

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN THỊ SIM

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT
GIẢI TRÌNH TỰ GEN THỂ HỆ MỚI ĐỂ SÀNG LỌC
RỐI LOẠN 24 NHIỆM SẮC THỂ TRƯỚC LÀM TỔ**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN THỊ SIM

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT
GIẢI TRÌNH TỰ GEN THỂ HỆ MỚI ĐỂ SÀNG LỌC
RỐI LOẠN 24 NHIỄM SẮC THỂ TRƯỚC LÀM TỔ**

Chuyên ngành: Y sinh học - Di truyền

Mã số: 62720111

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Lương Thị Lan Anh
2. PGS.TS. Nguyễn Duy Bắc

HÀ NỘI - 2020

LỜI CẢM ƠN

Để thực hiện và hoàn thành đề tài nghiên cứu khoa học này, tôi đã nhận được sự hỗ trợ, giúp đỡ cũng như là quan tâm, động viên từ Nhà trường, Bệnh viện, các bộ môn, đặc biệt là các Thầy, Cô, bạn bè, đồng nghiệp và những người thân trong gia đình.

Trước hết, tôi xin bày tỏ sự biết ơn đặc biệt đến Phó giáo sư, Tiến sĩ Lương Thị Lan Anh và Phó giáo sư, Tiến sĩ Nguyễn Duy Bắc. Cô và Thầy đã trực tiếp hướng dẫn, tận tình dạy bảo tôi, đã luôn định hướng cho tôi, luôn dành nhiều thời gian và công sức đồng hành cùng tôi trong mọi chặng đường để tôi có thể hoàn thành luận án này.

Và tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến Phó giáo sư, Tiến sĩ Nguyễn Duy Ánh, Giám đốc Bệnh viện Phụ sản Hà Nội, người lãnh đạo, người Thầy đã khơi dậy, hình thành và nuôi dưỡng niềm đam mê nghiên cứu khoa học trong tôi, luôn giúp đỡ, tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian học tập.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo Sau đại học Trường Đại học Y Hà Nội cùng toàn thể các Thầy Cô trong hội đồng chấm đề cương, hội đồng chấm học phần, chuyên đề, tiểu luận tổng quan, hội đồng cơ sở đã luôn tạo điều kiện cho tôi. Những lời nhận xét, phản biện, đóng góp ý kiến quý báu của Thầy Cô đã giúp luận án này được hoàn thiện hơn. Đặc biệt, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới các Thầy Cô trong Bộ môn Y Sinh học - Di truyền trường Đại học Y Hà Nội và các Thầy cô trong Học viện Quân Y đã tận tình truyền đạt những kiến thức quý báu, giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn Đảng ủy, Ban giám đốc Bệnh viện Phụ sản Hà Nội, cùng toàn thể các phòng ban và các bạn đồng nghiệp trong Trung

tâm Sàng lọc, chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, đặc biệt là Tiến sĩ Nguyễn Mạnh Trí, phụ trách Trung tâm đã luôn hỗ trợ tôi trong thời gian học tập.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới tất cả các bệnh nhân đã tình nguyện tham gia nghiên cứu này.

Luận án này được viết trong niềm yêu thương, giúp đỡ và động viên các các thành viên trong gia đình tôi, đặc biệt là Bố Mẹ chồng, Chồng và các Con tôi, những người luôn chịu thiệt thòi, luôn hỗ trợ tôi và luôn cố vũ tinh thần cho tôi để vượt qua những khó khăn trong thời gian học tập.

Cuối cùng, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất đến Bố Mẹ tôi, người đã sinh thành và nuôi dưỡng, dạy bảo và tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi để tôi có được kết quả ngày hôm nay.

Tôi đã nỗ lực hết sức để hoàn thành luận án này và chắc chắn không tránh khỏi những thiếu sót. Tôi rất mong sẽ nhận được những ý kiến chỉ bảo quý báu của các Thầy Cô và đồng nghiệp để bản luận án được hoàn thiện hơn.

Tôi xin mãi ghi lòng tạc dạ những tình cảm và công ơn này!

