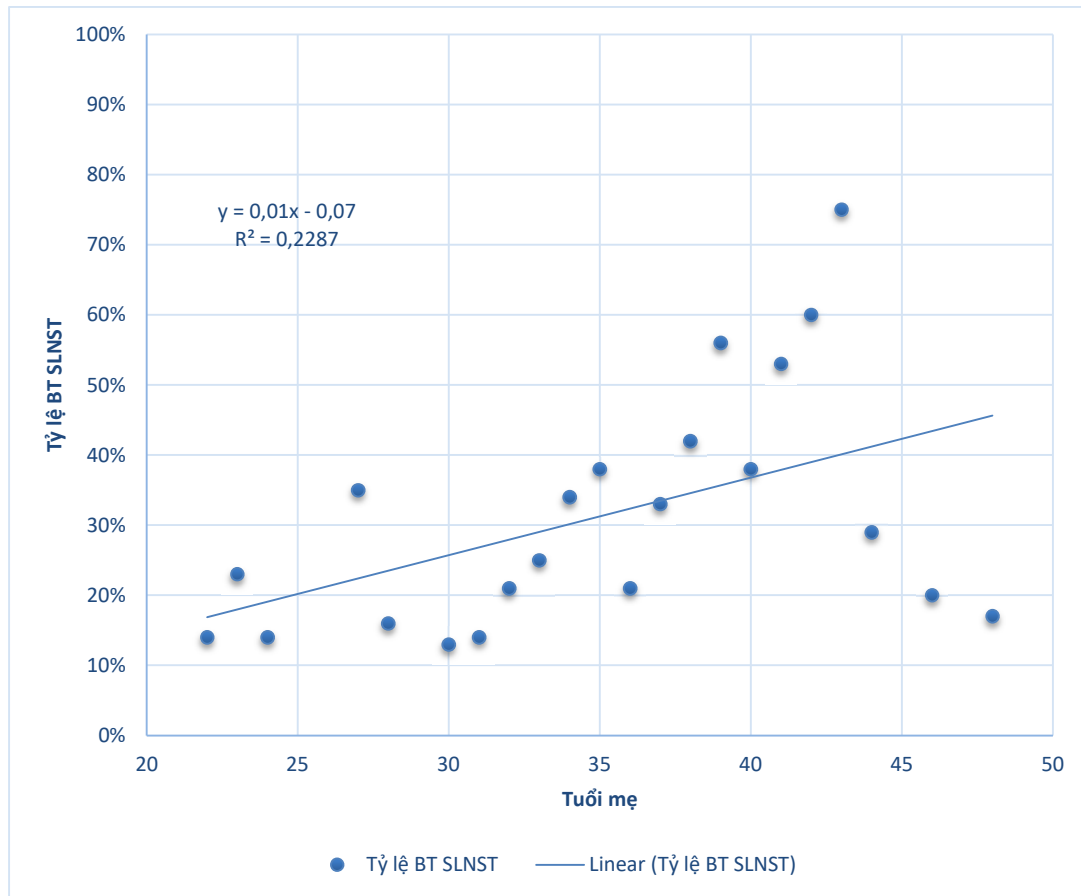


Biểu đồ 3.4. Mối tương quan giữa tuổi mẹ và tỷ lệ rối loạn số lượng NST

r: hệ số tương quan; dấu * tức là hệ số khác 0 và có ý nghĩa thống kê.

Nhận xét: Biểu đồ 3.4 đánh giá mối tương quan giữa tuổi mẹ và tỷ lệ rối loạn số lượng nhiễm sắc thể, hệ số tương quan thu được $r = 0,4783$ cho thấy mặc dù giữa yếu tố tuổi mẹ và tỷ lệ bất thường số lượng NST có mối liên hệ với nhau, tuy nhiên sự tương quan ở mức trung bình giữa hai yếu tố này, với độ chính xác 95% và có ý nghĩa.

$$\text{Tỷ lệ rối loạn số lượng NST} = -0,7 + 0,01 \times (\text{tuổi mẹ})$$



Biểu đồ 3.5. Đường hồi quy tuyến tính thể hiện mối tương quan giữa tuổi mẹ và tỷ lệ rối loạn số lượng NST

R^2 : hệ số xác định

Nhận xét: Biểu đồ 3.5. là đường hồi quy tuyến tính thể hiện mối tương quan giữa tuổi người mẹ và rối loạn số lượng NST. Nhận thấy, cứ 22,87% sự biến đổi của tỷ lệ rối loạn số lượng NST được giải thích bởi sự biến đổi của yếu tố tuổi mẹ (hệ số xác định R-square = 0,2287). Khi tuổi mẹ tăng thêm 1 đơn vị thì tỷ lệ rối loạn số lượng NST sẽ tăng thêm 0,01 đơn vị và sự thay đổi này có ý nghĩa với độ tin cậy 95%.

Mục tiêu 2: Đánh giá hiệu quả PGT-A đối với kết quả có thai trong thụ tinh trong ống nghiệm và một số yếu tố liên quan.

3.2. Một số yếu tố nguy cơ rối loạn NST ở phôi thụ tinh ống nghiệm

3.2.1. Một số yếu tố tiền sử thai sản và rối loạn NST

Nhằm đánh giá các yếu tố tiền sản ảnh hưởng tới rối loạn nhiễm sắc thể ở các phôi trước khi làm thụ tinh ống nghiệm, chúng tôi tiến hành phân tích mối liên quan của một số yếu tố tiền sử thai sản như tiền sử thất bại IUI, tiền sử thất bại IVF, tiền sử sẩy thai/thai lưu và loại vô sinh với rối loạn NST được trình bày từ Bảng 3.7 đến Bảng 3.10.

Bảng 3.7: Tiền sử thất bại IUI và RLNST

Tiền sử IUI thất bại	Số phôi RLNST	Số phôi bình thường	Tổng
Không	90	155	245
Có	16	27	43
Tổng	106	182	288
	RR=0,98 (CI: 0,65-1.50); p=0,95		

Nhận xét: Tổng số 288 phôi của 60 cặp vợ chồng làm PGT-A được kết hợp phân tích yếu tố nguy cơ rối loạn nhiễm sắc thể và tỷ lệ rối loạn nhiễm sắc thể. Kết quả trên Bảng 3.7 của nghiên cứu này cho thấy người phụ nữ không có tiền sử thất bại IUI thì có 90 phôi rối loạn NST và 155 số phôi bình thường; những người phụ nữ có tiền sử IUI thất bại thì chỉ có 16 phôi rối loạn NST và 27 phôi bình thường. Tuy nhiên, tiền sử thất bại IUI không làm tăng nguy cơ rối loạn NST ở phôi với RR=0,98, CI (0,65-1.50) với p=0,95.

Bảng 3.8. Tiền sử thất bại làm tổ và RLNST

Tiền sử thất bại làm tổ	Số phôi RLNST	Số phôi bình thường	Tổng
Không	85	159	244
Có	21	23	44
Tổng	106	182	288
	RR=0,73 (CI: 0,51-1.04); p=0,10		

Nhận xét: Kết quả trên Bảng 3.8 ở nghiên cứu này cho thấy người phụ nữ không có tiền sử thất bại IVF có 85 phôi rối loạn NST và 159 phôi bình thường; phụ nữ có tiền sử thất bại IVF chỉ có 21 phôi rối loạn NST và 23 phôi bình thường. Nhưng trong nghiên cứu này, tiền sử thất bại IVF không làm tăng nguy cơ rối loạn NST ở phôi với RR=0,73, CI (0,51-1.04) với $p>0,05$.

Bảng 3.9. Tiền sử sảy thai/thai lưu và RLNST

Tiền sử sảy thai/thai lưu	Số phôi RLNST	Số phôi bình thường	Tổng
Không	58	81	139
Có	48	101	149
Tổng	106	182	288
RR=1,29 (CI: 0,95-1,76); p=0,09			

Nhận xét: Kết quả trên Bảng 3.9 cho thấy người phụ nữ có tiền sử sảy thai và/hoặc thai lưu có 48 phôi rối loạn NST, 101 phôi bình thường. Trong khi đó, những phụ nữ không có tiền sử sảy thai và/hoặc thai lưu có 58 phôi rối loạn NST và 81 phôi bình thường. Tuy nhiên, tiền sử sảy thai/thai lưu trong nghiên cứu này không làm tăng nguy cơ rối loạn NST ở phôi với RR=1,29, CI (0,95-1,76) với $p > 0,05$.

Bảng 3.10. Loại vô sinh và RLNST

Loại vô sinh	Số phôi RLNST	Số phôi bình thường	Tổng
Vô sinh I	14	12	26
Vô sinh II	92	170	262
Tổng	106	182	288
RR=1,51 (CI: 1,02-2,23); p=0,07			

Nhận xét: Kết quả trên Bảng 3.10 cho thấy, vô sinh loại I có 14 phôi rối loạn NST và 12 phôi bình thường; vô sinh loại II có 92 phôi rối loạn NST và 166 phôi bình thường. Tuy nhiên, loại vô sinh không làm tăng nguy cơ rối loạn NST ở phôi với RR=1,51, CI (1,02-2,23) với $p = 0,07$

3.3. Đánh giá kết quả áp dụng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (NGS) trong sàng lọc NST trước chuyển phôi

3.3.1. Một số đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu

Bảng 3.11. Một số đặc điểm về tuổi

Nhóm tuổi	Nhóm làm PGT-A		Nhóm không làm PGT-A	
	Số lượng	Tỷ lệ	Số lượng	Tỷ lệ
<35	9	15,0	37	61,7
≥ 35	51	85,0	23	38,3
Tổng	60	100	60	100
Tuổi trung bình	38,03 ± 4,38		33,72 ± 0,49	

Nhận xét: Tuổi trung bình của nhóm PGT-A là 38,03 ± 4,38; tuổi trung bình của nhóm không làm PGT-A là 33,72 ± 0,49; Hơn nữa, trong nhóm làm PGT-A, đa số phụ nữ thuộc nhóm trên 35 tuổi (chiếm 85,0%). Trong khi ở nhóm không làm PGT-A, đa số phụ nữ thuộc nhóm dưới 35 tuổi (chiếm 61,7%).

Bảng 3.12. Một số đặc điểm thể trạng của hai nhóm nghiên cứu

Nhóm tuổi	Nhóm PGT-A $\bar{x} \pm SD$	Nhóm không làm PGT-A $\bar{x} \pm SD$
BMI (kg/m ²)	21,87 ± 1,90	21,38 ± 2,32
Huyết áp tâm thu (mmHg)	116,33 ± 1,00	113,63 ± 1,12
Huyết áp tâm trương (mmHg)	71,73 ± 0,89	70,98 ± 1,06
Tuổi hành kinh	14,63 ± 1,55	14,17 ± 1,24

Nhận xét: BMI của nhóm làm PGT-A và nhóm không làm PGT-A lần lượt là 21,87 ± 1,90(kg/m²) và 21,38 ± 2,32(kg/m²). Giá trị huyết áp tâm thu của hai nhóm lần lượt là: 116,33 ± 1,00 mmHg và 113,63 ± 1,12 mmHg.

Bảng 3.13. Nồng độ một số hormon

Chỉ số	Nhóm PGT-A $\bar{X} \pm SD$	Nhóm không làm PGT-A $\bar{X} \pm SD$
FSH (UI/l)	6,72 ± 1,63	6,09 ± 1,59
Estradiol (pg/ml)	39,58 ± 4,65	38,27 ± 5,06
LH (mUI/ml)	5,27 ± 3,02	6,31 ± 3,94
Prolactin (ng/ml)	15,52 ± 3,92	16,08 ± 4,35
TSH (mUI/l)	1,66 ± 0,66	1,65 ± 0,74
AMH (ng/ml)	1,80 ± 0,64	2,46 ± 0,95

Nhận xét: Bảng kết quả trên cho thấy do người mẹ ở hai nhóm có độ tuổi dao động từ 24 đến 42 tuổi, nên các xét nghiệm cận lâm sàng cũng dao động rõ rệt. Xét nghiệm FSH có giá trị trung bình trong nhóm làm PGT-A và nhóm không làm PGT-A lần lượt là 6,72 ± 1,63 (UI/l) và 6,09 ± 1,59 (UI/l). Xét nghiệm AMH trung bình là 1,80 ± 0,64 ng/ml ở nhóm làm PGT-A-NGS, và 2,46 ± 0,95 ng/ml ở nhóm không làm PGT-A. Nồng độ AMH ảnh hưởng rất lớn tới khả năng dự trữ buồng trứng của người phụ nữ. Nó đặc biệt giảm ở nhóm bệnh nhân trên 35 tuổi.

Bảng 3.14. Tinh dịch đồ

Chỉ số	Nhóm làm PGT-A	Nhóm không làm PGT-A
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
Thể tích tinh dịch (ml)	2,46 ± 0,13	2,74 ± 0,19
Thời gian ly giải (phút)	29,31 ± 0,57	30,21 ± 1,39
Tỷ lệ tiến tới (%)	35,74 ± 2,23	34,66 ± 2,90
Tỷ lệ không tiến tới (%)	16,12 ± 1,16	12,88 ± 1,23
Tỷ lệ không di động (%)	46,38 ± 2,38	46,17 ± 3,15
Tỷ lệ sống (%)	64,96 ± 2,26	59,23 ± 3,11

Nhận xét: Kết quả cho thấy đa số các chỉ tiêu số lượng và chất lượng tinh trùng tương tự nhau ở hai nhau. Tỷ lệ không tiến tới của nhóm PGT-A và nhóm không làm PGT-A lần lượt là 16,12 ± 1,16(%) và 12,88 ± 1,23 (%). Trong nhóm PGT-A đều áp dụng kỹ thuật IVF-ISCI nên tỷ lệ không tiến tới sẽ không ảnh hưởng đến quá trình này.

3.3.2. Đặc điểm về các chỉ số của noãn và phôi và chuẩn bị niêm mạc tử cung ở đối tượng nghiên cứu

Kết quả kích thích buồng trứng được trình bày trong Bảng 3.16.

Bảng 3.15. Kết quả kích thích buồng trứng của 2 nhóm nghiên cứu

Số nang noãn	Nhóm làm PGT-A n (%)	Nhóm không làm PGT-A n (%)	Tổng số n (%)
<5	5 (8,3)	2 (3,3)	7 (5,8)
5 – 10	51 (85,0)	9 (15,0)	60 (50,0)
>10	4 (6,7)	49 (81,7)	53 (44,2)
Tổng số	60 (100)	60 (100)	120 (100)

Nhận xét: Đa số người vợ trong nghiên cứu ở nhóm làm PGT-A thu được 5-10 noãn (51 người, chiếm 85%). Trong khi đó, phần lớn người vợ ở nhóm không làm PGT-A thu được trên 10 noãn (81,7%).

Bảng 3.16. Kết quả nuôi cấy phôi của 2 nhóm nghiên cứu

Số phôi sống	Nhóm làm PGT-A n (%)	Nhóm không làm PGT-A n (%)	Tổng số n (%)
< 3	11 (18,33)	3 (5,0)	14 (11,67)
3 – 5	37 (61,67)	8 (13,33)	45 (37,50)
> 5	12 (20,0)	49 (81,67)	61 (50,83)
Tổng số	60 (100)	60 (100)	120 (100)

Nhận xét: Bảng 3.16 mô tả kết quả nuôi cấy phôi trong của nghiên cứu này cho thấy: số cặp vợ chồng nuôi cấy được trên 5 phôi blastocyst ở nhóm không làm PGT-A là 81,67%, nhóm PGT-A là 20%. Đa phần các cặp vợ chồng trong ở nhóm PGT-A thu được 3-5 phôi (chiếm 61,67%).

Bảng 3.17. Số lượng noãn và phôi thu được

Chỉ số	Nhóm làm PGT-A	Nhóm không làm PGT-A
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
Noãn thu được	7,73 ± 2,0	17,62 ± 8,4
Noãn thụ tinh	6,25 ± 1,95	11,35 ± 5,91
Noãn phát triển thành phôi	4,8 ± 1,56	10,32 ± 5,53

Nhận xét: Từ kết quả bảng trên cho thấy, số noãn thu được trung bình trong nhóm làm PGT-A là 7,73 ± 2,0 (noãn); trong nhóm không làm PGT-A là 17,62 ± 8,4 (noãn). Noãn phát triển thành phôi là 4,8 ± 1,56 (noãn) trong nhóm làm PGT-A và 10,32 ± 5,53 (noãn) trong nhóm không làm PGT-A.

Bảng 3.18. Chất lượng phôi blastocyst của bệnh nhân nghiên cứu

Hình thái phôi	Nhóm NC	Nhóm làm PGT-A	Nhóm không làm PGT-A
		$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
Phôi tốt (AA, AB, BA)		1,85 ± 1,21	6,97 ± 5,41
Phôi trung bình (BB, CA)		1,37 ± 0,92	1,35 ± 1,51
Phôi xấu (AC, BC, CB, CC)		1,61 ± 0,98	2,01 ± 3,41

Nhận xét: Trong nghiên cứu này, số phôi tốt ở nhóm làm PGT-A-NGS là 1,85 ± 1,21; nhóm không làm PGT-A là 6,97 ± 5,41.

Bảng 3.19. Độ dày niêm mạc tử cung

Đặc điểm niêm mạc tử cung	Nhóm làm PGT-A		Nhóm không làm PGT-A	
	Số lượng	Tỷ lệ	Số lượng	Tỷ lệ
<8 mm	6	10,00	5	8,33
8 - <10 mm	30	50,00	31	51,67
10 - <12 mm	20	33,33	20	33,33
≥ 12 mm	4	6,67	4	6,67
Tổng	60	100	60	100
Độ dày niêm mạc tử cung trung bình	9,61 ± 1,28		9,67 ± 1,26	

Nhận xét: Đa số người vợ của cả hai nhóm có niêm mạc tử cung từ 8-12 mm, lần lượt là 83,33% và 85,00% ở nhóm làm PGT-A và nhóm không làm PGT-A.

3.3.3. Kết quả phân tích rối loạn NST của phôi blastocyst ở nhóm nghiên cứu

Bảng 3.20. Tỷ lệ rối loạn NST của phôi blastocyst

Chỉ tiêu	Số phôi	Tỷ lệ (%)	Sai số chuẩn	95% khoảng tin cậy
Rối loạn NST	106	36,8	0,021	0,397 – 0,478
Không rối loạn NST	182	63,2	0,021	0,532 – 0,613
Tổng số	288	100		

Nhận xét: Với kỹ thuật NGS áp dụng trên 288 phôi, số lượng phôi rối loạn NST là 36,8%, số phôi không rối loạn NST là 182 (63,2%).

3.3.4. Kết quả thụ tinh trong ống nghiệm ở hai nhóm nghiên cứu

Bảng 3.21. Kết quả có thai của hai nhóm nghiên cứu

Kết quả IVF	Nhóm làm PGT-A		Nhóm không làm PGT-A	
	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Thai sinh hóa	39	65,00	36	60,00
Thai lâm sàng	26	43,33	15	25,00
Thai phát triển	11	18,33	9	15,00
Sinh con sống	11	18,33	8	13,33
Sảy thai	15	25	6	10,00
Thai lưu	0	0	1	1,67

Nhận xét: Tỷ lệ có thai sinh hóa của hai nhóm làm PGT-A và không làm PGT-A lần lượt là 65,00% và 60,00%. Tỷ lệ có thai lâm sàng ở nhóm làm PGT-A là 43,33%, trong khi tỷ lệ này với nhóm không làm PGT-A là 25,0%. Tỷ lệ có thai phát triển của nhóm làm PGT-A là 18,33%, tỷ lệ này ở nhóm không làm PGT-A là 15,00%.