Một lần nữa, tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà nội, ngày tháng năm 2020

Nguyễn Thị Sim

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Thị Sim, nghiên cứu sinh khóa 35, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Y sinh học di truyền, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của Cô Lương Thị Lan Anh và Thầy 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. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

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

Hà Nội, ngày tháng năm 2020

Người viết cam đoan

Nguyễn Thị Sim

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
aCGH	Array Comparative Genomic Hybridization	Lai so sánh hệ gen kết hợp microarray
ADO	Allele Drop-Out	Mất alen
bp	Base pair	Cặp bazơ
CGH	Comparative Genomic Hybridization	Lai so sánh hệ gen
CNV	Copy number variation	Biến thể số lượng bản sao
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid	
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization	Lai huỳnh quang tại chỗ
ICM	Inner Cell Mass	Nguyên bào phôi
ICSI	Intra Cytoplasmic Sperm Injection	Tiêm tinh trùng vào bào tương của noãn
IU	International Unit	Đơn vị quốc tế
IUI	Intra Uterine Insemination	Bơm tinh trùng vào buồng tử cung
IVF	In Vitro Fertilization	Thụ tinh trong ống nghiệm
KL-BoBs	BACs - on - Beads	Phương pháp KaryoLite BoBs
NST		Nhiễm sắc thể
NGS	Next Generation Sequencing	Giải trình tự gen thế hệ mới
PGD	Preimplantation genetic diagnosis	Chẩn đoán di truyền trước làm tổ
PGS	Preimplantation genetic screening	Sàng lọc di truyền trước làm tổ
PGT-A	Preimplantation genetic testing for Aneuploidies	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ phát hiện lệch bội nhiễm sắc thể
PGT-M	Preimplantation genetic testing for monogenic/single gene disorders	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ phát hiện rối loạn đơn gen

PGT-SR	Preimplantation genetic testing for chromosome structural rearrangements	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ phát hiện rối loạn cấu trúc nhiễm sắc thể
RNA	RiboNucleic Acid	
TE	Trophectoderm	Nguyên bào lá nuôi
WGA	Whole Genome Application	Khuếch đại hệ gen
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	3
1.1. Tình hình vô sinh trên thế giới và tại Việt Nam	3
1.1.1. Khái niệm vô sinh	3
1.1.2. Tình hình vô sinh trên Thế giới và Việt Nam.....	3
1.1.3. Điều trị vô sinh	4
1.2. Phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm (IVF)	5
1.2.1. Khái niệm.....	5
1.2.2. Chỉ định.....	5
1.2.3. Quy trình kỹ thuật IVF.....	6
1.2.3.1. Chuẩn bị noãn	6
1.2.3.2. Cho noãn thụ tinh với tinh trùng trong phòng thí nghiệm.....	6
1.2.3.3. Chọn lựa phôi	14
1.2.3.4. Chuyển phôi vào buồng tử cung và theo dõi kết quả	17
1.3. Các xét nghiệm di truyền trước làm tổ	18
1.3.1. PGT-A.....	18
1.3.2. PGT-SR.....	19
1.3.3. PGT-M	20
1.4. Kỹ thuật sinh thiết phôi.....	21
1.4.1. Quy trình sinh thiết phôi	21
1.4.2. Thời điểm sinh thiết phôi.....	22
1.5. Các kỹ thuật di truyền ứng dụng trong xét nghiệm di truyền trước làm tổ...	25
1.5.1. Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH)	25
1.5.2. Kỹ thuật lai so sánh hệ gen (CGH).....	26
1.5.3. Kỹ thuật lai so sánh hệ gen kết hợp microarray (aCGH)	27

1.5.3.1. Nguyên lý hoạt động.....	27
1.5.3.2. Quy trình hoạt động.....	29
1.5.3.3. Ứng dụng aCGH trong sàng lọc phôi.....	30
1.5.4. Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS).....	33
1.5.4.1. Khái niệm và nguyên lí hoạt động.....	33
1.5.4.2. Quy trình hoạt động kỹ thuật NGS.....	34
1.6. Tình hình ứng dụng kỹ thuật NGS trong PGT trên thế giới và Việt Nam	35
1.7. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể của noãn và phôi.....	39
1.7.1. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở noãn.....	39
1.7.2. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở tiền nhân.....	39
1.7.3. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi ngày 3.....	40
1.7.4. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi nang.....	41
1.7.5. Tỷ lệ phôi thể khảm.....	42
1.7.6. Hiện tượng tự sửa chữa của phôi lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3 ...	43
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	45
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	45
2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn.....	45
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ.....	45
2.2. Địa điểm nghiên cứu.....	45
2.3. Thời gian nghiên cứu.....	46
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	46
2.4.1. Thiết kế nghiên cứu.....	46
2.4.2. Cỡ mẫu nghiên cứu.....	46
2.4.3. Các định nghĩa được dùng trong nghiên cứu.....	47
2.4.4. Các biến số trong nghiên cứu.....	48
2.4.5. Các thiết bị và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu.....	51
2.4.6. Quy trình nghiên cứu.....	53

2.4.7. Sơ đồ nghiên cứu	69
2.5. Phương pháp xử lí số liệu	70
2.6. Sai số và không chế sai số.....	72
2.7. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu	72
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	73
3.1. Hoàn thiện quy trình sàng lọc rối loạn 24 NST bằng kỹ thuật NGS trên tế bào phôi IVF	73
3.1.1. Kết quả quy trình khuếch đại hệ gen từ tế bào phôi.....	73
3.1.2. Kết quả quy trình giải trình tự gen bằng NGS.....	75
3.1.3. Kết quả quá trình tối ưu quy trình giải trình tự gen bằng các kit chạy mẫu nhỏ	79
3.2. Đánh giá độ chính xác của kỹ thuật NGS so với kỹ thuật aCGH trong sàng lọc rối loạn 24 nhiễm sắc thể trên tế bào phôi.....	87
3.2.1. Kết quả định lượng DNA.....	87
3.2.2. Kết quả xét nghiệm của kỹ thuật NGS và kỹ thuật aCGH.....	88
3.2.3. Đánh giá độ chính xác của NGS.....	93
3.3. Đánh giá kết quả sàng lọc phôi trước làm tổ bằng kỹ thuật NGS	97
3.3.1. Đặc điểm bệnh nhân hiến phôi	97
3.3.2. Đặc điểm bất thường NST của phôi	98
3.3.3. Mối liên quan giữa tuổi mẹ và tình trạng phôi	102
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....	106
4.1. Hoàn thiện quy trình sàng lọc rối loạn 24 NST bằng kỹ thuật NGS trên tế bào phôi	107
4.1.1. Quy trình khuếch đại hệ gen (WGA)	109
4.1.2. Quy trình giải trình tự gen	112
4.2. Đánh giá độ chính xác của kỹ thuật NGS so với kỹ thuật aCGH trong sàng lọc rối loạn 24 nhiễm sắc thể trên tế bào phôi	115