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Phân tích kết quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới ở các phôi thụ tinh trong ống nghiệm

Trong thụ tinh ống nghiệm, việc tìm kiếm và chọn lựa được những phôi có cơ hội thụ thai cao là rất quan trọng. Trước kia, việc lựa chọn phôi đã được thực hiện dựa trên quan sát hình thái: kích thước phôi bào, số lượng, kích thước, hình thái nhân phôi bào, tỷ lệ nhân/bào tương. Tuy vậy, hình thái phôi bào ít có liên hệ với kết quả thụ tinh ống nghiệm. Nhiều phôi bào có điểm hình thái cao nhưng phôi không làm tổ được, trong khi những phôi có điểm hình thái thấp lại cho ra đời những em bé khỏe mạnh. Trong nhiều trường hợp sảy thai, thai lưu, chúng ta đã xác định được có tình trạng rối loạn NST ở phôi⁵. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh có hiện tượng rối loạn NST ở noãn và phôi bào^{26,74}.

Sàng lọc NST trước chuyển phôi được áp dụng từ rất sớm nhờ tiềm năng làm tăng tỷ lệ thành công của IVF. Một trong những kỹ thuật PGT-A là FISH. Kỹ thuật (FISH) là phương pháp đầu tiên được áp dụng trong sàng lọc phôi lệnh bội. FISH thường kiểm tra 5 đến 9 NST trong một phôi bào được lấy vào ngày thứ 3 sau thụ tinh nhân tạo. Thông thường, đầu dò DNA đặc hiệu đối với NST 13, 18, 21, X, Y. Một số phương pháp có thể kiểm tra đến 12 NST. Tuy nhiên, những nghiên cứu lâm sàng ngẫu nhiên quy mô lớn chỉ ra rằng FISH có sự giới hạn về số lượng NST có thể kiểm tra, nên không làm tăng đáng kể hiệu quả của IVF. Điều này có thể xảy ra do phôi có độ khảm cao hoặc việc kiểm tra một phôi bào không thể phản ánh thành về bộ NST cho toàn bộ phôi trong hầu hết các trường hợp⁵⁴. Hơn thế nữa, thể lệch bội không phải luôn luôn được phát hiện khi sử dụng FISH bởi vì chúng liên quan đến toàn bộ bộ NST chứ không phải chỉ các NST được khảo sát bằng FISH. Những nguyên

nhân trên có thể giải thích tại sao kỹ thuật FISH không cải thiện được tỷ lệ có thai lâm sàng và sinh con sống. Vì vậy, các kỹ thuật sàng lọc NST được tiếp tục phát triển và hoàn thiện nhằm sàng lọc cả 24 NST và thậm chí cả các mất, lặp đoạn.

Sàng lọc 24 NST ở phôi giúp tăng tỷ lệ thành công của IVF sau đó được khẳng định qua nhiều nghiên cứu trên các mẫu khác nhau, bằng các kỹ thuật khác nhau như qPCR, aSNP, aCGH⁶⁵.

qPCR rất hiệu quả trong việc đánh giá những bệnh đơn gen đã biết, và thường được sử dụng cho chẩn đoán di truyền trước chuyên phôi (PGD) hơn là PGT-A. Tuy nhiên, kỹ thuật này đã được điều chỉnh để cung cấp một phương pháp nhanh cho PGT-A, có thể hoàn thành trong vòng 4 giờ. Tuy nhiên, kỹ thuật này có những hạn chế về độ chính xác và không xác định được chính xác những bất thường cấu trúc NST^{75,76}.

Một số kit aCGH đã được công nhận là đáng tin cậy và được sử dụng rộng rãi trong hỗ trợ sinh sản. Array CGH đã từng được ứng dụng phổ biến với nhiều ưu điểm như là khả năng phát hiện cả những rối loạn NST bao gồm cả về số lượng và cấu trúc; thể khảm, chuyển đoạn không cân bằng. Kỹ thuật này đã được chứng minh làm tăng tỷ lệ mang thai từ 35 lên 50% ở những phụ nữ ít hơn 30 tuổi và tăng từ 31% lên 42% ở những phụ nữ trong độ tuổi 30 đến 40 và từ 14 lên 33% ở những phụ nữ lớn hơn 40 tuổi⁷⁷. Tuy nhiên, aCGH không thể phát hiện được sự tái sắp xếp cân bằng như chuyển vị tương hỗ, đảo đoạn, chuyển vị Robertson và một số tái sắp xếp không cân bằng như đột biến điểm, xóa, lặp đoạn.

SNP array cũng được sử dụng phổ biến trong PGT-A. Một nghiên cứu trên 160 phôi ở giai đoạn phân cắt đã được thực hiện để so sánh độ chính xác của kỹ

thuật SNP array với kỹ thuật FISH, trong đó 75 phôi được đánh giá bằng FISH và 85 phôi được đánh giá bằng SNP array. SNP array tạo ra nhiều hơn đáng kể các kết quả có thể giải thích được (96%) so với FISH (83%) ($P < 0.004$)⁷⁸. Độ chính xác của SNP array được đánh giá trong một công bố năm 2010 bởi Treff và cs⁷⁹. Scott và cs⁸⁰ cũng đã đánh giá và báo cáo tính chính xác của kỹ thuật này.

Gần đây, kỹ thuật NGS là kỹ thuật mới nhất được áp dụng trong PGT-A. Tiềm năng của NGS trong PGT-A đã được Yin và cs⁶³ đánh giá, qua việc phân tích 38 mẫu sinh thiết phôi nang dùng cả SNP array và NGS. Tất cả 26 phôi lưỡng bội và 6 phôi lệch bội đồng nhất đều được xác định chính xác bằng cả SNP array và NGS. Hơn nữa, NGS cũng phát hiện được tất cả 6 phôi có sự chuyển đoạn NST không cân bằng, một trong số đó không được phát hiện bởi SNP array. Một nhược điểm nữa của SNP array được sử dụng trong PGT-A là thuật toán không có khả năng xác định số bản copy khi người chồng và vợ có quan hệ huyết thống. Điều này cho thấy ưu điểm của NGS so với SNP array.

Kỹ thuật NGS được sử dụng trong nghiên cứu này là một trong những phương pháp mới, được sử dụng để phát hiện rối loạn NST đã biết từ các sản phẩm khuếch đại toàn bộ hệ gen (WGA- whole genome amplification) thu được từ sinh thiết phôi thụ tinh trong ống nghiệm 5 ngày tuổi. Tính chính xác và hiệu quả của việc sàng lọc 24 NST thông qua việc đánh giá, kiểm tra các sản phẩm WGA cũng như quản lý chất lượng tại từng mốc trong quá trình thực hiện theo qui trình của hãng Illumina (San Diego, Hoa Kỳ).

Tổng số 603 mẫu phôi nghiên cứu có 578 mẫu phôi (chiếm 95,9%) đã khuếch đại thành công hệ gen và được phân tích sự rối loạn ở cả 24 NST sử dụng phương pháp NGS. Chỉ có 4,1% tương ứng với 25 mẫu phôi không thành công trong bước khuếch đại toàn bộ hệ gen. Kết quả khuếch đại gen tương tự

nghiên cứu của Liu và cs (2016) khi khuếch đại trên 221 mẫu phôi vào cũng chỉ có 3 mẫu (tương đương 1,3% mẫu không được khuếch đại toàn bộ hệ gen⁸¹. Các mẫu không khuếch đại được hệ gen sẽ không được tiếp tục phân tích trong các bước sau đó.

Nguyên nhân của việc khuếch đại không thành công toàn bộ hệ gen có thể do quá trình vận chuyển phôi từ các Trung tâm Hỗ trợ sinh sản về phòng thí nghiệm di truyền làm bắn các mẫu lên nắp ống nghiệm mà ly tâm không thể thu được mẫu nghiên cứu. Một nguyên nhân khác có thể đến từ việc thao tác trong bước khuếch đại hệ gen làm mẫu bám vào đầu côn di chuyển ra bên ngoài ống nghiệm. Quá trình WGA không thành công cũng có thể đến ngay từ việc làm mất phôi trong bước rửa phôi tại các Trung tâm Hỗ trợ sinh sản.

Để quản lý và giảm thiểu sự xảy ra các yếu tố trên, chúng tôi đã xây dựng một qui trình quản lý mẫu bao gồm: bước kiểm tra phôi sau khi rửa chắc chắn có trong ống mẫu; thiết kế bộ chuyển mẫu giám sát; ghi chép lại chi tiết lịch sử thao tác bước WGA cho từng mẻ cũng như lịch sử biến cố trong quá trình vận chuyển phôi.

Tất cả 578 sản phẩm WGA đủ điều kiện thực hiện trong các bước tiếp theo (bước chuẩn bị thư viện và giải trình tự). Các dữ liệu giải trình tự đáng tin cậy (> Q30) mới được sử dụng cho các bước phân tích tiếp theo. Kết quả cho thấy kỹ thuật NGS cho phép phát hiện bất thường về số lượng của tất cả 24 NST của phôi người với độ tin cậy khá cao (confident > 75%). Đặc biệt, kỹ thuật này có thể phát hiện các bất thường liên quan tới cấu trúc NST với kích thước lớn (≥ 20 Mb).

Trong Bảng 3.1, phát hiện có 331 mẫu phôi không phát hiện rối loạn NST (chiếm 57,3%) và 247 mẫu phôi phát hiện rối loạn NST. Như vậy, tỷ lệ rối loạn NST trong mẫu nghiên cứu là 42,7%.

Chúng tôi nhận thấy tỷ lệ rối loạn NST chiếm 42,7% tương đồng với kết luận về tỷ lệ phần trăm rối loạn NST ở phôi nang trong nghiên cứu của Rubio năm 2003 (do kết quả binomial test cho $p > 0,05$ – Hình 3.2). Nhóm nghiên cứu của ông phát hiện trong 28 đối tượng nghiên cứu có tuổi mẹ trung bình $35,1 \pm 4,1$ có 45,1% phôi có rối loạn NST⁴².

Một số nghiên cứu khác đều cho thấy các phôi được tạo ra trong ống nghiệm có mang rối loạn NST rất cao (khoảng trên 50%)²⁵. Một nghiên cứu của Samer Alfarawati và cộng sự năm 2011, cũng chỉ ra rằng 56,7% (283 trên tổng số 500) mẫu phôi nang được thử nghiệm mang rối loạn NST⁵⁹. Tuy nhiên, đối tượng trong các nghiên cứu này đều tập trung vào các trường hợp sảy thai liên tiếp nhiều chu kì⁵⁵ hoặc có tuổi người mẹ cao ($> 37,5$)²⁵; trong khi đối tượng trong nghiên cứu này có độ tuổi thấp hơn (trung bình 34,4 tuổi). Do vậy tỷ lệ mà nghiên cứu này của chúng tôi đưa ra thấp hơn của các nghiên cứu trên nhưng vẫn tương đồng với các nhận định đó.

Đặc điểm rối loạn NST được trình bày trong Bảng 3.2. Trong 247 mẫu phôi mang rối loạn NST có 173 mẫu có bất thường về số lượng, 28 mẫu có bất thường về cấu trúc NST, 36 mẫu dạng thể khảm NST, 8 mẫu vừa có bất thường về cấu trúc vừa có bất thường về số lượng NST và 2 mẫu phôi dạng thể khảm mang bất thường số lượng NST.

Dạng bất thường số lượng NST là dạng phổ biến nhất ở các mẫu phôi IVF 5 ngày tuổi (chiếm 70%). Các trường hợp về bất thường cấu trúc hoặc thể khảm thì ít gặp hơn. Các dạng như bất thường kết hợp như bất thường số lượng và cấu trúc cùng trong 1 phôi hoặc dạng thể khảm có kèm theo bất thường số lượng thì hiếm khi gặp, chỉ chiếm lần lượt là 3,2% và 0,8% trong tổng số 578 trường hợp được đánh giá. Lệch bội NST ở các phôi thụ tinh trong ống nghiệm 5 ngày tuổi

xảy ra ở tất cả các NST với tỷ lệ khác nhau (Bảng 3.3). Do đó, có thể trong một số nghiên cứu trước đó khi chỉ phân tích đơn lẻ một vài NST, với những đặc điểm ảnh hưởng đến NST chưa được kiểm chứng, đã được phân loại sai thành loại phôi bình thường. Ngoài ra, phần lớn các dữ liệu hiện có liên quan đến ảnh hưởng của lệch bội NST đến hình thái đến từ phôi được phân tích bằng cách phân tích một vài NST đơn lẻ trên chỉ 1 tế bào cũng dẫn tới kết luận chưa đủ hoặc âm tính giả về tình trạng lệch bội NST ở phôi IVF 5 ngày tuổi.

Trong nghiên cứu này, phân tích PGT-A-NGS đã được sử dụng, cho phép tất cả các NST được đánh giá một cách toàn diện và chính xác. Hơn nữa, thử nghiệm dựa trên sự phân tích của một vài tế bào chứ không chỉ là một tế bào, về mặt lý thuyết giúp làm giảm nguy cơ phân loại sai do phôi thể khảm⁸². Cuối cùng, phân tích được tiến hành ở giai đoạn phôi ngày thứ 5, trong khi hầu như tất cả các nỗ lực trước đó liên quan đến hình thái học và sự tích tụ tập trung vào giai đoạn phát triển trước khi chuyển phôi (tính đến ngày thứ 3). Tỷ lệ NST hay bị lệch bội NST nhất là các NST số 15, 16, 21, 22 và NST giới tính với tần suất xuất hiện $\geq 3,0\%$. Trong đó NST số 22 là NST có tỷ lệ bất thường số lượng NST cao nhất (6,06%), sau đó tới NST số 16 (5,54%). Tỷ lệ lệch bội NST ít gặp là nhóm các NST số 7, 9, 11 và 19 với tần suất xuất hiện $\leq 1,2\%$. Khi đánh giá tỷ lệ bất thường số lượng ở NST số 11 thấy 99,13% trường hợp không phát hiện rối loạn NST. Đây cũng là NST duy nhất có tỷ lệ bất thường số lượng NST nhỏ hơn 1%. Có một số NST có kích thước lớn cũng phát hiện có bất thường số lượng NST dạng đơn nhiễm, tam nhiễm nhưng lại không được phát hiện ở các nghiên cứu trong giai đoạn mang thai. Điều này cho thấy những bất thường “nghiêm trọng” này gây tử vong cho phôi thai trước khi kết thúc tam cá nguyệt đầu tiên của thai kỳ, mặc dù điểm chính xác mà tại đó các phôi bị ảnh hưởng vẫn chưa được xác định.

Trong nghiên cứu của Munne năm 2011, sau khi đánh giá 23 NST của 815 phôi nang sử dụng kỹ thuật aCGH đã kết luận các NST hay xảy ra lệch bội NST là 16, 22, 21 và 15⁸³.

Một nghiên cứu khác cùng năm 2011 của Fragouli và Wells trên 1.290 phôi thụ tinh trong ống nghiệm 5 ngày tuổi bằng kỹ thuật a-CGH trên các đối tượng có độ tuổi người mẹ trung bình 38,1 (29 - 50 tuổi), kết luận rằng các NST hay xảy ra lệch bội NST nhất là các NST số 22, 16, 15, 21 và X⁷⁰.

Năm 2013, nghiên cứu của Rubio và cộng sự cũng chỉ ra rằng các NST hay xảy ra bất thường lệch bội NST ở phôi ngày 3 là 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, và NST giới tính. Trong đó, NST 16 và 22 là 2 NST ảnh hưởng nhiều nhất ở cả nhóm bệnh nhân có phôi không làm tổ liên tiếp và bệnh nhân lớn tuổi, 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 tuổi⁵⁵. Trong khi đó 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%)⁸⁴. Như vậy, 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 phức tạp thường bị ngừng phát triển trước khi phát triển thành phôi nang, đúng vào thời điểm mà Traversa chọn phôi nghiên cứu. Những phôi có các rối loạn NST 13, 17, 18 là một trong những nguyên nhân làm cho phôi ngày 3 không phát triển được tới ngày 5 hoặc chết trước khi tới ngày 5.

Xét 18 trường hợp bất thường số lượng ở NST giới tính, có tới 17 trường hợp là bất thường số lượng NST X và chỉ phát hiện 1 trường hợp rối loạn NST Y. Các dạng rối loạn NST X hay gặp nhất là dạng mất 1 NST giới tính X, trong đó tất cả là OX (13 trường hợp), dạng bất thường này là biểu hiện di truyền của

hội chứng Turner. Mặc dù hội chứng này có tỷ lệ gặp không cao và thường có tỷ lệ chết cao ở giai đoạn phôi thai (98 – 99%) nhưng nguy cơ phôi mang bất thường này rất cao đối với các phôi IVF 5 ngày tuổi, chiếm khoảng 2,2% (13/578). Dạng bất thường phổ biến thứ hai được phát hiện là dạng 3 NST X với tỷ lệ khoảng 0,69% (4/578). Trong tổng số 578 mẫu được phân tích, chỉ phát hiện duy nhất 1 trường hợp bất thường dạng 2 NST X và 2 NST Y chiếm 0,158%. Và không phát hiện trường hợp nào OY. Sự chênh lệch này rõ ràng chứng minh rằng phôi nam có khuynh hướng đạt tới giai đoạn cuối của sự phát triển phôi nang bình thường cao hơn so với phôi nữ. Nguyên nhân các dạng bất thường số lượng NST thường gặp trên X hơn là do tần suất rối loạn NST đặc biệt là bất thường số lượng xảy ra ở noãn cao hơn ở tinh trùng.

Chủ yếu sự rối loạn số lượng NST được phát hiện là dưới các dạng đơn nhiễm và dạng tam NST. Chỉ có 1 trường hợp phát hiện có rối loạn NST dạng 4 NST và 1 trường hợp có 5 NST. Các bất thường này có thể xảy ra đơn lẻ hoặc tồn tại kết hợp với nhau trong phôi.

Trong các phôi mang lệch bội NST có 66,12% phôi ngày 5 được kiểm tra sử dụng kỹ thuật PGT-A-NGS có rối loạn số lượng 1 NST (121/183), 18,03% phôi có rối loạn số lượng ở 2 NST (33/183), 7,1% và 8,74% lần lượt là tỷ lệ rối loạn số lượng NST ở đồng thời 3 và nhiều hơn 3 NST (Biểu đồ 3.5).

Như vậy các NST của phôi ngày 5 đều có nguy cơ bị lệch bội NST, sự rối loạn này có thể xảy ra ở 1 NST, 2 NST, 3 NST hoặc thậm chí nhiều hơn 3 NST cùng lúc gọi là lệch bội NST phức tạp. Kết quả này khá tương đồng với kết quả trong nghiên cứu của Traversa và cộng sự năm 2011, khi đánh giá mức độ lệch bội nhiễm sắc thể thì họ thấy lệch bội ở một nhiễm sắc thể là cao nhất (55%) sau đó là lệch bội 2 nhiễm sắc thể (41%), lệch bội ở 3 nhiễm sắc thể trở lên chỉ chiếm 7%⁸⁴.

Về rối loạn cấu trúc NST, trong các bất thường cấu trúc phát hiện (Bảng 3.4), có 91,67% là đơn bất thường, tức chỉ xuất hiện một loại hoặc thêm hoặc mất trên chỉ 1 NST. Đây là loại ít ảnh hưởng tới khả năng sống sót của phôi nhất, mặc dù các bất thường này có thể gây ra bệnh hoặc biểu hiện ra kiểu hình. Các dạng bất thường dù kích thước lớn hay nhỏ nếu xuất hiện trên nhiều NST thì nguy cơ tổn hại tới phôi càng cao. Do vậy, những bất thường này hiếm gặp do phôi nghiên cứu là mẫu phôi 5 ngày tuổi, nên chỉ chiếm dưới 6% các phôi có hơn 1 bất thường trên ≥ 2 NST khác nhau. Do đa số các tổn thương này có thể gây chết phôi trước khi phát triển tới ngày 5. Chi tiết tỷ lệ từng dạng bất thường xem ở Biểu đồ 3.4

Nhìn chung, bất thường cấu trúc NST xảy ra tại các NST không có quy luật rõ ràng ở phôi IVF 5 ngày tuổi. Tuy nhiên, đối với đột biến mất đoạn NST, xảy ra nhiều nhất là ở NST số 16 (12 trường hợp) sau đó tới các NST số 3, 5 và NST số 1. Đột biến thêm đoạn thường hay gặp ở NST số 1, 2, 4, 5 và NST X. Xét tổng thể, NST 4, 16 là các NST có tỷ lệ gặp bất thường cấu trúc NST dạng thêm và mất đoạn nhiều nhất. Trong hai NST giới tính, thì NST X phát hiện nhiều bất thường về cấu trúc hơn NST Y. Nhóm các NST không phát hiện bất thường nào trong tổng số 578 mẫu nghiên cứu là NST 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22.

4.2. Đánh giá hiệu quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi đối với kết quả có thai trong thụ tinh trong ống nghiệm và một số yếu tố liên quan đến tình trạng rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi.

4.2.1. Một số yếu tố liên quan đến tình trạng rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi

Tỷ lệ thành công trong thụ tinh ống nghiệm còn chưa cao, chỉ từ 30-35%⁴. Một trong những nguyên nhân quan trọng dẫn tới thất bại thụ tinh ống

nghiệm là do rối loạn NST^{85,86}. Các nghiên cứu đã chỉ ra rối loạn NST ở phôi thường gặp hơn ở những người mẹ có tiền sử sảy thai tái diễn, tiền sử thất bại làm tổ liên tiếp, mẹ lớn tuổi⁸⁷. Việc tìm kiếm, đánh giá yếu tố nguy cơ rối loạn NST ở nhóm đối tượng này là quan trọng nhằm lựa chọn đối tượng ưu tiên sàng lọc phôi tiền làm tổ với hi vọng tìm được những phôi không rối loạn NST sẽ cải thiện kết quả thụ tinh trong ống nghiệm, giảm số phôi phải chuyển trong một lần chuyển phôi, giảm được tỷ lệ đa thai và giảm các biến chứng trong thai sản.

4.2.1.1 Mối liên quan giữa rối loạn số lượng NST của phôi 5 ngày tuổi thụ tinh trong ống nghiệm và yếu tố tuổi người mẹ.

Tuổi người mẹ và rối loạn NST ở phôi, ở thai, trẻ sinh sống đã được nhiều nghiên cứu xác định^{27,88}. Tuy nhiên, các phương pháp trước đây có những hạn chế và xác định các rối loạn cấu trúc NST. Nghiên cứu này, phân tích các rối loạn NST thông qua kỹ thuật NGS, có thể xác định được rối loạn cấu trúc nhỏ, có thể lấp một khoảng trống của các kết quả nghiên cứu trước đây.

Nghiên cứu thực hiện trên tổng số 603 mẫu phôi được thu thập từ 133 cặp vợ chồng thực hiện IVF và đồng ý tham gia nghiên cứu có số lượng phôi đa dạng, dao động từ 3 tới 14 phôi. Trong tổng số 603 phôi, có 578 phôi khuyếch đại thành công hệ gen và được phân tích, bao gồm: 306 phôi có tuổi mẹ < 35 ($32,06 \pm 3,43$) và 272 phôi có tuổi mẹ ≥ 35 tuổi ($39,63 \pm 2,96$). Mặc dù đối tượng ở mỗi nhóm tuổi khác nhau thì có số lượng phôi khác nhau nhưng dựa trên số liệu Bảng 3.5 cho thấy rõ ràng có mối quan hệ giữa số lượng phôi và yếu tố tuổi của người mẹ và các con số này đều có nghĩa thống kê (p của χ^2 test < 0,05). Tuy nhiên, quy luật của mối quan hệ này chưa rõ ràng vì sự tác động qua lại này có thể phụ thuộc nhiều yếu tố.

Rối loạn NST ở noãn và phôi có tỷ lệ khá cao. Khoảng 25% số noãn thu được từ những phụ nữ có độ tuổi từ 30 đến 35 tuổi có bất thường về bộ NST (hầu hết là dị bội), và tần suất dị bội thường phụ thuộc trực tiếp vào độ tuổi và có thể lên đến hơn 80% ở những mẹ trên 40 tuổi ²⁶.

Dựa theo nghiên cứu trước đó của Kotdawala và cộng sự năm 2016, chúng tôi chia các đối tượng nghiên cứu ra thành 2 nhóm: nhóm 1 là nhóm phôi có tuổi người mẹ nhỏ hơn 35 tuổi, nhóm 2 là nhóm phôi có tuổi người mẹ từ 35 tuổi trở lên ⁸⁹.

Để tìm hiểu mối tương quan giữa tuổi người mẹ và tỷ lệ rối loạn NST ở phôi 5 ngày tuổi thụ tinh trong ống nghiệm, chúng tôi thực hiện test khi bình phương. Kết quả nhận thấy, có mối liên hệ giữa tuổi người mẹ và tỷ lệ rối loạn NST ở phôi 5 ngày tuổi thụ tinh trong ống nghiệm với độ tin cậy 95% và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Dựa trên số liệu Bảng 3.5, cho thấy đối với trường hợp người mẹ nhỏ hơn 35 tuổi, có 195/306 phôi không phát hiện bất thường số lượng NST và 111/306 phôi (chiếm 36,27%) có phát hiện rối loạn NST. So sánh với tỷ lệ 50,00% rối loạn NST ở nhóm đối tượng người mẹ có tuổi trên 35 (136/272).

Đặc biệt, khi đánh giá kết quả phân tích di truyền của các phôi ở nhóm tuổi này cho thấy đối với người mẹ lớn tuổi (> 35 tuổi) nguy cơ phôi mang rối loạn NST rất cao, lên tới 50%. Năm 2016, Kotdawala và cộng sự đã thực hiện một nghiên cứu đa trung tâm, sử dụng kỹ thuật a-CGH sàng lọc di truyền cho thấy tỷ lệ phôi rối loạn NST của nhóm tuổi mẹ dưới 35 thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm mẹ lớn tuổi. Tỷ lệ rối loạn NST của nhóm người mẹ trên 35 tuổi là 79,8%⁸⁹. Mặt khác, tỷ lệ rối loạn nhiễm sắc thể ở từ 2 NST của nhóm tuổi mẹ dưới 35 tuổi cũng thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm mẹ lớn tuổi. Sở dĩ

tỷ lệ rối loạn NST trong nghiên cứu trên cao hơn trong nghiên cứu của chúng tôi vì đối tượng được lựa chọn trong nghiên cứu này tập trung vào nhóm sảy thai tái diễn, tiền sử thất bại làm tổ liên tiếp, tiền sử vợ chồng có con bị rối loạn NST⁸⁹. Kết luận của Fraouli cũng cho rằng tỷ lệ lệch bội NST vượt trên 50% đối với hầu hết người mẹ trên 40 tuổi⁷⁰.

Năm 2016, nhóm nghiên cứu của Demko sử dụng kỹ thuật single-nucleotide polymorphism (SNP) để đánh giá bất thường 24 NST ở phôi ngày 5 và kết quả cho thấy 55% phôi ngày 5 mang bộ NST bình thường. Và con số này giảm nhanh chóng khi người mẹ trên 35 tuổi⁸⁷.

Tỷ lệ số lượng phôi có rối loạn NST ở các nhóm tuổi là khác nhau; nhóm đối tượng người mẹ trên 35 tuổi có tỷ lệ rối loạn NST cao hơn nhóm người mẹ dưới 35 tuổi tới 12,82%. Sự thống kê tỷ lệ này dựa trên hàm Khi bình phương, kết quả cho thấy giá trị Peason $\chi_2(2) = 12,6506$ và $pr = 0,000$ chứng tỏ rằng, hai yếu tố tuổi người mẹ và tỷ lệ phôi bình thường hay bất thường có mối quan hệ tác động lẫn nhau; nếu tuổi người mẹ càng cao nhất là trên 35 tuổi sẽ càng có nguy cơ tạo ra các phôi có rối loạn NST, đồng nghĩa với việc lượng phôi có bộ NST bình thường sẽ giảm xuống. Đúng như vậy, Demko và cộng sự tiến hành nghiên cứu đánh giá mức độ rối loạn NST trên 22599 phôi ngày 3 và 15112 phôi ngày cho kết quả số phôi không rối loạn NST giảm nhanh khi người mẹ sau tuổi 35⁸⁷.

Trong một nghiên cứu của Munné và cộng sự cũng cho thấy tỷ lệ phôi không mang rối loạn NST giảm dần khi tuổi người mẹ tăng dần, cụ thể ở nhóm người mẹ tuổi < 35 tuổi là 40%, tỷ lệ này giảm xuống 20% ở nhóm người mẹ tuổi trên 41 tuổi²⁷.

Đặc biệt, trong nghiên cứu năm 2002, Munné đưa ra bằng chứng chứng minh mối quan hệ giữa tuổi người mẹ và sự rối loạn NST ở phôi thụ tinh nhân tạo. Theo đó, ở nhóm tuổi người mẹ < 34,9, tỷ lệ phôi mang rối loạn NST là 57,2%, ở nhóm tuổi 35 – 39,9 là 58,9% và ở nhóm tuổi > 40 con số này là 65,1%⁹⁰. Tuy nhiên, tác giả sử dụng phương pháp FISH để đánh giá rối loạn NST và chỉ đánh giá trên một số NST như 13, 16, 18, 21, 22 và NST giới tính. FISH là một phương pháp cũ kèm theo một số hạn chế, do vậy không thể loại trừ các trường hợp âm tính giả do không xác định được các bất thường trên NST khác.

Bên cạnh đó đi sâu vào việc đánh giá mức độ tương quan giữa yếu tố tuổi người mẹ và tỷ lệ bất thường số lượng NST chúng tôi tiến hành thống kê và xây dựng hệ số tương quan r sử dụng phần mềm thống kê STATA 12.0 . Với hệ số tương quan thu được $r = 0,4783$ cho thấy mặc dù giữa yếu tố tuổi mẹ và tỷ lệ bất thường số lượng NST có mối liên hệ với nhau, tuy nhiên sự tương quan ở mức trung bình giữa hai yếu tố này, với độ chính xác 95% và có ý nghĩa. Tuy nhiên, ta vẫn thấy rõ ràng tỷ lệ bất thường số lượng NST tăng nhanh chóng khi người mẹ sau tuổi 35.

Biểu đồ 3.5 là đường hồi quy tuyến tính thể hiện mối tương quan giữa tuổi người mẹ và rối loạn số lượng NST. Nhận thấy, cứ 22,87% sự biến đổi của tỷ lệ rối loạn số lượng NST được giải thích bởi sự biến đổi của yếu tố tuổi mẹ (hệ số xác định R-square = 0,2287). Khi tuổi mẹ tăng thêm 1 đơn vị thì tỷ lệ rối loạn số lượng NST sẽ tăng thêm 0,01 đơn vị và sự thay đổi này có ý nghĩa với độ tin cậy 95%. Như vậy, chúng tôi đưa ra phương trình thể hiện mối liên hệ này như trong biểu đồ 3.6. Như vậy, tuổi của người mẹ và tỷ lệ bất thường phôi thụ tinh trong ống nghiệm 5 ngày tuổi có mối liên hệ với nhau, nhưng mối quan hệ giữa đặc điểm bất thường và yếu tố tuổi người mẹ lại độc lập với nhau ($p = 0,304$).

Đặc điểm rối loạn NST ở phôi 5 ngày tuổi IVF bao gồm: bất thường số lượng NST, bất thường cấu trúc NST, bất thường dạng thể khảm hoặc các dạng kết hợp phức tạp như vừa bất thường số lượng vừa bất thường cấu trúc hoặc thể khảm có số lượng NST bất thường. Sau đây, chúng tôi tập trung vào việc đánh giá mối quan hệ giữa yếu tố tuổi người mẹ và 2 dạng bất thường phổ biến nhất là bất thường liên quan tới số lượng NST.

Mặc dù hầu hết các NST hiện sự gia tăng xác suất lệch bội NST khi tuổi người mẹ tăng cao, nhưng hiệu ứng này trở nên ấn tượng hơn đối với một số NST. NST bị ảnh hưởng nhiều nhất bởi tuổi là NST số 14, số liệu cho thấy tỷ lệ lệch bội tăng gấp 3,7 lần ở nhóm người mẹ lớn tuổi (≥ 35 tuổi). Sau đó là tới NST số 7, tỷ lệ lệch bội tăng trên 3,3 lần và NST số 18 tăng 2,9 lần khi tuổi người mẹ tăng cao. So với mức tăng trung bình gấp khoảng 1,5 đến 2 lần đối với tất cả các NST số 2, 3, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22. Kết quả này khá tương đồng với nghiên cứu của Alfarawati và cộng sự năm 2011 kết luận, NST số 7 và 14 là nhóm có tỷ lệ bất thường số lượng tăng nhiều nhất khi tuổi mẹ tăng cao (gấp 5 - 6 lần), và đối với NST 2, 15, 17, 20, 22 tăng gấp 2 lần⁵⁹.

Trong các nghiên cứu trước đây, các tác giả chỉ tập trung vào đánh giá một vài NST có tỷ lệ cao, và gây ra các hội chứng nguy hại tới phôi như NST 13, 16, 18, 21, 22 và NST X. Các NST này còn có thể phát hiện trong quá trình mang thai ba tháng đầu mà hiếm nghiên cứu nào phát hiện bất thường số lượng của các NST khác. Chúng tôi thừa nhận rằng, các NST 13, 16, 18, 21, 22 và NST X là các NST có tỷ lệ xảy ra bất thường cao, và cũng có xu hướng tăng khi tuổi người mẹ tăng. Điều đáng nói ở đây là chúng tôi phát hiện thấy NST số 7, 14 là các NST có tỷ lệ tăng đột biến khi tuổi người mẹ tăng cao nhất là khi người mẹ hơn 37 tuổi. Như vậy chúng tôi chứng tỏ các NST số 7 và 14 nếu có bất thường số lượng NST

thì có khả năng gây chết cho phôi cao hơn các NST 13, 16, 18, 21, 22 và NST X. Nguyên nhân có thể do NST số 7 (159 triệu bp), NST số 14 (105 triệu bp) có kích thước lớn do vậy khi bất thường số lượng NST sẽ làm mất cân bằng hệ gen từ đó dễ gây chết phôi trong quá trình nuôi cấy và làm tổ ở tử cung.

4.2.1.2. Tiền sử thất bại làm tổ liên tiếp

Để khảo sát yếu tố tiền sử thai sản đến tình trạng rối loạn nhiễm sắc thể và đánh giá hiệu quả PGT-A đối với kết quả có thai trong thụ tinh trong ống nghiệm, chúng tôi tiến hành nghiên cứu trên 120 cặp vợ chồng bao gồm: 60 cặp vợ chồng tiến hành làm PGT-A-NGS và 60 cặp vợ chồng làm IVF không làm PGT-A. Trong số 60 cặp vợ chồng làm PGT-A, chúng tôi thu thập các tiền sử lâm sàng như tiền sử thất bại làm tổ nhiều lần, tiền sử sảy thai tái diễn, tiền sử vô sinh, đồng thời tiến hành phân tích tình trạng rối loạn nhiễm sắc thể của 288 phôi thu được, nhằm tìm ra mối liên quan giữa các yếu tố tiền sử thai sản và tình trạng rối loạn nhiễm sắc thể.

Thất bại làm tổ liên tiếp (Recurrent implantation failure - RIF) được định nghĩa là thất bại làm tổ từ 3 lần chuyển phôi liên tiếp trở lên hoặc không có thai lâm sàng sau chuyển 10 phôi⁹¹. Năm 2003, Pehlivan tiến hành nghiên cứu tỷ lệ rối loạn NST của 49 bệnh nhân có tiền sử thất bại làm tổ nhiều lần (có tiền sử thụ tinh ống nghiệm thất bại trung bình $4,2 \pm 1,6$ lần) và nhóm chứng là các bệnh nhân vô sinh không có tiền sử thất bại làm tổ nhiều lần, tiến hành sàng lọc di truyền trước chuyển phôi bằng kỹ thuật FISH cho các cặp NST 13, 16, 18, 21, 22, X và Y. Kết quả cho thấy nhóm có tiền sử thất bại làm tổ nhiều lần có tỷ lệ rối loạn NST cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (67,4% so với 36,3%)⁹². Năm 2019, Sato và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu đa trung tâm trên tổng số 171 bệnh nhân có tiền sử RPL và

RIF, được chia thành các các nhóm được sàng lọc và không được sàng lọc di truyền trước chuyển phôi bằng a CHG, phân bố các nhóm đều vào các nhóm tuổi mẹ. Kết quả cho thấy mặc dù tỷ lệ sinh con sống/bệnh nhân giữa nhóm nghiên cứu cao hơn nhóm chứng (26,8 so với 21,1 đối với nhóm RPL và 35,7% so với 26%) nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$)⁹³. Tuy nhiên, tỷ lệ sinh con sống/số phôi của nhóm nghiên cứu cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng đối với cả nhóm RPL (52,4% so với 21,6%; OR:3,89; 95% CI=1,16-13,1) và nhóm RIF (62,5% so với 31,7%; OR: 3,75; 95% CI= 1,28 – 10,95). Cũng tương tự như vậy, sàng lọc di truyền trước chuyển phôi bằng a CGH làm giảm tỷ lệ sảy thai sinh hóa/có thai sinh hóa ở nhóm nghiên cứu so với nhóm chứng ở nhóm RPL (12,5% so với 45%, OR: 0,14; 95% CI = 0,02 – 0,85) và nhóm RIF (10,5% so với 40,9%, OR: 0,17; 95%CI = 0,03 – 0,92)⁹³. Kết quả trên cho thấy mặc dù sàng lọc di truyền trước chuyển phôi trên nhóm có tiền sử thất bại làm tổ liên tiếp không làm tăng tỷ lệ sinh con sống nhưng giúp giảm được số phôi cần chuyển để có được cùng một số trẻ sinh sống với nhóm không được sàng lọc di truyền.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá các yếu tố nguy cơ rối loạn nhiễm sắc thể như sảy thai nhiều lần, tiền sử thất bại IUI, IVF, loại vô sinh dựa trên 288 phôi thu được từ 60 cặp vợ chồng được sàng lọc di truyền trước chuyển phôi bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (NGS), cho phép sàng lọc tất cả 24 NST của phôi. Theo đó, người phụ nữ có tiền sử thất bại IVF không làm tăng nguy cơ rối loạn NST ở phôi với RR=0,730, CI (0,512-1.04) với $p>0,05$. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Voullaire và cộng sự năm 2012⁹⁴. Điều này có thể giải thích do chúng tôi phân tích cả

những bệnh nhân thất bại IVF lần trở lên thay vì thất bại IVF từ 3 lần trong các nghiên cứu khác, cơ mẫu trong nghiên cứu này còn giới hạn vì vậy sự khác biệt về tỷ lệ rối loạn NST của các phôi giữa các nhóm là chưa rõ ràng. Hơn nữa, thất bại làm tổ trong thụ tinh ống nghiệm không chỉ do rối loạn NST mà còn bởi nhiều nguyên nhân như: mẹ lớn tuổi, vợ và chồng hút thuốc, bất thường tử cung như polyp buồng tử cung, u xơ tử cung hay dị dạng sinh dục, các yếu tố miễn dịch như có các cytokine hoặc kháng thể tự miễn, béo phì, viêm nhiễm niêm mạc tử cung, phác đồ thụ tinh ống nghiệm của các cơ sở y tế khác nhau.