4.3. Đánh giá kết quả sàng lọc phôi trước làm tổ bằng kỹ thuật NGS	120
4.3.1. Đặc điểm rối loạn của phôi	120
4.3.2. Tính ứng dụng của kỹ thuật NGS	120
4.3.2. Mối liên quan giữa tuổi mẹ và tình trạng phôi.....	129
KẾT LUẬN	134
KIẾN NGHỊ	
NHỮNG ĐÓNG GÓP CỦA NGHIÊN CỨU	
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN	
QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Đồng thuận về hệ thống đánh giá tiền nhân của tổ chức Alpha	14
Bảng 1.2. Đồng thuận về hệ thống đánh giá phôi ở giai đoạn phân chia của tổ chức Alpha	15
Bảng 2.1. Các biến số thông tin chung của bệnh nhân hiến phôi	48
Bảng 2.2. Các biến số của mục tiêu 1	49
Bảng 2.3. Các biến số của mục tiêu 2	50
Bảng 2.4. Các biến số của mục tiêu 3	51
Bảng 2.5. Thiết bị sử dụng trong nghiên cứu.....	52
Bảng 2.6. Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu.....	52
Bảng 2.7. Tiêu chí đánh giá kết quả điện di.....	55
Bảng 2.8. Tiêu chí đánh giá kết quả nồng độ DNA.....	56
Bảng 2.9. Các tiêu chí đánh giá chất lượng sản phẩm giải trình tự gen theo yêu cầu của hãng	59
Bảng 2.10. Các bộ kit chạy máy để tối ưu quy trình giải trình tự gen.....	63
Bảng 3.1. Đánh giá kết quả điện di	74
Bảng 3.2. Nồng độ DNA đo bằng Qubit.....	74
Bảng 3.3. Đánh giá chất lượng nồng độ DNA sau WGA 24 mẫu.....	75
Bảng 3.4. Đánh giá chất lượng kết quả giải trình tự gen	76
Bảng 3.5. Kết quả giải trình tự gen cho 24 mẫu	77
Bảng 3.6. Đánh giá chất lượng kết quả giải trình tự gen bằng bộ kit Miseq Reagent kit v2 Nano.....	79
Bảng 3.7. Đánh giá chất lượng kết quả giải trình tự gen bằng bộ kit Miseq Reagent kit v2 Micro.....	81
Bảng 3.8. Đánh giá chất lượng kết quả giải trình tự gen bằng bộ kit Miseq Reagent kit v2 Standard	83

Bảng 3.9. Đánh giá chất lượng kết quả giải trình tự gen bằng bộ kit Miseq Reagent kit V3.....	85
Bảng 3.10. Nồng độ DNA đo bằng Qubit.....	87
Bảng 3.11. Đánh giá chất lượng nồng độ DNA sau WGA 52 mẫu.....	87
Bảng 3.12. Kết luận kết quả bằng NGS và aCGH.....	88
Bảng 3.13a. So sánh sự tương đồng về kết luận kết quả của kỹ thuật NGS... và kỹ thuật aCGH ở 48 phôi.....	93
Bảng 3.13b. Đánh giá độ chính xác của kỹ thuật NGS.....	94
Bảng 3.14. Đặc điểm bệnh nhân	97
Bảng 3.15. Đặc điểm vô sinh của bệnh nhân	97
Bảng 3.16. Số lượng NST bị bất thường ở phôi	99
Bảng 3.17. Tần suất bất thường của 24 NST	101
Bảng 3.18. Đặc điểm phân bố tuổi và mối liên quan với số phôi.....	102
Bảng 3.19. Mối liên quan giữa tuổi và đặc điểm phôi.....	102
Bảng 3.20. Mối liên quan giữa tuổi và các loại bất thường phôi.....	103
Bảng 3.21. Mối liên quan giữa tuổi và mức độ rối loạn NST.....	103
Bảng 3.22. Liên quan giữa tuổi và tỷ lệ bất thường NST 13, 18, 21,..... và NST giới tính	104