4.2.1.3. Tiền sử sẩy thai tái diễn

Ủy ban thực hành của Hiệp hội y học sinh sản Hoa Kỳ (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine – ASRM) định nghĩa sẩy thai tái diễn là sẩy thai từ hai lần trở lên, được xác định bằng siêu âm hoặc giải phẫu bệnh lý sau sẩy thai⁹⁵.

Bảng 3.3 tiến hành phân tích tỷ lệ rối loạn NST của hai nhóm có tiền sử sẩy thai tái diễn và nhóm không có tiền sử sẩy thai tái diễn cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ rối loạn NST giữa hai nhóm này với RR=1,29, CI (0,95-1,76) với $p>0,05$. Kết quả này có thể do cỡ mẫu lựa chọn chưa đủ lớn để thể hiện rõ ràng sự khác biệt giữa hai nhóm nghiên cứu.

Sẩy thai tái diễn là thách thức đối với các nhà lâm sàng. Phác đồ xử trí sẩy thai tái diễn là tìm kiếm dị tật đường sinh dục, hội chứng antiphospholipid, rối loạn NST ở cặp vợ chồng. Tuy nhiên, có gần một nửa số trường hợp sẩy thai tái diễn là không rõ nguyên nhân⁶. Phần lớn sẩy thai sớm (50-70%) liên quan đến rối loạn NST, hay gặp nhất là rối loạn NST. Gần đây, các bằng chứng về di truyền học đồng thuận chỉ ra rối loạn NST là bất thường

hay gặp nhất trong IVF, gây ra do rối loạn nguyên phân và giảm phân ở người mẹ^{5,96}. Những rối loạn này gia tăng dần theo tuổi của mẹ. Đối với các cặp vợ chồng có tiền sử sảy thai tái diễn nhưng có nhiễm sắc đồ bình thường cũng được nghiên cứu đánh giá hiệu quả sàng lọc di truyền trước chuyển phôi. Mặc dù rối loạn NST thường gặp hơn ở những trường hợp mẹ lớn tuổi, rối loạn NST cũng gặp cả ở những cặp vợ chồng trẻ mà nguyên nhân vẫn chưa rõ tại sao sảy thai tái diễn lại thường gặp hơn ở những cặp vợ chồng này. Sàng lọc di truyền trước chuyển phôi như một giải pháp điều trị hứa hẹn ở nhóm đối tượng này tuy nhiên nhiều nghiên cứu cho nhiều kết quả khác nhau do có sự khác biệt về kỹ thuật sàng lọc và quần thể được lựa chọn. Năm 2003, Rubio và cộng sự tiến hành nghiên cứu đánh giá rối loạn NST và tiền sử sảy thai nhiều lần cho thấy nhóm có tiền sử sảy thai tái diễn so với nhóm chứng là nhóm có bệnh lý liên quan đến giới tính, sàng lọc di truyền bằng kỹ thuật FISH. Kết quả cho thấy tỷ lệ rối loạn NST của nhóm có tiền sử sảy thai tái diễn cao hơn nhóm chứng (70,7% so với 45,1%, $p < 0,01$)⁴².

Năm 2019, Lei và cộng sự nghiên cứu trên 506 cặp vợ chồng có tiền sử sảy thai tái diễn, được chia làm 2 nhóm nghiên cứu: nhóm được sàng lọc di truyền trước chuyển phôi bằng kỹ thuật SNP và nhóm chứng không được sàng lọc. Kết quả cho thấy tỷ lệ trẻ sinh sống/lần chuyển phôi của nhóm được sàng lọc cao hơn nhóm không được sàng lọc (44,9% so với 25,1%, RR: 3,00, 95% CI [1,96-4,6], $p < 0,00001$); tỷ lệ sảy thai thấp hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm được sàng lọc di truyền so với nhóm không được sàng lọc di truyền (15,7% so với 34,6%, RR: 0,27, 95% CI [0,13-0,57], $p = 0,00005$)³³. Trong nghiên cứu này, số phôi trong một lần chuyển phôi ở nhóm nghiên cứu thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (trung bình chuyển 1 phôi mỗi

lần). Việc sàng lọc di truyền trước chuyển phôi trong trường hợp này giúp không những giảm tỷ lệ sảy thai mà còn giảm tỷ lệ đa thai ở người mẹ. Như vậy, sàng lọc di truyền trước chuyển phôi ở các cặp vợ chồng có tiền sử sảy thai tái diễn làm tăng tỷ lệ sinh con sống trong một lần chuyển phôi, gián tiếp làm giảm tỷ lệ sảy thai và tỷ lệ đa thai.

4.2.1.4. Loại vô sinh

Tổ chức y tế thế giới ước tính có 60-80 triệu cặp vợ chồng vô sinh trên toàn thế giới. Rối loạn NST là nguyên nhân quan trọng trong vô sinh nguyên phát, vô sinh thứ phát và sảy thai nhiều lần, chiếm từ 5-10% nguyên nhân vô sinh³⁸. Đánh giá tỷ lệ rối loạn NST tùy theo nguyên nhân vô sinh là rất quan trọng trong việc lập kế hoạch can thiệp hỗ trợ sinh sản. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật giải trình tự thể hệ mới đánh giá rối loạn NST ở cả 2 nhóm vô sinh nguyên phát và vô sinh thứ phát cho kết quả sự khác biệt tỷ lệ rối loạn NST giữa 2 nhóm không có ý nghĩa thống kê với $RR=1,295$, $CI(0,955-1,757)$ với $p>0,05$. Yan và cộng sự thực hiện nghiên cứu trên 14965 cặp vợ chồng vô sinh cho thấy tỷ lệ rối loạn NST trên nhiễm sắc thể của bố hoặc mẹ ở nhóm vô sinh nguyên phát ((9,29%) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm vô sinh thứ phát (5,47%), với $p<0,05$ ⁹⁷. Kết quả trên có thể do Yan nghiên cứu NST đề ở các cặp vô sinh, trong đó có một số không nhỏ vô sinh nam có rối loạn NST cao (tới 17,26%, 462/2676) gây không có tinh trùng. Trong khi đó nghiên cứu của tôi lấy tiêu chuẩn tinh dịch đồ bình thường và việc đánh giá rối loạn NST trên phôi ngày năm thay vì đánh giá rối loạn NST của bố mẹ nên sự khác biệt về tỷ lệ rối loạn NST về loại vô sinh là không rõ ràng.

4.2.2. Đánh giá hiệu quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi đối với kết quả có thai trong thụ tinh trong ống nghiệm

4.2.2.1. Một số đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu

Tuổi trung bình của nhóm làm PGT-A là $38,03 \pm 4,38$; tuổi trung bình của nhóm không làm PGT-A là $33,72 \pm 0,49$. Trong nhóm làm PGT-A, đa số phụ nữ thuộc nhóm trên 35 tuổi (chiếm 85,0%). Trong khi ở nhóm không làm PGT-A, đa số phụ nữ thuộc nhóm dưới 35 tuổi (chiếm 61,7%). Độ tuổi trung bình trong cả hai nhóm trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Khai (2017) là $31,93 \pm 4,90^4$; tác giả Trần Thùy Anh và cs (2017) có tuổi trung bình là $33,1 \pm 4,7^{98}$; tác giả Nguyễn Xuân Hợi và cs (2010) cho tuổi trung bình của người vợ là $30,4 \pm 3,1^3$. Các nhóm nghiên cứu của Veleva và cộng sự có độ tuổi lần lượt là $31,2 \pm 4,5$ đến $32,5 \pm 5,0^{99}$. Có thể thấy độ tuổi trung bình trong các nghiên cứu khác nhau có thể do xu hướng bắt đầu có thai muộn hơn và sự khác biệt mục tiêu của từng nghiên cứu, tùy trung tâm và quốc gia khác nhau. Nghiên cứu của tôi có tiêu chuẩn trên những tiêu chí có nguy cơ rối loạn NST cao như: tuổi cao, tiền sử sảy thai tái diễn, tiền sử thất bại ivf cũng là yếu tố khiến tuổi người vợ trung bình trong nghiên cứu của tôi cao hơn các nghiên cứu trước kia.

Phụ nữ trên 35 tuổi luôn là đối tượng đặc biệt của những rối loạn di truyền hay gặp ở phôi đã được chứng minh⁷⁰. Tuổi cao là một yếu tố tiên lượng sẵn có của đáp ứng kém với kích thích buồng trứng ảnh hưởng đến kết quả thụ tinh trong ống nghiệm, khả năng rối loạn di truyền ở phôi và khả năng phôi phát triển thành công trong buồng tử cung của người mẹ. Trong nghiên cứu của chúng tôi, số người mẹ lớn tuổi ở nhóm làm PGT-A và nhóm không làm PGT-A lần lượt là 51/60 và 23/60 người mẹ ở mỗi nhóm.

Trong nghiên cứu của tôi, chỉ số khối cơ thể (BMI) ở nhóm làm PGT-A là $21,87 \pm 1,90$ (kg/m^2) và nhóm không làm PGT-A là $21,38 \pm 2,32$ (kg/m^2). Kết quả này tương tự nghiên cứu của Trần Thùy Anh là $21,1$ (kg/m^2)⁹⁸, nghiên cứu của La Marca (2013) có chỉ số BMI là $21,86 \pm 2,7$ (kg/m^2)¹⁰⁰, nghiên cứu của Vương Thị Ngọc Lan và cs (2016) thì chỉ số BMI là $20,9$ (kg/m^2)¹⁰¹. Chỉ số BMI không cho phép đánh giá dự trữ buồng trứng nhưng là một chỉ số khá quan trọng trong việc quyết định liều FSH ban đầu và tiên lượng đáp ứng buồng trứng.

Kết quả trên Bảng 3.13 cho thấy do nhóm làm PGT-A có độ tuổi dao động từ 24 đến 42, nên các xét nghiệm cận lâm sàng cũng dao động rõ rệt. Nồng độ FSH cơ bản (bFSH) được định lượng vào ngày 2 hay 3 của chu kỳ kinh là một xét nghiệm đã được sử dụng từ lâu và phổ biến trong đánh giá dự trữ buồng trứng. Tuổi cao và tăng nồng độ bFHS là yếu tố tiên lượng xấu giảm khả năng sinh sản. Nồng độ bFSH ở ngưỡng cao có giá trị dự đoán đáp ứng buồng trứng kém với độ đặc hiệu cao nhưng có khả năng dương tính giả, nhất là khi xảy ra ở phụ nữ trẻ tuổi. Ở nồng độ trung bình và thấp, bFSH ít có giá trị trong dự đoán đáp ứng, nhất là đáp ứng buồng trứng cao¹⁰². Krous và cộng sự đã so sánh 2 nhóm bFSH $\geq 9,6$ mUI/l và bFSH $< 9,6$ (mUI/l) kết hợp với 2 nhóm tuổi < 38 tuổi và ≥ 38 tuổi. Kết quả cho thấy: mức độ FSH cơ bản cao ở những bệnh nhân trẻ có mức độ đáp ứng kém hơn có ý nghĩa thống kê với bFSH thấp ($p > 0,0001$). Nhưng không khác biệt về tỷ lệ có thai lâm sàng với mức bFSH giữa hai nhóm. Những bệnh nhân ≥ 38 tuổi, FHS cơ bản cao có mức độ đáp ứng kém hơn và tăng nguy cơ chấm dứt chu kỳ buồng trứng, tuy nhiên cũng không có sự khác biệt về tỷ lệ lâm sàng với nhóm bFSH $< 9,6$ (mUI/l)¹⁰³. Trong nghiên cứu của tôi, xét nghiệm bFSH có giá trị trung bình trong nhóm làm PGT-A-NGS là $6,72 \pm 1,63$ (mUI/l) và nhóm không làm PGT-A là $6,09 \pm 1,59$ (mUI/l).

AMH là một glycoprotein của buồng trứng sản xuất từ các tế bào hạt của nang noãn sơ cấp, tiền hóc và có hóc ở giai đoạn sớm nhưng không có ở các nang noãn thoái hóa hay đang phát triển. Sự chế tiết mạnh mẽ được quan sát thấy ở những nang tiền hóc và nang có hóc nhỏ ¹⁰⁴. AMH có vai trò ức chế sự phát triển của các nang noãn nhỏ ở giai đoạn sớm. Nồng độ AMH trong máu tùy thuộc vào số lượng và hoạt động của các nang noãn nhỏ. Gần đây, AMH được đề cập đến như là một chỉ điểm của dự trữ buồng trứng và đáp ứng buồng trứng với độ chính xác cao hơn các yếu tố dự đoán đáp ứng buồng trứng hiện sử dụng ¹⁰⁴. Theo bảng 3.13, xét nghiệm AMH trung bình là $1,80 \pm 0,64$ ng/ml ở nhóm làm PGT-A-NGS trong khi nồng độ AMH của nhóm không làm PGT-A là $2,46 \pm 0,95$ ng/ml. Trong nghiên cứu này, có tới 85,0% số người vợ trong nhóm làm PGT-A có tuổi từ 35 và có 38,3 % số vợ trong nhóm không làm PGT-A là mẹ lớn tuổi. Nghiên cứu của Vương Thị Ngọc Lan trên 820 bệnh nhân cho thấy nồng độ AMH có liên quan chặt chẽ với số lượng noãn thu được ở bệnh nhân thụ tinh trong ống nghiệm ($r=0,74$; $r\text{-squared} = 0,55$; $p<0,001$). Nồng độ AMH có giá trị tốt nhất trong dự báo đáp ứng kém và đáp ứng cao, tiếp đến là AFC và bFSH ¹⁰¹. Nồng độ AMH trong máu ảnh hưởng rất lớn tới khả năng dự trữ buồng trứng của người phụ nữ. Nó đặc biệt giảm ở nhóm bệnh nhân trên 35 tuổi và là yếu tố tiên lượng quan trọng cho khả năng có thai ở những người vợ lớn tuổi ¹⁰⁵. Sự suy giảm AMH thấp có ý nghĩa thống kê ở nhóm nghiên cứu cho thấy một tiên lượng xấu trong thụ tinh ống nghiệm của nhóm nghiên cứu nếu như hai nhóm được dùng chung một kỹ thuật chuẩn bị phôi và chuyển phôi.

Kết quả (Bảng 3.14) cho thấy đa số các chỉ tiêu số lượng và chất lượng tinh trùng tương tự nhau giữa các nhóm.

4.2.2.2. Đặc điểm về các chỉ số của noãn, phôi và chuẩn bị niêm mạc tử cung

Để đánh giá hiệu quả của quá trình kích thích buồng trứng, chúng tôi thống kê số nang noãn chọc hút được. Về số lượng noãn, phôi của các nhóm cho thấy: số noãn thu được trung bình trong nhóm làm PGT-A-NGS là $7,73 \pm 2,0$ noãn; trong nhóm không làm PGT-A là $17,62 \pm 8,4$ noãn. Số noãn thu được trong nghiên cứu của tác giả Trần Thùy Anh là $12,22 \pm 7,37$ noãn⁹⁸; nghiên cứu của tác giả Vương Thị Ngọc Lan cho thấy số noãn trung bình thu được là 10,5 noãn¹⁰¹; số nang noãn trong nghiên cứu của Arce và cs (2013) là 9 noãn¹⁰⁶; trong khi nghiên cứu của Broer và cs thu được số noãn trung bình là 10,9 noãn¹⁰⁷. Mặc dù có sự khác nhau giữa các nghiên cứu về số noãn nhưng các nghiên cứu trước đây đều đồng thuận số noãn chọc được giảm nhanh sau tuổi 35; tổng liều FSH của nhóm 35-40 tuổi và trên 40 tuổi cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm dưới 35 tuổi^{98,106}. Nghiên cứu của chúng tôi tập trung vào những cặp vợ chồng lớn tuổi, tiền sử thất bại làm tổ nhiều lần, tiền sử sẩy thai tái diễn, ... Chính vì vậy có thể thấy số nang noãn thu được trong nghiên cứu của chúng tôi không cao, đặc biệt đối với nhóm làm PGT-A khi có tới 85% là mẹ lớn tuổi. Số nang noãn có nhóm mẹ có nhiều tuổi sẽ giảm số nang noãn để thụ tinh và từ đó giảm số phôi để chuyển vào buồng tử cung của người mẹ lớn tuổi. Chính vì vậy việc tìm kiếm những phôi có tỷ lệ có thai cao lại càng có ý nghĩa đối với những phụ nữ lớn tuổi, đặc biệt trong bối cảnh tuổi kết hôn và tuổi sinh con có xu thế tăng.

Theo bảng 3.18, số noãn thụ tinh trung bình là $6,25 \pm 1,95$ noãn trong nhóm PGT-A-NGS và $11,35 \pm 5,91$ noãn trong không làm PGT-A. Noãn phát triển thành phôi là $4,8 \pm 1,56$ noãn trong nhóm PGT-A-NGS và $10,32 \pm 5,53$ noãn trong nhóm không làm PGT-A.

Chất lượng phôi blastocyst trước sinh thiết và sau sinh thiết được đánh giá theo phân độ phôi của tác giả Gardner⁷¹. Chất lượng phôi được đánh giá dựa vào chất lượng khối tế bào nụ phôi và khối tế bào lá nuôi. Những phôi AA, AB được coi là những phôi blastocyst có chất lượng tốt. Về hình thái phôi (Bảng 3.19), số phôi tốt và rất tốt trung bình ở nhóm làm PGT-A-NGS là $1,85 \pm 1,21$ phôi; nhóm không làm PGT-A là $6,97 \pm 5,41$ phôi. Số phôi trung bình ở nhóm PGT-A-NGS là $1,37 \pm 0,92$ phôi; số phôi trung bình ở nhóm không làm PGT-A là $1,35 \pm 1,51$ phôi. Số phôi xấu trung bình trong nhóm làm PGT-A-NGS là $1,61 \pm 0,98$ phôi, trong nhóm không làm PGT-A là $2,01 \pm 3,41$ phôi. Năm 2020, tác giả Hoàng Ngân Minh và cs sử dụng kỹ thuật NGS đánh giá rối loạn NST trên 953 phôi ngày năm đã được sàng lọc hình thái bằng tiêu chuẩn Garder kết hợp với Majumdar cho kết quả nguy cơ rối loạn NST giảm khi độ giãn rộng khoang phôi lớn – độ 5 (OR=0,32, CI95%=0,25-0,42, p<0,001); nguy cơ rối loạn NST tăng lên khi hình thái lá nuôi xấu (OR=5,89; CI95%=3,61-9,62, p<0,001); nguy cơ bất thường tăng khi hình thái ICM xấu đi (OR=4,66; CI95%=2,77-7,84, p<0,001) và hình thái phôi xếp loại tốt thì rối loạn NST giảm đi (OR=0,22; 95%CI=0,16-0,29, p<0,001)¹⁰⁸. Nghiên cứu cũng chỉ ra hình thái phôi xấu làm gia tăng bất thường số lượng, bất thường cấu trúc, bất thường khám lần lượt là 3,6 lần (CI95%=2,44-5,31); 3,08 lần (CI95%=0,5-6,32) và 1,84 lần (CI95%=1,25-2,70)¹⁰⁸. Nghiên cứu của Majumda và cs (2017) cũng chỉ ra tỷ lệ rối loạn NST tăng dần từ 40,5 tới 50 và 73,2% ở nhóm phân loại phôi mang hình thái từ tốt tới xấu¹⁰⁹. Theo Zhao và cs (2018) thì phôi có TE cho tỷ lệ mang thai và sinh con sống lâm sàng cao hơn đáng kể so với phôi có TE loại C (62,4% so với 35,7% và 49,7% so với 27,4%)¹¹⁰. Nhóm nghiên cứu của chúng tôi có số phôi có hình thái tốt thấp ở hai nhóm, đặc biệt nhóm làm PGT-A có thể do tỷ lệ

mẹ lớn tuổi ở nhóm làm PGT-A rất cao (chiếm 85%). Hơn nữa, xuất phát số lượng noãn thu được, số lượng noãn thụ tinh phát triển thành phôi của nhóm nghiên cứu vốn dĩ đã ít hơn nên nếu dùng phương pháp lựa chọn phôi có hình thái tốt trong nhóm này thì có rất ít phôi đạt tiêu chuẩn, là một tiên lượng xấu và là những quyết định khó khăn trên thực tế lâm sàng.

Niêm mạc tử cung là nơi phôi thai làm tổ, chất lượng của niêm mạc tử cung được cho là có ảnh hưởng lớn đến khả năng có thai ở người phụ nữ. Trong thụ tinh ống nghiệm, độ dày của niêm mạc tử cung được theo dõi chặt nhằm tăng hiệu quả cho quá trình chuyển phôi đối với cả chu kỳ phôi tươi và phôi trữ đông. Fang và cs so sánh 3 nhóm bệnh nhân có độ dày niêm mạc trong ngày chuyển phôi lần lượt là: (1) niêm mạc <8mm; (2) niêm mạc 8-14 mm và (3) niêm mạc >14 mm. Kết quả cho thấy độ dày niêm mạc có ảnh hưởng đến tỷ lệ có thai lâm sàng, cụ thể nhóm 1 có tỷ lệ có thai lâm sàng thấp hơn có ý nghĩa so với hai nhóm còn lại ($p < 0,01$)¹¹¹. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Khai và cs cũng chỉ ra nhóm có độ dày niêm mạc tử cung từ 8-14 mm cho tỷ lệ có thai cao nhất là 40,8%, sự khác biệt tỷ lệ có thai giữa nhóm có niêm mạc tử cung 8-14mm với nhóm dưới 8mm và nhóm trên 14 mm có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ ⁴. Kết quả này tương tự với các nghiên cứu trước về độ dày niêm mạc tử cung. Vương Thị Ngọc Lan và cs (2016) chỉ ra khi niêm mạc tử cung <8mm thì thai kì hiếm khi xảy ra, khi niêm mạc dưới 7mm thì thai kì không xảy ra¹⁰¹. Như vậy độ dày niêm mạc phù hợp là điều kiện quan trọng làm tăng tỷ lệ có thai. Trong nghiên cứu (Bảng 3.19), độ dày niêm mạc tử cung trung bình ở nhóm PGT-A-NGS là $9,61 \pm 1,28$ mm; ở nhóm không làm PGT-A là $9,67 \pm 1,26$ mm. Độ dày niêm mạc tử cung trong hai nhóm nghiên cứu nằm trong khoảng 8-10mm chiếm tỷ lệ cao nhất (50,0% đối

với nhóm PGT-A-NGS và 51,7% đối với nhóm chứng). Mặt khác, hơn 80% số người phụ nữ trong cả hai nhóm có độ dày niêm mạc tử cung từ 8 đến 14 mm, là độ dày thuận lợi cho sự làm tổ của phôi. Đây cũng là vì phương pháp thụ tinh ống nghiệm trong nghiên cứu sử dụng phôi trữ đông mà ưu điểm của phương pháp chuyển phôi trữ đông vì niêm mạc tử cung được chuẩn bị tốt hơn chuyển phôi tươi và cũng vì thế nên có thể tăng tỷ lệ có thai lâm sàng và tỷ lệ thai sinh sống⁴.

4.2.2.3. Kết quả NST của phôi blastocyst thu được sau sàng lọc di truyền kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới NGS:

Theo bảng 3.20, tổng số phôi được phân tích của 60 người vợ là 288 phôi và có tỷ lệ phôi rối loạn NST là 36,8% (106/288 phôi) và số phôi không rối loạn NST là 63,2% (182/288). Kết quả tương tự nghiên cứu của Liu và cs (2016) khi tiến hành sàng lọc 221 phôi ngày 5 bằng phương pháp giải trình tự thế hệ mới cho kết quả tỷ lệ rối loạn NST là 40,7%⁸¹. Kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn kết quả một số nghiên cứu trước đây khi khảo sát rối loạn NST của phôi ngày năm. Một nghiên cứu của Alfarawati và cộng sự năm 2011, cũng chỉ ra rằng 56,7% (283 trên tổng số 500) mẫu phôi nang được thử nghiệm mang rối loạn NST⁵⁹. Tuy nhiên, đối tượng trong các nghiên cứu này đều tập trung vào các trường hợp sảy thai liên tiếp (từ 2 lần sảy thai) hoặc thất bại làm tổ từ 2 lần hoặc có tuổi người mẹ cao (đơn số >38,5 tuổi)⁵⁹, trong khi đối tượng trong nghiên cứu của chúng tôi có độ tuổi thấp hơn. Do vậy tỷ lệ mà nghiên cứu này của chúng tôi đưa ra thấp hơn của các nghiên cứu trên nhưng vẫn tương đồng với các nhận định đó.

4.2.2.4. Kết quả phân tích sự rối loạn NST ở phôi 5 ngày thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới – Next generation sequencing (NGS)

Kết quả của bảng 3.21 cho thấy: Tỷ lệ có thai lâm sàng là 26/60 trường hợp ở nhóm làm PGT-A-NGS (chiếm 43,3%), và 15/60 trường hợp ở nhóm không làm PGT-A (chiếm 25,0%). Bảng 3.21 cũng chỉ ra thấy tỷ lệ có thai tiến triển là 18,3% ở nhóm làm PGT-A-NGS, tỷ lệ có thai tiến triển ở nhóm không làm PGT-A là 15,08%. Như vậy, mặc dù nhóm nghiên cứu có những yếu tố tiên lượng xấu đã được chứng minh như: tuổi người vợ cao, nồng độ FSH cao hơn nhóm chứng, nồng độ AMH thấp, số nang noãn trung bình thu được ít, số phôi sống của mỗi bệnh nhân thấp, số noãn phát triển thành phôi thấp, số phôi có hình thái học đạt mức tốt thấp nhưng kết quả tỷ lệ có thai lâm sàng ở những phôi được chuyển của nhóm làm PGT-A-NGS vẫn khả quan. Theo một số nghiên cứu khác nhau, đối với phụ nữ trên 35 tuổi, tỷ lệ có thai lâm sàng khi tiến hành IVF cho kết quả kém hơn hẳn so với nhóm phụ nữ dưới 35 tuổi. Thực tế dự trữ buồng trứng của nhóm mẹ lớn tuổi giảm, số nang noãn thu được trung bình ở đối tượng này thấp hơn nhóm dưới 35 tuổi dẫn tới số phôi được thụ tinh cũng ít hơn, chưa kể tới số phôi đạt tiêu chuẩn hình thái tốt lại ít hơn nhóm tuổi mẹ dưới 35. Điều này đặt ra ngoài việc sàng lọc hình thái học, cần có một phương pháp có khả năng chỉ ra trong số ít phôi mà những người mẹ lớn tuổi có được, đâu là phôi có tỷ lệ thai lâm sàng cao nhất. Kết quả bảng 3.24 cho thấy được hiệu quả của phương pháp PGT-A-NGS đối với tỷ lệ có thai lâm sàng trên các phụ nữ lớn tuổi. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Khai cho kết quả có thai lâm sàng là

39,0 %⁴; trong khi đó, nghiên cứu của Nguyễn Xuân Hợi và cộng sự (2010) cho thấy tỷ lệ có thai lâm sàng là 35,9%³. Hai tác giả trên đều nghiên cứu trên cả chu kỳ phôi đông và phôi tươi, các phôi không được sàng lọc di truyền trước khi chuyển vào buồng tử cung của người vợ. Trong khi đó, theo báo cáo của Hiệp hội Sinh sản và phôi học Châu Âu (ESHRE), tỷ lệ có thai lâm sàng trên một lần chuyển phôi của phương pháp thụ tinh có bơm tinh trùng vào noãn năm 2011 là 31,8%¹¹². Tỷ lệ có thai lâm sàng sử dụng phôi trữ đông trên số chu kỳ chuyển phôi ở Hàn Quốc là 34,2%¹¹³. Các nghiên cứu trên cho tỷ lệ có thai lâm sàng thấp hơn nhóm nghiên cứu của chúng tôi là 43,3% (Bảng 3.24). Liss và cs (2018) cũng đã tiến hành so sánh đối chứng giữa nhóm thụ tinh ống nghiệm sử dụng phôi đông, có sàng lọc di truyền trước chuyển phôi bằng NGS với nhóm thụ tinh ống nghiệm sử dụng phôi đông thông thường cho kết quả tỷ lệ có thai lâm sàng của nhóm nghiên cứu cao hơn nhóm chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (42,0% so với 23,5%, $p=0,012$)⁶⁸. Từ những nhận định trên cho thấy đối với nhóm nhóm người vợ lớn tuổi nếu được thụ tinh ống nghiệm bằng phương pháp IVF/ICSI và có sàng lọc di truyền bằng NGS trước chuyển phôi cho tỷ lệ có thai lâm sàng trên một chu kỳ cao hơn nhóm thực hiện IVF chỉ lựa chọn phôi có hình thái tốt

Theo bảng 3.21, tỷ lệ chu kỳ sinh con sống trên tổng số chu kỳ chuyển phôi của nhóm sàng lọc di truyền trước chuyển phôi bằng NGS là 18,3% (11 trẻ sinh sống), tỷ lệ sinh con sống của nhóm không làm PGT-A là 13,3% (8 trẻ sinh sống). Thực vậy, một nghiên cứu của Liss và cs (2018) cũng tiến hành so sánh đối chứng giữa nhóm được sàng lọc di truyền bằng NGS và nhóm chỉ được lựa

chọn phôi có hình thái tốt cho kết quả tỷ lệ sinh con sống trên tổng số chu kỳ đối với nhóm người vợ được sàng lọc phôi bằng NGS là 42%, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chỉ được sàng lọc hình thái học là 23,5%, với $p=0,012$, với độ tuổi trung bình của hai nhóm lần lượt là $35,8\pm 3,7$ tuổi và $35,2\pm 2,1$ tuổi ($p=0,176$)⁶⁸. Nếu hai nhóm cùng thực hiện trên cùng một nhóm đối tượng có tuổi tương tự nhau, tỷ lệ sinh con sống trên chu kỳ chuyển phôi cao hơn hẳn ở nhóm được sàng lọc di truyền.

Ngoài ra, bảng 3.21 chỉ ra tỷ lệ sảy thai của nhóm làm PGT-A là 26,7%, so với nhóm không làm PGT-A là 10%. Tương tự, tỷ lệ thai lưu cũng không khác nhau giữa hai nhóm nghiên cứu. Theo Liss và cs (2018), tỷ lệ sảy thai nhóm được sàng lọc di truyền trước chuyển phôi bằng NGS là 9,6% thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng là 28,6%, với $p=0,027$. Kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới tầm soát được bất thường toàn bộ 24 NST, giúp đánh giá hiệu quả chất lượng thực của phôi, mang lại hiệu quả cao trong việc lựa chọn những phôi thật sự tốt để tiến hành chuyển vào buồng tử cung cho người mẹ.

Hiệu quả của các phương pháp hỗ trợ sinh sản phụ thuộc rất nhiều vào chất lượng của phôi được chuyển và khả năng làm tổ của chúng. Các phương pháp sàng lọc bằng hình thái không phản ánh được bản chất di truyền của phôi. Các nghiên cứu chỉ ra rằng, mặc dù rối loạn nhiễm sắc thể có ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển của phôi, nhưng một tỷ lệ đáng kể những phôi bất thường có thể phát triển đến giai đoạn phôi nang và có những thông số về hình thái tốt. Thực tế, 42.8% các phôi rối loạn NST vẫn có thể phát triển đến giai đoạn phôi nang¹¹⁴. Vì vậy, việc sàng lọc di truyền của các phôi IVF là cần thiết. Hơn nữa, sảy thai

tự phát ở người được ghi nhận có liên quan chặt chẽ với lệnh bội NST¹¹⁵. Rối loạn NST là nguyên nhân phổ biến nhất gây ra vô sinh tự nhiên, PGT-A được sử dụng để tối thiểu hóa những phôi rối loạn NST ở những bệnh nhân thực hiện IVF. Nhờ PGT-A xác định những phôi lưỡng bội để chuyển vào buồng tử cung, do đó tăng cả tỷ lệ làm tổ của phôi và giảm tỷ lệ sảy thai khi thực hiện IVF. Nhu cầu chọn lọc những phôi có bộ NST bình thường đã dẫn đến sự phát triển của các phương pháp PGT-A. Kỹ thuật PGT-A NGS được thiết lập để đáp ứng yêu cầu sàng lọc các phôi bất thường cả về số lượng và cấu trúc NST.

Một tiên bộ đáng kể đó là việc sử dụng mẫu sinh thiết lá nuôi so với việc sinh thiết phôi bào ở giai đoạn phân cắt và thể cực. Dữ liệu báo cáo về tỷ lệ thể khảm ở giai đoạn phân cắt có thể lên tới 50%. Trong khi đó thể khảm vẫn tồn tại ở giai đoạn phôi nang, tỷ lệ thể khảm thấp hơn đáng kể, khoảng 3-5% so với các giai đoạn phát triển sớm hơn¹¹⁶⁻¹¹⁸. Nghiên cứu này tiến hành trên mẫu tế bào phôi nang là phù hợp, giúp cho kết quả sàng lọc đáng tin cậy hơn so với giai đoạn trước đó. Nhờ vậy, việc sử dụng PGT-A cùng với sinh thiết tại giai đoạn phôi nang có thể cải thiện kết quả lâm sàng của bệnh nhân so với sử dụng các mẫu sinh thiết thể cực, phôi phân cắt. Sự kết hợp giữa kỹ thuật mới sàng lọc 24 NST và sinh thiết ở giai đoạn phôi nang thay vì giai đoạn phân cắt có thể làm tăng đáng kể kết quả thụ thai¹¹⁹. Scott và cs đánh giá xem liệu sinh thiết phôi nang và PGT-A có thể cải thiện tỉ lệ làm tổ của phôi và tỉ lệ sinh ở những phụ nữ có tiên lượng tốt¹²⁰. Tỉ lệ sinh là 84.7% ở các chu kỳ IVF trong nhóm thực hiện PGT-A so với 67.5% trong nhóm đối chứng ($p=0.01$; RR 1.26, 95% CI 1.05-1.5). Hai thử nghiệm khác cho thấy PGT-A mang lại tỷ lệ mang thai trên 20 tuần

cao hơn, nhưng không báo cáo cụ thể tỷ lệ sinh ¹²⁰. Do đó việc sử dụng PGT-A cùng với sinh thiết tại giai đoạn phôi nang có thể cải thiện kết quả lâm sàng của bệnh nhân ^{96,121}.

Bên cạnh đó, việc sàng lọc trên mẫu phôi nang giúp xác định được tình trạng khảm NST ở phôi. Điều không thể thực hiện được ở các loại mẫu sinh thiết thể cực hoặc sinh thiết giai đoạn phân cắt ¹¹⁷. Kỹ thuật PGT-A-NGS còn có thể giúp xác định tỷ lệ khảm ở phôi. Đây là những chỉ dẫn rất tốt cho các nhà phôi học lâm sàng quyết định phôi nào nên được chuyển. Kỹ thuật PGT-A-NGS có ưu điểm vượt trội trong xác định thể khảm ở phôi. Ngược lại, một số kỹ thuật khác xác định thể khảm có tỷ lệ dương tính giả khá cao trên các mẫu hỗn hợp các dòng tế bào bình thường và bất thường ¹²².

Thực tế, nhiều cặp vợ chồng không có phôi lưỡng bội, chỉ có phôi lệch bội và phôi khảm. Việc xác định được phôi khảm sẽ cung cấp cho các cặp vợ chồng có cơ hội có con bằng chuyển phôi khảm. Các báo cáo cho thấy tỷ lệ chuyển phôi thành công của phôi khảm khá cao, có thể lên đến 41% ¹²³, tỷ lệ có thai tiến triển có thể lên đến 15,4% ¹²⁴. Bên cạnh đó, loại khảm cũng là yếu tố tiên lượng tỷ lệ thành công. Khảm cấu trúc NST cho tỷ lệ thành công cao nhất, lên đến 41% thai tiến triển và thấp nhất là khảm nhiều tổn thương với tỷ lệ thai tiến triển là 10% ^{124,125}. Điều này có thể do quá trình tự sửa chữa của phôi ¹¹⁸. Vì vậy, các phôi thể khảm được xác định tỷ lệ khảm bằng PGT-A-NGS là thông tin quan trọng để quyết định chuyển phôi hay không. Tăng thêm cơ hội cho các cặp vợ chồng không còn phôi để chuyển. Những kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra sử dụng phương pháp giải trình tự thế hệ mới để sàng lọc di truyền trước

chuyển phôi, chọn được các phôi có bộ NST bình thường với hi vọng có thể cải thiện tỷ lệ có thai lâm sàng, tỷ lệ có thai tiến triển so với việc chỉ lựa chọn hình thái phôi như phác đồ thụ tinh ống nghiệm cổ điển. Điều này đặc biệt có ý nghĩa đối với những phụ nữ tuổi cao vì việc dự trữ buồng trứng giảm nhanh ở nhóm đối tượng này, số lượng phôi được thụ tinh giảm nhanh đồng thời số phôi bất thường hình thái cũng như rối loạn NST tăng nhanh ở đối tượng mẹ lớn tuổi khiến việc lựa chọn được một phôi “bình thường” trong số phôi ít ỏi mà người mẹ lớn tuổi có để chuyển phôi là rất quan trọng. Kết quả cũng dẫn đến tiềm năng lựa chọn chính xác được những phôi không rối loạn NST sẽ làm giảm tỷ lệ chuyển 2-3 phôi như nghiên cứu gần đây chỉ ra tại Việt Nam ⁴ và cũng là xu thế chung của thế giới ¹¹², giúp giảm tỷ lệ đa thai từ đó giảm tỷ lệ sảy thai, đẻ non, giảm tai biến sản khoa và giảm các chi phí y tế.