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 2.1. Biểu đồ CNV của mẫu có bộ NST bình thường 46,XX.....	60
Biểu đồ 2.2. Biểu đồ CNV của mẫu có bộ NST bình thường 46,XY.....	61
Biểu đồ 2.3. Biểu đồ CNV của mẫu có bộ NST bất thường (47,XY,+6)	61
Biểu đồ 2.4. Biểu đồ CNV của mẫu có thể khảm (46,XX/47,XX,+5)	62
Biểu đồ 2.5. Biểu đồ CNV của mẫu tam bội (69,XXY)	62
Biểu đồ 2.6. Biểu đồ tỉ số \log_2 của mẫu có bộ NST bình thường 46,XX.....	67
Biểu đồ 2.7. Biểu đồ tỉ số \log_2 của mẫu có bộ NST bình thường 46,XY ..	67
Biểu đồ 2.8. Biểu đồ tỉ số \log_2 của mẫu có bộ NST bất thường 48,XY,+13, +16.....	68
Biểu đồ 3.1. Biểu đồ CNV của phôi số 3. Không có rối loạn NST	78
Biểu đồ 3.2. Biểu đồ CNV của phôi số 8. Lệch bội NST số 22	78
Biểu đồ 3.3. Biểu đồ CNV của phôi số 19. Thể khảm.....	78
Biểu đồ 3.4. Biểu đồ tỉ số \log_2 của phôi số 1	89
aCGH không kết luận kết quả.....	89
Biểu đồ 3.5. Biểu đồ CNV của phôi số 1.....	89
NGS kết luận Karyotyp: 46,XX/46,XX,-2q,-6,+20.....	89
Biểu đồ 3.6. Biểu đồ tỉ số \log_2 của phôi số 14	90
aCGH không kết luận kết quả.	90
Biểu đồ 3.7. Biểu đồ CNV của phôi số 14.....	90
NGS kết luận Karyotyp: 46,XX/46,XX,+14s(q14.2-24.3) 59Mb	90
Biểu đồ 3.8. Biểu đồ tỉ số \log_2 của phôi số 21	91
(aCGH không kết luận kết quả)	91
Biểu đồ 3.9. Biểu đồ CNV của phôi số 21	91
NGS kết luận Karyotyp: 46,XY/46,XY,+19s(q13,123,q13.142) 22,4Mb.....	91
Biểu đồ 3.10. Biểu đồ tỉ số \log_2 của phôi số 50	92

(aCGH không kết luận kết quả)	92
Biểu đồ 3.11. Biểu đồ CNV của phôi số 50.....	92
NGS kết luận Karyotyp: 46,XY,-15,+21/40,XY,-1,-5,-7,-8,-12,-15,-18,+21	92
Biểu đồ 3.12. Biểu đồ tỉ số \log_2 của phôi số 11	95
aCGH kết luận Karyotyp: 46,XX.....	95
Biểu đồ 3.13. Biểu đồ CNV của phôi số 11.....	95
NGS kết luận Karyotyp: 46,XX.....	95
Biểu đồ 3.14. Biểu đồ tỉ số \log_2 của phôi số 20	96
aCGH kết luận Karyotyp: 48,XY,+3,+6	96
Biểu đồ 3.15. Biểu đồ CNV của phôi số 20.....	96
NGS kết luận Karyotyp: 48,XY,+3,+6	96
Biểu đồ 3.16. Tỷ lệ bất thường NST	98
Biểu đồ 3.17. Các loại bất thường NST ở phôi.....	98
Biểu đồ 3.18. Biểu đồ CNV phôi số 4. Rối loạn cấu trúc NST số 3.....	99
Biểu đồ 3.19. Biểu đồ CNV phôi số 17. Hội chứng Turner	100
Biểu đồ 3.20. Biểu đồ CNV phôi số 42. Đa bội.....	100
Biểu đồ 3.21. Liên quan giữa nhóm tuổi mẹ và tỷ lệ phôi bình thường, bất thường	104
Biểu đồ 3.22. Đường hồi quy tuyến tính thể hiện mối tương quan giữa nhóm tuổi mẹ và tỷ lệ phôi bình thường, phôi bất thường NST	105

DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 2.1. Sơ đồ quy trình nghiên cứu.....	69
--	----