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu, nhóm nghiên cứu có một số kết luận sau:

Mục tiêu 1. Phân tích kết quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới ở các phôi thụ tinh trong ống nghiệm.

Tỷ lệ rối loạn NST ở phôi 5 ngày tuổi thụ tinh trong ống nghiệm trong nghiên cứu là 42,7%. Lệnh bội NST có thể xảy ra ở tất cả các NST với tỷ lệ khác nhau, cao nhất là các NST số 15, 16, 21, 22 và NST giới tính, ít gặp ở nhóm các NST số 7, 9, 11 và 19. Tỷ lệ bất thường cấu trúc NST không gặp ở NST số 12, 20 và 22 ở quần thể nghiên cứu.

Mục tiêu 2. Đánh giá hiệu quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi đối với kết quả có thai trong thụ tinh trong ống nghiệm và một số yếu tố liên quan đến tình trạng rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi.

- Xác định một số yếu tố nguy cơ rối loạn NST ở phôi thụ tinh ống nghiệm:

- Tiền sử thất bại IUI, thất bại làm tổ liên tiếp trong IVF, tiền sử sảy thai/thai lưu và loại vô sinh không liên quan đến lệch bội NST ở phôi.

- Tuổi mẹ và RLNST có mối tương quan thuận với mức độ liên hệ ở mức trung bình ($r=0,4783$). Phương trình hồi quy tuyến tính: Tỷ lệ bất thường số lượng NST = $-0,7 + 0,01 \times (\text{tuổi mẹ})$. NST bị ảnh hưởng nhiều nhất bởi tuổi là NST số 14, NST số 7 và NST 18.

- Đánh giá hiệu quả của kỹ thuật NGS trong sàng lọc 24 NST trước chuyển phôi đối với thụ tinh trong ống nghiệm:

- Với kỹ thuật NGS áp dụng trên 288 phôi, số lượng phôi rối loạn NST là 36,8%, số phôi không rối loạn NST là 182 (63,2%). Kỹ thuật NGS tầm soát được toàn bộ bất thường 24 NST.

- PGT-A-NGS có thể cải thiện tỷ lệ có thai lâm sàng, thai tiến triển. Tỷ lệ có thai lâm sàng là 43,3% ở nhóm PGT-A-NGS và 25,0% ở nhóm không làm PGT-A.

KIẾN NGHỊ

1. Do đây là kỹ thuật còn khá mới, nên trong thời gian nghiên cứu số liệu chúng tôi thu được còn hạn chế, chúng tôi rất mong trong thời gian tới có thể tiếp tục nghiên cứu trên cỡ mẫu lớn. Từ đó, xác định đầy đủ các yếu tố nguy cơ lệnh bội NST cũng như đánh giá hiệu quả của kỹ thuật NGS trong sàng lọc 24 NST trước chuyển phôi đối với thụ tinh trong ống nghiệm.

2. Tiếp tục nghiên cứu mối liên quan giữa hình thái phôi và lệnh bội NST trong quá trình phát triển phôi, trên cơ sở đó chọn được những phôi có chất lượng tốt để chuyển phôi, nâng cao chất lượng trong điều trị.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI

1. Nguyễn Thị Bích Vân, Hoàng Văn Lương, Nguyễn Viết Tiến, Nguyễn Duy Bắc, Đặng Tiến Trường (2018). Một số đặc điểm rối loạn NST ở phôi ngày năm thụ tinh trong ống nghiệm. *Tạp chí Phụ Sản*, Tập 16, số 01:138-141.
2. Tien Truong Dang, Thi Mui Phung, Hoang Le, Bich Van Nguyen, Thi Sim Nguyen, Thi Lien Huong Nguyen, Vu Thi Nga, Dinh Toi Chu, Van Luong Hoang, Duy Bac Nguyen (2019). Preimplantation genetic testing of aneuploidy by Next Generation Sequencing: association of maternal age and chromosomal abnormalities of blastocyst. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019 Dec 30; 7(24): 4427–4431.
3. Nguyễn Thị Bích Vân, Nguyễn Duy Bắc, Nguyễn Viết Tiến, Đặng Tiến Trường, Lê Hoàng (2021). Liên quan giữa rối loạn NST ở phôi ngày 5 với tuổi mẹ trong thụ tinh trong ống nghiệm. *Tạp chí Y học Việt Nam*. Tập 508, tháng 11, số 2: 22-26.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lindsay TJ, Vitrikas KR. Evaluation and treatment of infertility. *American family physician*. Mar 1 2015;91(5):308-14.
2. Nguyễn Xuân Hợi. Đặc điểm lâm sàng và tinh dịch đồ của bệnh nhân vô sinh nam do tinh trùng ít và yếu đến khám tại bệnh viện phụ sản trung ương. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 2016;444(2)
3. Nguyễn Xuân Hợi. Các yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ có thai lâm sàng và tỷ lệ làm tổ trong hỗ trợ sinh sản. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*. 2010;69(4):4.
4. Nguyễn Thị Minh Khai .Đánh giá hiệu quả chuyển phôi trữ đông cho bệnh nhân thụ tinh ống nghiệm tại bệnh viện Phụ sản Trung ương giai đoạn 2012-2014. Đại học Y Hà Nội; 2017.
5. Lathi RB, Westphal LM, Milki AA. Aneuploidy in the miscarriages of infertile women and the potential benefit of preimplantation genetic diagnosis. *Fertility and sterility*. Feb 2008;89(2):353-7. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.02.040
6. Shahine LK, Lathi RB. Embryo selection with preimplantation chromosomal screening in patients with recurrent pregnancy loss. *Seminars in reproductive medicine*. Mar 2014;32(2):93-9. doi:10.1055/s-0033-1363550
7. Phạm Hùng Vân , Nguyễn Đỗ Phúc. Giải trình tự gen thế hệ mới: cuộc cách mạng trong chẩn đoán và nghiên cứu y sinh học. *Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh*. 2012;16(3):1-8.
8. Jose-Miller AB, Boyden JW, Frey KA. Infertility. *American family physician*. Mar 15 2007;75(6):849-56.
9. Nicoli A, Capodanno F, Valli B, et al. Impact of insemination technique, semen quality and oocyte cryopreservation on pronuclear morphology of zygotes derived from sibling oocytes. *Zygote (Cambridge, England)*. Feb 2010;18(1):61-8. doi:10.1017/s0967199409005516

10. Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Human reproduction (Oxford, England)*. Sep 2012;27(9):2649-57. doi:10.1093/humrep/des210
11. Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RA. Human pre-implantation embryo development. *Development (Cambridge, England)*. Mar 2012;139(5):829-41. doi:10.1242/dev.060426
12. Iwata K, Yumoto K, Sugishima M, et al. Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography. *Journal of assisted reproduction and genetics*. Apr 2014;31(4):421-6. doi:10.1007/s10815-014-0195-2
13. Munné S, Held KR, Magli CM, et al. Intra-age, intercenter, and intercycle differences in chromosome abnormalities in oocytes. *Fertility and sterility*. Apr 2012;97(4):935-42. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.01.106
14. Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenetics and cell genetics*. 2000;90(3-4):219-26. doi:10.1159/000056773
15. Ziebe S, Lundin K, Loft A, et al. 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 (Oxford, England)*. Dec 2003; 18(12):2575-81.
16. Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, et al. Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Human reproduction (Oxford, England)*. Apr 2007;22(4):980-8. doi:10.1093/humrep/del484

17. Santos MA, Teklenburg G, Macklon NS, et al. The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of Day 4, 5 and 8 human embryos. *Human reproduction (Oxford, England)*. Aug 2010;25(8):1916-26. doi:10.1093/humrep/deq139
18. Sher G, Keskinetepe L, Keskinetepe M, et al. 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*. May 2007;87(5):1033-40. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.08.108
19. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertility and sterility*. Aug 2003;80(2):341-9.
20. Chen CK, Shen GY, Horng SG, et al. The relationship of pronuclear stage morphology and chromosome status at cleavage stage. *Journal of assisted reproduction and genetics*. Oct 2003;20(10):413-20.
21. Balaban B, Yakin K, Urman B, Isiklar A, Tesarik J. Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. *Reproductive biomedicine online*. Jun 2004;8(6):695-700.
22. Al-Asmar N, Peinado V, Vera M, et al. Chromosomal abnormalities in embryos from couples with a previous aneuploid miscarriage. *Fertility and sterility*. Jul 2012;98(1):145-50. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.03.035
23. Nguyễn Việt Tiến, Nguyễn Thị Minh. Bước đầu đánh giá kết quả chẩn đoán di truyền tiền làm tổ tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương. *Tạp chí Phụ Sản*. 2012;12(2)
24. Hoàng Thị Hương. 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*. 2012;12(3)

25. Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertility and sterility*. Oct 2010;94(5):1700-6. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.10.015
26. Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, et al. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertility and sterility*. Aug 2010;94(3):875-87. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.04.053
27. Munné S, Chen S, Colls P, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reproductive biomedicine online*. May 2007;14(5):628-34. doi:10.1016/s1472-6483(10)61057-7
28. Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, et al. 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*. Mar 2014;101(3):656-663.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.11.004
29. Kalmbach KH, Fontes Antunes DM, Dracxler RC, et al. Telomeres and human reproduction. *Fertility and sterility*. 2013;99(1):23-29. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.11.039
30. Nguyễn Xuân Hợi, Nguyễn Thị Liên Hương. Tuổi của người phụ nữ tác động đến chất lượng phôi và tỷ lệ có thai trong thụ tinh ống nghiệm. *Tạp chí y học Việt Nam* 2017;457(2)
31. Munne S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reproductive biomedicine online*. Mar-Apr 2002;4(2):183-96.

32. Marquez C, Sandalinas M, Bahce M, Alikani M, Munne S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reproductive biomedicine online*. 2000;1(1):17-26.
33. Lei C-X, Ye J-F, Sui Y-L, Zhang Y-P, Sun X-X. Retrospective cohort study of preimplantation genetic testing for aneuploidy with comprehensive chromosome screening versus nonpreimplantation genetic testing in normal karyotype, secondary infertility patients with recurrent pregnancy loss. Original Article. October 1, 2019 2019;3(4):205-212. doi:10.4103/2096-2924.274544
34. Elghezal H, Hidar S, Mougou S, Khairi H, Saâd A. Prevalence of chromosomal abnormalities in couples with recurrent miscarriage. *Fertility and sterility*. Sep 2007;88(3):721-3. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.11.160
35. Pal AK, Ambulkar PS, Waghmare JE, Wankhede V, Shende MR, Tarnekar AM. Chromosomal Aberrations in Couples with Pregnancy Loss: A Retrospective Study. *J Hum Reprod Sci*. Jul-Sep 2018;11(3):247-253. doi:10.4103/jhrs.JHRS_124_17
36. De Sutter P, Stadhouders R, Dutré M, Gerris J, Dhont M. Prevalence of chromosomal abnormalities and timing of karyotype analysis in patients with recurrent implantation failure (RIF) following assisted reproduction. *Facts Views Vis Obgyn*. 2012;4(1):59-65.
37. Blockeel C, Schutyser V, De Vos A, et al. Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reproductive biomedicine online*. Dec 2008;17(6):848-54. doi:10.1016/s1472-6483(10)60414-2
38. Poornima S, Daram S, Devaki RK, Qurratulain H. Chromosomal Abnormalities in Couples with Primary and Secondary Infertility: Genetic Counseling for Assisted Reproductive Techniques (ART). *J Reprod Infertil*. Oct-Dec 2020;21(4):269-274. doi:10.18502 /jri.v21i4 .4331

39. Shi Q, Ko E, Barclay L, Hoang T, Rademaker A, Martin R. Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. *Molecular reproduction and development*. Aug 2001;59(4):417-21. doi:10.1002/mrd.1048
40. Fasolino M, Ferraretti A, Farfalli V, et al. *Oral Incidence of oocyte aneuploidy by first polar body FISH analysis in relation to the type of GnRH analogue*. 2007:182-182.
41. Mansour G, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. Endometriosis-induced alterations in mouse metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: a possible cause of infertility. *Fertility and sterility*. Oct 2010;94(5):1894-9. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.09.043
42. Rubio C, Simón C, Vidal F, et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Human reproduction (Oxford, England)*. Jan 2003;18(1):182-8. doi:10.1093/humrep/deg015
43. Munne S, Sandalinas M, Magli C, Gianaroli L, Cohen J, Warburton D. Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenatal diagnosis*. Aug 2004;24(8):638-43. doi:10.1002/pd.957
44. Weghofer A, Munne S, Brannath W, et al. The impact of LH-containing gonadotropins on diploidy rates in preimplantation embryos: long protocol stimulation. *Human reproduction (Oxford, England)*. Mar 2008;23(3):499-503. doi:10.1093/humrep/dem412
45. Fragouli E, Escalona A, Gutierrez-Mateo C, et al. Comparative genomic hybridization of oocytes and first polar bodies from young donors. *Reproductive biomedicine online*. Aug 2009;19(2):228-37.

46. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertility and sterility*. Feb 2001;75(2):237-48.
47. Adams C, Anderson L, Wood S. 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*. 2007;87(4):S7. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.01.155
48. De Sutter P, Dhont M. Poor response after hormonal stimulation for in vitro fertilization is not related to ovarian aging. *Fertility and sterility*. Jun 2003;79(6):1294-8.
49. Reis Soares S, Rubio C, Rodrigo L, Simon C, Remohi J, Pellicer A. High frequency of chromosomal abnormalities in embryos obtained from oocyte donation cycles. *Fertility and sterility*. Sep 2003;80(3):656-7.
50. Kline J, Kinney A, Levin B, Warburton D. Trisomic pregnancy and earlier age at menopause. *American journal of human genetics*. Aug 2000;67(2):395-404. doi:10.1086/303009
51. Wang WH, Kaskar K, Gill J, DeSplinter T. A simplified technique for embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Fertility and sterility*. Aug 2008;90(2):438-42. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.06.093
52. Fiorentino F, Bono S, Biricik A, et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Human reproduction (Oxford, England)*. Dec 2014;29(12):2802-13. doi:10.1093/humrep/deu277
53. Kong GWS, Ma Y, Ou J, et al. Validation of a high-throughput and robust technique: BACs-on-beads assay (KaryoLite BoBs) for pre-implantation aneuploidy screening. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*. Aug 2017;56(4):514-520. doi:10.1016/j.tjog.2017.01.011

54. Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Human reproduction update*. Jul-Aug 2011;17(4):454-66. doi:10.1093/humupd/dmr003
55. Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, et al. Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertility and sterility*. Apr 2013;99(5):1400-7. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.11.041
56. Harper J, Coonen E, De Rycke M, et al. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Human reproduction (Oxford, England)*. Apr 2010;25(4):821-3. doi:10.1093/humrep/dep476
57. Zhang C, Cerveira E, Romanovitch M, Zhu Q. Array-Based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2017;1541:167-179. doi:10.1007/978-1-4939-6703-2_15
58. Yang Z, Liu J, Collins GS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Molecular cytogenetics*. May 2 2012;5(1):24. doi:10.1186/1755-8166-5-24
59. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertility and sterility*. 02/01 2011;95:520-4. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.04.003
60. Rubio C, Rodrigo L, Mir P, et al. Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertility and sterility*. Mar 15 2013;99(4):1044-8. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.094

61. Tyson C, Harvard C, Locker R, et al. Submicroscopic deletions and duplications in individuals with intellectual disability detected by array-CGH. *American journal of medical genetics Part A*. Dec 15 2005;139(3):173-85. doi:10.1002/ajmg.a.31015
62. Brezina PR, Kutteh WH. Clinical applications of preimplantation genetic testing. *BMJ (Clin Res Ed)*. 2015;350
63. Yin X, Tan K, Vajta G, et al. Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophectoderm cells of human blastocysts. *Biology of reproduction*. Mar 2013;88(3):69. doi:10.1095/biolreprod.112.106211
64. Fiorentino F, Biricik A, Bono S, et al. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertility and sterility*. May 2014;101(5):1375-82. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.01.051
65. Yang Z, Lin J, Zhang J, et al. Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: a pilot study. *BMC medical genomics*. Jun 23 2015;8:30. doi:10.1186/s12920-015-0110-4
66. Friedenthal J, Maxwell SM, Munne S, et al. Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles. *Fertility and sterility*. Apr 2018;109(4):627-632. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.12.017
67. Coates A, Kung A, Mounts E, et al. Optimal euploid embryo transfer strategy, fresh versus frozen, after preimplantation genetic screening with next generation sequencing: a randomized controlled trial. *Fertility and sterility*. Mar 2017;107(3):723-730.e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.12.022

68. Liss J, Pastuszek E, Puksza S, et al. Effect of next-generation sequencing in preimplantation genetic testing on live birth ratio. *Reproduction, Fertility and Development*. 06/22 2018;30doi: 10.1071/RD17428
69. Treff NR, Fedick A, Tao X, Devkota B, Taylor D, Scott RT, Jr. Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertility and sterility*. Apr 2013;99(5):1377-1384.e6. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.12.018
70. Fragouli E, Wells D. Aneuploidy in the human blastocyst. *Cytogenetic and genome research*. 2011;133(2-4):149-59. doi:10.1159/000323500
71. How to Prepare the Egg and Embryo to Maximize IVF Success. In: Rutherford A, Gardner DK, Kovacs G, eds. *How to Prepare the Egg and Embryo to Maximize IVF Success*. Cambridge University Press; 2019:i-ii.
72. Schoolcraft WB, Treff NR, Stevens JM, Ferry K, Katz-Jaffe M, Scott RT, Jr. Live birth outcome with trophoctoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients. *Fertility and sterility*. Sep 2011;96(3):638-40. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.06.049
73. Hoàng Văn Minh. *Phương pháp nghiên cứu khoa học y học thống kê ứng dụng và phân tích số liệu*. 2014.
74. Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertility and sterility*. Oct 2003;80(4):860-8. doi:10.1016/s0015-0282(03)01162-2

75. Capalbo A, NR T, D C, al e. Comparison of array comparative genomic hybridization and quantitative real-time PCR-based aneuploidy screening of blastocyst biopsies. *Eur J Hum Genet.* 2015;23:901-906.
76. Treff NR, X T, KM F, J S, D T, Jr SR. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening. 2012;
77. Ekimov AN, E.V E, A.N A, D.Yu T. In: Abstr. 13th Annual Meeting of the Preimplantation Genetic Diagnosis Int. Soc. (PGDIS), Canterbury, UK. *Chromosome Res.* 2014;22(4)
78. Treff NR, B L, J S, LE N, Tao X, Jr SR. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening is significantly more consistent than FISH. *Mol Hum Reprod.* 2010;16:583-589.
79. Treff NR, J S, X T, B L, Jr SR. Accurate single cell 24 chromosome aneuploidy screening using whole genome amplification and single nucleotide polymorphism microarrays. *Fertility and Sterily* 2010;94:2017-2021.
80. Scott RTJ, K F, J S, X T, Scott K, NR T. Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective, blinded, nonselection study. *Fertility and Sterily.* 2012;97:870-875.
81. Liu M, Su Y, Wang W-H. Assessment of clinical application of preimplantation genetic screening on cryopreserved human blastocysts. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2016/04/08 2016;14(1):16. doi:10.1186/s12958-016-0155-z
82. Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft W, Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Human reproduction.* 2008;23(11):2596-2608.

83. Gutiérrez-Mateo C, Colls P, Sánchez-García J, et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertility and sterility*. 2011;95(3):953-958.
84. Traversa MV, Marshall J, McArthur S, Leigh D. The genetic screening of preimplantation embryos by comparative genomic hybridisation. *Reprod Biol*. 2011;11(Suppl 3):51-60.
85. Lathi RB, Gustin SL, Keller J, et al. Reliability of 46,XX results on miscarriage specimens: a review of 1,222 first-trimester miscarriage specimens. *Fertility and sterility*. Jan 2014;101(1):178-82. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.09.031
86. Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S, et al. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertility and sterility*. Sep 2012;98(3):675-80. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.05.025
87. Demko ZP, Simon AL, McCoy RC, Petrov DA, Rabinowitz M. Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism-based preimplantation genetic screening. *Fertility and sterility*. May 2016;105(5):1307-1313. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.01.025
88. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Lappi M, Borghi E, Ermini B. Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. *Human reproduction (Oxford, England)*. Jan 2007;22(1):241-9. doi:10.1093/humrep/del334
89. Kotdawala A, Patel D, Herrero J, Khajuria R, Mahajan N, Banker M. Aneuploidy screening by array comparative genomic hybridization improves success rates of in vitro fertilization: A multicenter Indian study. *J Hum Reprod Sci*. Oct-Dec 2016;9(4):223-229. doi:10.4103/0974-1208.197630

90. Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Márquez C, Cohen J. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reproductive biomedicine online*. 2002;4(3):223-232.
91. Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Human reproduction (Oxford, England)*. Dec 2006;21(12):3036-43. doi:10.1093/humrep/del305
92. Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, et al. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reproductive biomedicine online*. Mar 2003;6(2):232-7. doi:10.1016/s1472-6483(10)61715-4
93. Sato T, Sugiura-Ogasawara M, Ozawa F, et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: a comparison of live birth rates in patients with recurrent pregnancy loss due to embryonic aneuploidy or recurrent implantation failure. *Human reproduction (Oxford, England)*. Dec 1 2019;34(12):2340-2348. doi:10.1093/humrep/dez229
94. Voullaire L, Collins V, Callaghan T, McBain J, Williamson R, Wilton L. High incidence of complex chromosome abnormality in cleavage embryos from patients with repeated implantation failure. *Fertility and sterility*. 2007/05/01/ 2007;87(5):1053-1058. doi:https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.11.043
95. van den Boogaard E, Kaandorp SP, Franssen MT, et al. Consecutive or non-consecutive recurrent miscarriage: is there any difference in carrier status? *Human reproduction (Oxford, England)*. Jun 2010;25(6):1411-4. doi:10.1093/humrep/deq089
96. Lee E, Illingworth P, Wilton L, Chambers GM. The clinical effectiveness of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in all 24 chromosomes (PGD-A): systematic review. *Human reproduction (Oxford, England)*. Feb 2015;30(2):473-83. doi:10.1093/humrep/deu303

97. Liu Y, Kong X-d, Wu Q-h, Li G, Song L, Sun Y-P. Karyotype analysis in large-sample infertile couples living in Central China: a study of 14965 couples. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2013;30(4):547-553. doi:10.1007/s10815-013-9964-6
98. Trần Thùy Anh. *Nghiên cứu một số yếu tố tiên lượng đáp ứng của buồng trứng trong thụ tinh ống nghiệm*. Đại học Y Hà Nội; 2017.
99. Veleva Z, Orava M, Nuojua-Huttunen S, Tapanainen JS, Martikainen H. Factors affecting the outcome of frozen-thawed embryo transfer. *Human reproduction (Oxford, England)*. Sep 2013;28(9):2425-31. doi:10.1093/humrep/det251
100. La Marca A, Grisendi V, Giulini S, et al. Individualization of the FSH starting dose in IVF/ICSI cycles using the antral follicle count. *Journal of ovarian research*. Feb 6 2013;6(1):11. doi:10.1186/1757-2215-6-11
101. Vương Thị Ngọc Lan. *Giá trị các xét nghiệm AMH, FSH và AFC dự đoán đáp ứng buồng trứng trong thụ tinh ống nghiệm*. Đại học y dược thành phố Hồ Chí Minh; 2016.
102. Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, et al. Dynamic assays of inhibin B, anti-Mullerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Human reproduction (Oxford, England)*. Nov 2005;20(11):3178-83. doi:10.1093/humrep/dei203
103. Kdous M, Merdassi G, Zhioua F, Elloumi H, Kacem K, Zhioua A. Basal follicle stimulating hormone level correlated to age is a good prognostic criterion for the outcome of intracytoplasmic sperm microinjection. *La Tunisie medicale*. Mar 2016;94(3):181-5.
104. Fişicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertility and sterility*. Mar 2006;85(3):592-6. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.09.019

105. Lee TH, Liu CH, Huang CC, Hsieh KC, Lin PM, Lee MS. Impact of female age and male infertility on ovarian reserve markers to predict outcome of assisted reproduction technology cycles. *Reprod Biol Endocrinol*. Sep 17 2009;7:100. doi:10.1186/1477-7827-7-100
106. Arce JC, La Marca A, Mirner Klein B, Nyboe Andersen A, Fleming R. Antimüllerian hormone in gonadotropin releasing-hormone antagonist cycles: prediction of ovarian response and cumulative treatment outcome in good-prognosis patients. *Fertility and sterility*. May 2013;99(6):1644-53. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.12.048
107. Broer SL, van Disseldorp J, Broeze KA, et al. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. *Human reproduction update*. Jan-Feb 2013;19(1):26-36. doi:10.1093/humupd/dms041
108. Hoàng Minh Ngân, Nguyễn Trung Nam, Triệu Tiên Sang. Đánh giá mối liên quan giữa hình thái phôi nang với bất thường nhiễm sắc thể. *Khoa học và công nghệ*. 2020;62(9):15-18.
109. Majumdar G, Majumdar A, Verma IC, Upadhyaya KC. Relationship Between Morphology, Euploidy and Implantation Potential of Cleavage and Blastocyst Stage Embryos. *J Hum Reprod Sci*. Jan-Mar 2017;10(1):49-57. doi:10.4103/0974-1208.204013
110. Zhao Y-Y, Yu Y, Zhang X-W. Overall Blastocyst Quality, Trophectoderm Grade, and Inner Cell Mass Grade Predict Pregnancy Outcome in Euploid Blastocyst Transfer Cycles. *Chinese Medical Journal*. 06/05 2018;131:1261. doi:10.4103/0366-6999.232808

111. Fang R, Cai L, Xiong F, Chen J, Yang W, Zhao X. The effect of endometrial thickness on the day of hCG administration on pregnancy outcome in the first fresh IVF/ICSI cycle. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. Jun 2016;32(6):473-6. doi:10.3109/09513590.2015.1132304
112. Kupka MS, D'Hooghe T, Ferraretti AP, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE. *Human reproduction (Oxford, England)*. Feb 2016;31(2):233-48. doi:10.1093/humrep/dev319
113. Lee GH, Song HJ, Lee KS, Choi YM. Current status of assisted reproductive technology in Korea, 2010. *Clin Exp Reprod Med*. 2015;42(1):8-13. doi:10.5653/cerm.2015.42.1.8
114. Rubio C, Rodrigo L, Mercader A, et al. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenatal diagnosis*. Aug 2007;27(8):748-56. doi:10.1002/pd.1773
115. Dahdouh EM, Balayla J, Audibert F, et al. Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC*. May 2015;37(5):451-63. doi:10.1016/s1701-2163(15)30261-9
116. Brezina P, Barker A, Benner A, et al. Genetic Normalization of Differentiating Aneuploid Human Embryos. *Nature Precedings*. 2011/06/23 2011;doi:10.1038/npre.2011.6045.1
117. Brezina PR, Kutteh WH, Bailey AP, Ke RW. Preimplantation genetic screening (PGS) is an excellent tool, but not perfect: a guide to counseling patients considering PGS. *Fertility and sterility*. Jan 2016;105(1):49-50. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.09.042

118. Capalbo A, Wright G, Elliott T, Ubaldi FM, Rienzi L, Nagy ZP. 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 (Oxford, England)*. Aug 2013;28(8):2298-307. doi:10.1093/humrep/det245
119. Scott RT, Jr., Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertility and sterility*. Sep 2013;100(3):624-30. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.039
120. Scott RT, Jr., Upham KM, Forman EJ, et al. 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*. Sep 2013;100(3):697-703. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.035
121. Wong KM, Repping S, Mastenbroek S. Limitations of embryo selection methods. *Seminars in reproductive medicine*. Mar 2014;32(2):127-33. doi:10.1055/s-0033-1363554
122. Goodrich D, Tao X, Bohrer C, et al. A randomized and blinded comparison of qPCR and NGS-based detection of aneuploidy in a cell line mixture model of blastocyst biopsy mosaicism. *Journal of assisted reproduction and genetics*. Nov 2016;33(11):1473-1480. doi:10.1007/s10815-016-0784-3
123. Munné S, Blazek J, Large M, et al. Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertility and sterility*. Jul 2017;108(1):62-71.e8. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.05.002

124. Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, et al. Analysis of implantation and ongoing pregnancy rates following the transfer of mosaic diploid-aneuploid blastocysts. *Human genetics*. Jul 2017;136(7):805-819. doi:10.1007/s00439-017-1797-4
125. Maxwell SM, Colls P, Hodes-Wertz B, et al. Why do euploid embryos miscarry? A case-control study comparing the rate of aneuploidy within presumed euploid embryos that resulted in miscarriage or live birth using next-generation sequencing. *Fertility and sterility*. Nov 2016; 106(6): 1414-1419.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.08.017

PHỤ LỤC 1: PHƯƠNG TIỆN VÀ VẬT LIỆU SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu

- Vật tư, hóa chất, thuốc cho qui trình thụ tinh trong ống nghiệm.
- Vật tư, hóa chất cho phân tích di truyền.

Bảng 1. Hóa chất sinh học phân tử chính sử dụng trong nghiên cứu

STT	Hóa chất	Nhà sản xuất
1	SurePlex DNA Amplification System	Illumina
2	VeriSeq PGS Library Preparation Kit	Illumina
3	VeriSeq Index Kit	Illumina
4	MiSeq Reagent Kit – PGS	Illumina
5	Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
6	Phosphate buffer solution	Cell Signalling
7	Sodium hypochlorite	Sigma
8	PCR grade water	1st Base
9	Female/Male human genomic DNA	Promega
10	TBE buffer 10X	Serva
11	Agarose gel loading dye 6x	Intron
12	50bp DNA ladder	Norgen
13	RedSafe Nucleic Acid staining solution	Intron
14	Ethanol	Merck
15	Sodium hydroxide solution 1N	Scharlau

Thiết bị nghiên cứu

- Thiết bị phục vụ cho qui trình thụ tinh ống nghiệm.
- Thiết bị phục vụ cho phân tích di truyền.

Bảng 2. Thiết bị sinh học phân tử chính sử dụng trong nghiên cứu

TT	Thiết bị	Nhà sản xuất
1	ProFlex™3x32-well PCR system	Thermo Fisher Scientific
2	Next – Generation Sequencing System – MiSeq	Illumina
3	Qubit 2.0 Fluorometric Quantitation	Life Technologies
4	Centrifuge 5430R	Eppendorf
5	Bộ điện di NANOPAC 300P	Cleaver
6	Mini Centrifuge M-6	Boeco
7	cân điện tử Practum	Sartorius
8	Máy lắc MS3 basic	IKA
9	Một số thiết bị cơ bản của phòng thí nghiệm: pipet, giá từ, giá để eppendorf,...	

PHỤ LỤC 2: GIẢI TRÌNH TỰ GEN THỂ HỆ MỚI

- *Khuếch đại toàn bộ hệ gen:* Các mẫu phôi bào sau khi được sinh thiết từ phôi nang, trải qua quá trình rửa phôi sẽ được thực hiện bước khuếch đại toàn bộ hệ gen sử dụng bộ kit SurePlex DNA Amplification System của hãng Illumina. Đối với mỗi qui trình rửa phôi, sẽ lấy kèm tối thiểu 1 ống thể tích 2,5 μ l dung dịch môi trường của giọt rửa cuối cùng trong quá trình rửa phôi, kí hiệu CC. Qui trình khuếch đại gồm các bước sau:

Chuẩn bị 1 mẫu chứng âm với thể tích 2,5 μ l dung dịch Phosphate-buffered saline (PBS) 1X cho vào ống PCR 0.2 ml kí hiệu Neg; 1 mẫu chứng dương với thể tích 2,5 μ l mẫu chuẩn female genomic DNA nồng độ 25 pg/ μ l kí hiệu POS. Tiến hành ly tâm các ống chứa phôi bào ở 200 g trong 3 phút ở nhiệt độ 4°C, rồi bổ sung 2,5 μ l cell extraction buffer vào các ống chứa mẫu phôi bào và các ống mẫu chứng. Chuẩn bị Extraction cocktail gồm 4,8 ul Extraction enzyme dilution buffer và 0,2 μ l Cell extraction enzyme, rồi thêm 5 μ l Extraction cocktail vào các ống chứa mẫu và control, sau đó ly tâm nhanh rồi đưa vào ủ theo chu trình nhiệt trong máy PCR ở 75°C trong vòng 10 phút và 95°C trong vòng 4 phút, giữ ở nhiệt độ phòng sau khi hoàn thành.

Các ống mẫu sau khi hoàn thành chu trình nhiệt trong máy PCR được lấy ra, ly tâm nhanh và đặt lên các giá lạnh và chuẩn bị các bước tiếp theo.

Chuẩn bị mỗi 5 μ l Pre-amp cocktail gồm 4,8 μ l SurePlex Pre-amp buffer và 0,2 μ l SurePlex Pre-amp enzyme. Sau đó bổ sung 5 μ l Pre-amp Cocktail này các ống chứa 10 μ l mẫu đã chuẩn bị ở bước ly giải tế bào và ly tâm nhanh. Chuyển các ống mẫu vào máy PCR để thực hiện chu trình nhiệt 95°C trong vòng 2 phút; 12 chu kì 95 °C trong 15 giây, 15 °C trong 50 giây, 25 °C trong 40 giây, 35 °C trong 30 giây, 65 °C trong 40 giây và 75 °C trong 40 giây. Sau đó giữ ở 4 °C trong máy PCR.

Sản phẩm PCR được giữ trên khay lạnh trong lúc chuẩn bị. Chuẩn bị Amplification cocktail gồm 25,8 μ l SurePlex Pre-amp buffer, 34,2 μ l SurePlex

Pre-amp enzyme và nước đủ 60 μ l. Cho 60 μ l Amplification vừa chuẩn bị ở bước trên vào 15 μ l sản phẩm của bước phản ứng tiền PCR. Đậy nắp và đảo ngược vài lần để trộn đều sau đó ly tâm nhanh. Ủ các ống mẫu theo chu trình nhiệt sau: 95 °C trong 2 phút; 14 chu kì 95 °C trong 15 giây, 65 °C trong 1 phút và 75 °C trong 1 phút.

Sản phẩm của phản ứng PCR được bảo quản trên đá lạnh và sử dụng ngay trong qui trình chuẩn bị thư viện hoặc bảo quản ở nhiệt độ từ -25°C đến -15°C.

+ *Điện di gel agarose.*

Trộn sản phẩm PCR với loading dye và tra vào từng giếng; Tra 7 μ l marker vào giếng. Vị trí và số lượng giếng marker có thể thay đổi tùy vào số giếng điện di; Đóng nắp bể điện di, nối 2 cực bể điện di tương ứng với 2 đầu điện ở bộ cấp điện; Điều chỉnh hiệu điện thế, cường độ dòng điện và thời gian điện di, bật máy; Sau khi điện di xong; Đưa bản gel có chứa DNA đã được điện di vào trong máy chụp gel, chụp gel và chuyển kết quả vào máy tính tổng hợp kết quả.

+ *Kiểm tra nồng độ ADN sau quá trình khuếch đại toàn bộ hệ gen bằng Qbit*

Nồng độ của sản phẩm khuếch đại hệ gen được tính bằng cách đo nồng độ của mẫu sản phẩm pha loãng sau đó nhân hệ số để có nồng độ gốc. Các sản phẩm bước WGA được pha loãng tỷ lệ 1:10 trước khi tiến hành đo. Chuẩn bị dung dịch Qubit working solution theo tỷ lệ: 1 μ l reagent (dye): 100 μ l Buffer. Bổ sung 190 μ l dung dịch Qubit working solution vào các ống 0,5ml mới đã chuẩn bị trước đó. Tiếp tục thêm 10 μ l chất chuẩn 1 và 2 vào hai ống 0,5 ml đã chứa 190 μ l dung dịch Qubit working solution. Các ống còn lại được bổ sung thêm 10 μ l các mẫu đã pha loãng tương ứng. Trộn đều các ống bằng vortex và ly tâm nhanh. Chuẩn máy đo Qubit sử dụng 2 ống chất chuẩn vừa chuẩn bị và đo các mẫu rồi ghi lại nồng độ các mẫu.

+ Chuẩn bị thư viện cho quá trình giải trình tự trên hệ thống NGS

Sản phẩm của quá trình WGA được đưa về nồng độ 0,2 ng/ μ l trước khi tiến hành bước chuẩn bị thư viện. Chuẩn bị một đĩa PCR mới, đánh dấu VTA (Veriseq Tagment Amplicon Plate). Thêm 10 μ l Tagment DNA Buffer vào mỗi giếng trên đĩa PCR sau đó bổ sung 5 μ l Amplicon Tagment Mix vào các giếng đã chứa Tagment DNA Buffer. Cuối cùng cho 5 μ l mẫu ADN nồng độ 0,2 ng/ μ l (trong 1ng ADN tổng số) vào các giếng tương ứng trên đĩa VTA; hút nhả pipet 5 lần để mix đều hoặc đập nắp rồi vortex. Ly tâm ở 280 g ở nhiệt độ phòng trong 1 phút và chuyển đĩa VTA lên máy PCR theo chu trình nhiệt: 55 °C trong 5 phút và giữ ở 10 °C.

Khi kết thúc bước ủ, lấy VTA ra khỏi máy PCR, đem ly tâm và tiến hành bước tiếp theo. Ngay lập tức thêm 5 μ l NT buffer vào mỗi giếng trên đĩa VTA ngay khi quá trình ủ kết thúc. Sử dụng pipet hút nhả 5 lần để trộn đều hoặc sử dụng máy vortex sau đó ly tâm nhanh ở 280 g trong 1 phút và để ủ ở nhiệt độ thường trong 5 phút. Thêm 5 μ l mỗi Index 1 primer (i7) - nắp cam vào mỗi hàng của VTA và 5 μ l mỗi Index 2 primer (i5) - nắp trắng vào các cột của VTA. Bổ sung 15 μ l Nextera PCR Master Mix vào mỗi giếng, hút nhả pipet 5 lần để trộn đều hoặc dùng máy vortex nhanh. Ly tâm đĩa ở tốc độ 280 g trong 1 phút ở nhiệt độ thường sau đó chuyển vào ủ trên máy PCR theo chu trình nhiệt dưới đây: 75 °C trong 3 phút, 95 °C trong 30 giây; 12 chu kì 95°C trong 10 giây, 55 °C trong 30 giây, 72 °C trong 30 giây; 72 °C trong 5 phút và giữ ở 4 °C.

Trong lúc đợi sản phẩm PCR, trộn đều dung dịch AMPure XP bead bằng máy vortex, sau đó thêm 45 μ l Bead vào các giếng của plate mới chuẩn bị. Sau khi hoàn thành chu trình nhiệt, chuyển 45 μ l sản phẩm PCR từ VTA sang đĩa đã chứa AMPure Bead. Lắc ở tốc độ 1800 rpm trong 2 phút sau đó ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ly tâm nhanh ở 280 g trong 1 phút và đặt lên giá từ trong vòng 2 phút. Dùng pipet loại bỏ dịch trong các giếng rồi thêm 200 μ l còn 80% vào các giếng. Để ủ 30 giây sau đó dùng pipet loại bỏ còn trong các

giếng. Lặp lại 1 lần bước rửa bằng cồn trên rồi giữ nguyên đĩa trên giá từ và để khô các hạt từ trong vòng 15 phút. Nhấc đĩa ra khỏi giá từ, thêm 50 μ l Resuspension buffer vào các giếng. Lắc ở tốc độ 1800 rpm trong 2 phút rồi ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ly tâm nhanh đĩa mẫu ở 280 g trong 1 phút và đặt lên giá từ trong vòng 2 phút. Chuyển 45 μ l dung dịch trong các giếng sang một đĩa mới chuẩn bị.

Chuẩn bị hỗn hợp dung dịch LNB1 (Library Normalization beads 1)/LNA1 (Library Normalization Additives 1):

Cho 24 mẫu: Sử dụng 1,1 ml LNA1 và 200 μ l LNB1 (đảm bảo rằng đã được trộn đều).

Cho 12 mẫu: Sử dụng 550 μ l LNA1 và 100 μ l LNB1 (đảm bảo rằng đã được trộn đều).

Chuyển 45 μ l dung dịch LNA1/LNB1 vào mỗi giếng trên đĩa mới, kí hiệu LNP. Thêm 20 μ l sản phẩm PCR đã tinh sạch vào các giếng đã chứa LNA1/LNB1 trên LNP. Đậy nắp đĩa và lắc ở 1800 rpm trong 30 phút rồi chuyển đĩa lên trên giá từ trong 2 phút. Sau đó loại bỏ dịch nổi trong các giếng, nhấc plate ra khỏi giá từ và tiến hành bước rửa với LNW 1 (Library Normalization Wash 1):

+ Thêm 45 μ l LNW1 vào mỗi giếng đã chứa mẫu. Chú ý đổi đầu côn giữa các mẫu để tránh nhiễm chéo.

+ Đậy nắp và lắc ở 1800 rpm trong 5 phút. Sau đó ly tâm nhanh ở 280 g

+ Đặt đĩa lên trên giá từ trong 2 phút. Loại bỏ dịch nổi trong các giếng

Nhấc đĩa ra khỏi giá từ ngay sau khi lặp lại bước rửa trên thêm 1 lần. Thêm 30 μ l NaOH 0,1 N vào các giếng rồi đóng nắp giá và lắc ở 1800 rpm trong 5 phút. Sau đó ly tâm nhanh ở 280 g rồi ngay lập tức đặt đĩa lên trên giá từ trong 2 phút. Trong lúc ủ, chuẩn bị một plate mới; và thêm 25 μ l LNS1 (Library Normalization Storage Buffer 1) vào các giếng. Chuyển 25 μ l

dịch nổi từ giếng trên LNP sang đĩa mới đã chứa LNS1. Trộn đều và ly tâm ở 280 g trong 1 phút.

+ *Giải trình tự*

Chuyển 5 µl từng mẫu ở các giếng vào 1 ống eppendorf 1.5 ml mới kí hiệu POOL. Chuyển 15 µl thư viện ADN từ ống POOL sang một ống PCR mới. Thêm 85 µl HT1 vào ống PCR đã chứa 15 µl thư viện ADN, trộn đều sau đó ly tâm nhanh. Chuyển ống ADN/HT1 trên vào ủ trên máy PCR ở 96 °C trong 3 phút, 4 °C trong 5 phút và giữ ở 4 °C.

Thêm 600 µl HT1 vào một ống Eppendorf 1.5 ml mới và bảo quản trên đá. Bổ sung 100 µl thư viện đã ủ vào ống eppendorf chứa 600 µl HT1 đã chuẩn bị. Sau đó chuyển toàn bộ 700 µl thư viện trên lên khay cartridge của bộ kit giải trình tự và đưa vào hệ thống Miseq bắt đầu tiến hành giải trình tự.

+ *Phương pháp phân tích dữ liệu giải trình tự và xác định rối loạn NST*

Trong suốt quá trình giải trình tự, phần mềm Real-time Analysis sẽ tạo ra các file dữ liệu bao gồm thông số được sử dụng cho phần mềm Miseq Reporter để phân tích thứ cấp. Cả hai phần mềm này đều được cài tích hợp sẵn trong hệ thống giải trình tự Miseq. Các chỉ số bao gồm: các cluster đạt tiêu chuẩn, chất lượng trình tự nucleotide đạt độ chính xác 99,999% (Q30), giá trị phasing và pre-phasing trong quá trình giải trình tự⁷².

Chúng tôi sử dụng phần mềm Miseq Reporter phiên bản 2.6 để phân tích dữ liệu giải trình tự thứ cấp. Quá trình này bao gồm: phân tách dữ liệu của các mẫu trong cùng 1 lần chạy thành các file dữ liệu riêng, chuyển dữ liệu dạng ảnh chụp thành file trình tự chữ có dạng FASTQ file, so sánh và căn chỉnh theo trình tự tham chiếu và gọi tên các nucleotide hoàn chỉnh và các đa hình nucleotide. Từ đó, đưa ra kết luận về phân tích nhiễm sắc thể của phôi.

PHỤ LỤC 3: SỬ DỤNG PHẦN MỀM MISEQ REPORTER

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng các chức năng của phần mềm Miseq Reporter như sau:

Phân tách dữ liệu (chức năng mặc định): Một lần chạy giải trình tự đối với qui trình PGT-A trên hệ thống Miseq có thể chạy tối đa 24 mẫu, do vậy sau khi giải trình tự xong, phần mềm sẽ phân tách các dữ liệu của các mẫu về các file riêng lẻ. Quá trình phân tách này có nguyên lý dựa trên việc sử dụng các trình tự nhãn đã được gắn vào các mẫu trong quá trình chuẩn bị thư viện.

Tạo file dữ liệu chữ dạng FASTQ (chức năng mặc định): file dữ liệu chữ này được tạo ra sau khi loại bỏ các đoạn trình tự nhãn ở các mẫu, các trình tự không đạt độ tin cậy và độ chính xác. Các dữ liệu được xuất ra đều phải đạt độ chính xác 99,999%.

So sánh và căn chỉnh theo trình tự tham chiếu (chức năng lựa chọn): Khi có trình tự tham chiếu được khai báo, phần mềm sẽ so sánh và đối chiếu các trình tự dạng file FASTQ trên với trình tự tham chiếu để căn chỉnh và đưa ra trình tự phù hợp nhất dưới dạng BAM file. Trình tự tham chiếu mà chúng tôi sử dụng là trình tự hệ gen người GRCh37 (hg19).

File dữ liệu BAM này được chuyển vào phần mềm BlueFuse Multi phiên bản 4.4 (cài trên máy tính) để tiến hành phân tích chuyên sâu. Đây là phần mềm được thiết kế và phát triển để dành riêng cho việc phân tích các kết quả PGT-A-NGS và kết quả lai array của hãng Illumina. Phần mềm có thể cài đặt ở dạng một người dùng hoặc dạng máy chủ. Đây là phần mềm kết hợp việc phân tích kết quả tự động và quản lý dữ liệu đầu vào. Hơn thế nữa, phần mềm còn có khả năng quản lý chất lượng mẫu đầu vào dựa trên các chỉ số đi kèm theo mẫu phân tích. Đặc biệt, phần mềm còn tích hợp để liên kết với các cơ sở dữ liệu về di truyền, y khoa như: Ensembl, UCSC (University of California Santa Cruz), OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man),

DGV (Database of Genomic Variants), Decipher. Từ đó giúp người dùng có thể liên kết các dữ liệu về rối loạn NST của mình tới các thông tin khoa học liên quan với nhau.

Đối với phần mềm này, chúng tôi cũng sử dụng một cơ sở dữ liệu tham chiếu là BG_Annotation_Ens71_20160909.db đây là kho cơ sở dữ liệu chứa thông tin về hệ gen của con người mới nhất (GRCh37). Dữ liệu chú thích này bao gồm vị trí của các gen, các vùng bệnh và các dữ liệu công khai về tần số các bản sao được bố trí dưới dạng các bin trình tự (1 bin tương ứng với khoảng 1 MB trên NST). Các đoạn đọc đã được lựa chọn (đạt tiêu chuẩn) ở các mẫu được ánh xạ vào khoảng tương ứng trên NST tương ứng với các bin. Đồng thời dữ liệu sẽ đếm số đoạn đọc ở mỗi vị trí bin và chuẩn hóa thông qua các vùng dữ liệu GC và so sánh với trình tự tham chiếu để tránh sai lệch thông tin. Số lượng bin được chuẩn hóa trong 1 lần trượt là 13 bin và số bản sao được tái hiện bằng cách giả định rằng số lượng đoạn đọc trung bình của các NST thường, tương ứng với 2 bản sao. Kết luận cuối cùng về số lượng bản sao của mỗi NST được xác định bằng cách sử dụng phân phối Gauss (số lượng bản sao từ 0 - 4 và độ lệch chuẩn là 0,33) và giá trị ngưỡng. Trạng thái số lượng NST có xác suất cao nhất sẽ được sử dụng. Phần mềm Bluefuse Multi tự động đọc kết quả hoặc người dùng có thể đọc và chỉ ra các bất thường về số lượng, cấu trúc NST đồng thời xuất ra báo cáo dưới nhiều dạng như: pdf, ảnh, text... Để đánh giá chất lượng dữ liệu sau phân tích, phần mềm đưa ra các chỉ số đánh giá cho từng mẫu: chất lượng giải trình tự, độ tin cậy khi gọi tên bất thường cho từng NST, độ nhiễu. Chúng tôi chỉ lựa chọn các dữ liệu đạt chất lượng dưới đây: Phải có tổng số trên 700 000 đoạn đọc, trong đó có trên 250 000 đoạn đọc được gắn sau khi lọc. Các dữ liệu này đều phải đạt tiêu chuẩn độ chính xác 99,999%. Độ nhiễu của mẫu phân tích phải nhỏ hơn 0.4 và độ tin cậy khi đọc cho từng vùng của NST là $> 0,7$.

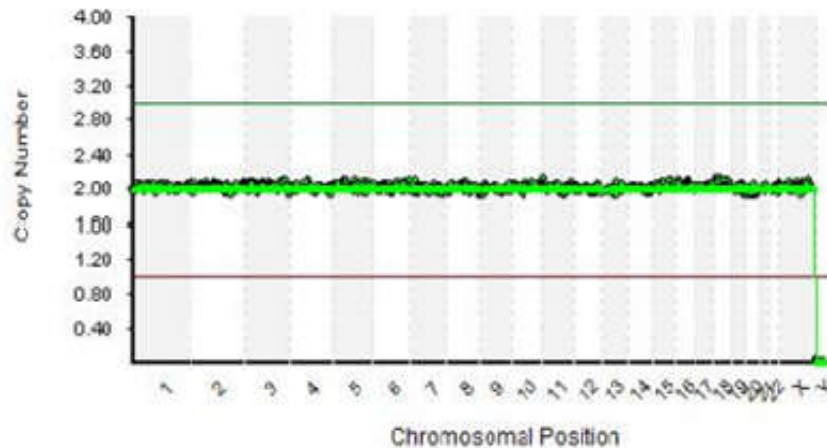
PHỤ LỤC 4: MỘT SỐ KẾT QUẢ GIẢI TRÌNH TỰ THỂ HỆ MỚI

1. Nhận định hình ảnh kết quả phân tích rối loạn NST

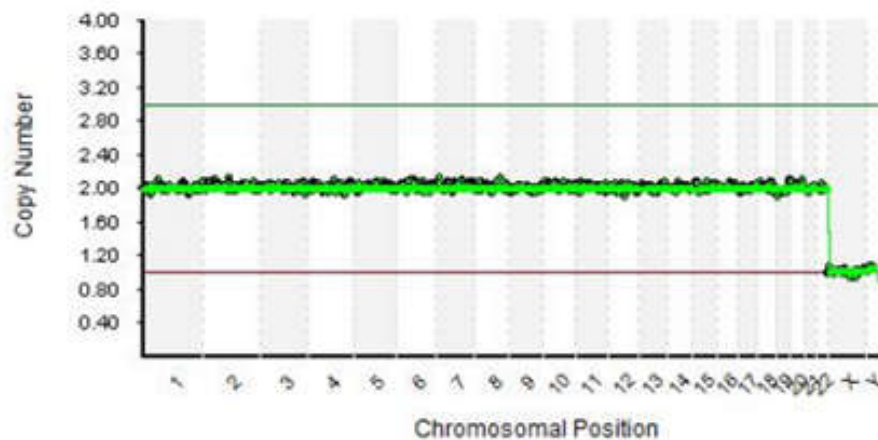
+ Thêm (một phần hoặc toàn bộ) một NST được định nghĩa là vị trí NST đó di chuyển lên trên mức 2,5 của trục tung (số bản copy).

+ Mất (một phần hoặc toàn bộ) một NST được định nghĩa là vị trí NST đó di chuyển xuống dưới mức 1,5 của trục tung (số bản copy).

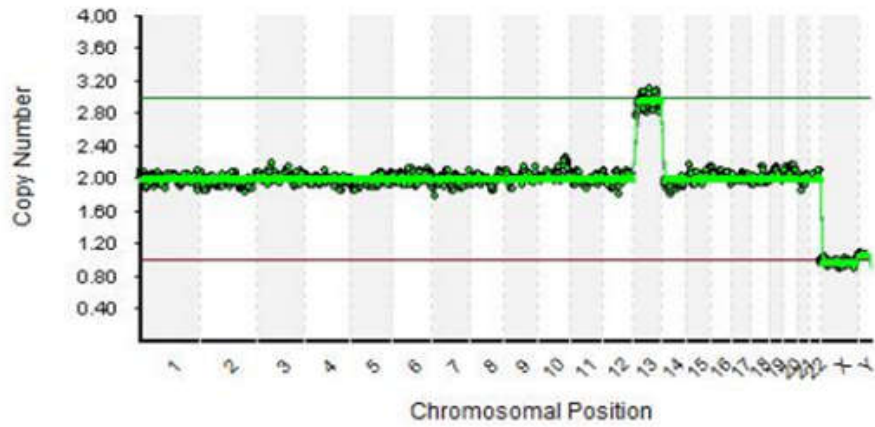
+ Khó nhận định khi vị trí NST đó nằm giữa khoảng 2 và 2,5 hoặc giữa 2 và 1,5 của trục tung.



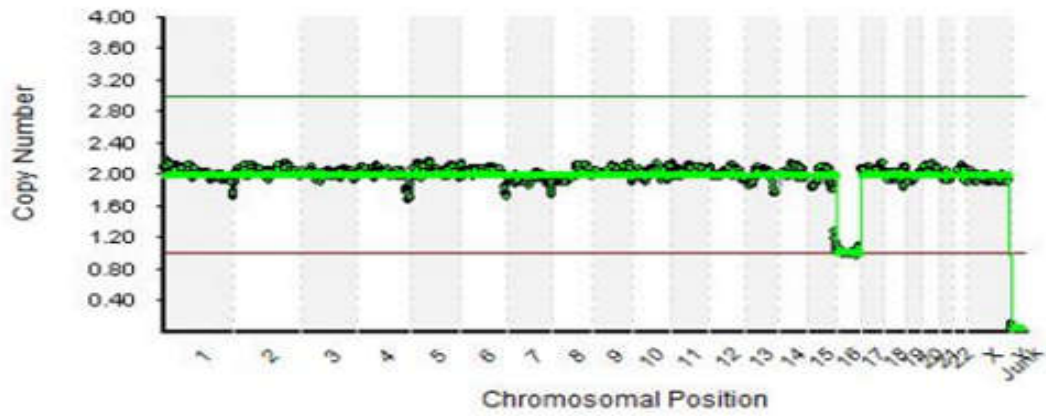
Hình 1. Hình ảnh của mẫu NST bình thường, giới tính nữ (46XX)



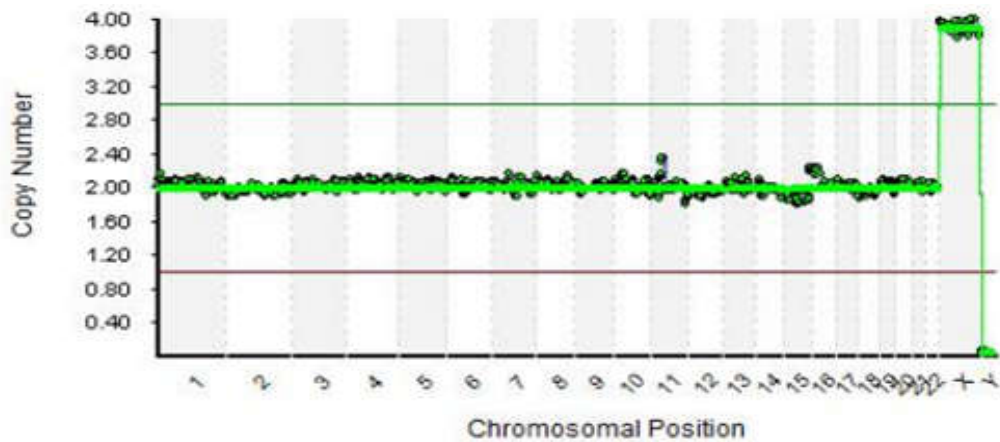
Hình 2. Hình ảnh của mẫu NST bình thường, giới tính nam (46XY)



Hình 3. Hình ảnh của mẫu có bộ NST 47XY, +13.



Hình.4. Hình ảnh của mẫu có bộ NST 45XX, -16



Hình 5. Hình ảnh của mẫu có bộ NST 48XXXX.