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Các giai đoạn thụ tinh bình thường.....	7
Hình 1.2. Kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn/ICSI	7
Hình 1.3. Sự phát triển của phôi ngày 2 và 3.....	10
Hình 1.4. Phôi dâu ngày 4.....	11
Hình 1.5. Phôi giai đoạn tạo nang/ cavitation.....	12
Hình 1.6. Các giai đoạn phát triển phôi	13
Hình 1.7. Phân loại phôi nang.....	16
Hình 1.8. Ba giai đoạn thực hiện sinh thiết phôi.....	22
Hình 1.9. Sinh thiết phôi ngày 3 lấy phôi bào	23
Hình 1.10. Sinh thiết phôi nang lấy tế bào ngoài phôi.....	23
Hình 1.11. Chip sử dụng trong kỹ thuật microarray	29
Hình 1.12. Quy trình hoạt động của kỹ thuật aCGH	30
Hình 1.13. Các dạng bất thường NST cân bằng	33
Hình 1.14. Quy trình thực hiện giải trình tự gen thế hệ mới NGS	35
Hình 3.1. Kết quả điện di	73
Hình 3.2. Chất lượng dữ liệu giải trình tự trên máy Miseq	75
Hình 3.3. Hình ảnh minh họa các thông số chạy và biểu đồ CNV của mẫu đạt yêu cầu khi giải trình tự gen bằng kit Miseq Reagent kit v2 Nano	80
Hình 3.4. Hình ảnh minh họa các thông số chạy và biểu đồ CNV của mẫu đạt yêu cầu khi giải trình tự gen bằng kit Miseq Reagent kit v2 Micro.	82
Hình 3.5. Hình ảnh minh họa các thông số chạy và biểu đồ CNV của mẫu đạt yêu cầu khi giải trình tự gen bằng kit Miseq Reagent kit v2 Standard.....	84
Hình 3.6. Hình ảnh minh họa các thông số chạy và biểu đồ CNV của mẫu đạt yêu cầu khi giải trình tự gen bằng kit Miseq Reagent kit V3.	86

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, trên toàn thế giới có hơn 70 triệu cặp vợ chồng bị vô sinh [1]. Vô sinh đã để lại hậu quả nặng nề về mọi mặt, đặc biệt trong nhiều nền văn hóa, phụ nữ được khẳng định giá trị thông qua việc làm mẹ, nên việc không thể thụ thai tạo ra nhiều gánh nặng về tâm lý, xã hội và kinh tế cho các gia đình nhất là đối với phụ nữ [2],[3],[4]. Nhờ sự phát triển của nền y học hiện đại, nhiều nguyên nhân vô sinh được tìm ra, từ đó đưa ra những phương pháp điều trị vô sinh phù hợp. Trong đó phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm (In vitro fertilization/IVF) là một phương pháp hỗ trợ sinh sản có vai trò quan trọng trong điều trị vô sinh, và ngày càng được phát triển rộng khắp trên thế giới. Nhưng tỷ lệ thành công của IVF còn thấp vẫn chỉ từ 33-50% [5], mặc dù các phôi được chuyển là phôi đã được chọn lựa hình thái tốt. Tuy nhiên, không phải tất cả phôi IVF hình thái bình thường đều có bộ nhiễm sắc thể (NST) bình thường. Các nhà nghiên cứu chỉ ra rằng rối loạn NST cao ở phôi là nguyên nhân chính làm tỷ lệ thành công IVF còn thấp [6].

Nhiều nghiên cứu đã thấy phôi người ở giai đoạn sớm thường có rối loạn NST [7],[8],[9] và trên 50% phôi tạo ra trong ống nghiệm có chứa phôi bào bị đột biến NST [10],[11],[12], tỷ lệ này tăng lên đáng kể khi người phụ nữ trên 35 tuổi [13]. Rối loạn về NST dẫn đến kết quả như phôi không làm tổ được, sảy thai và hoặc thai chết lưu, hoặc sinh ra những đứa trẻ bị lệch bội NST. Nghiên cứu của Jacobs đã chứng minh rằng các trường hợp sảy thai tự nhiên trong ba tháng đầu có >50% có liên quan đến bất thường NST [14], theo Kline chỉ có khoảng 3% các trường hợp lệch bội mang thai được phát hiện lâm sàng còn >90% bị sảy thai tự nhiên [15]. Những đứa trẻ lệch bội ra đời là gánh nặng tâm lý, kinh tế cho cả gia đình và xã hội vì trẻ thường tử vong sớm, thời gian nằm viện lâu, chi trả viện phí nhiều (tăng 184% theo Yoon và cộng sự) [16],[17].

Vì vậy, việc ứng dụng các kỹ thuật di truyền hiện đại nhằm phát hiện các rối loạn di truyền cho phôi trước làm tổ (Preimplantation genetic testing/PGT) là việc hết sức cần thiết. Vì PGT không những giúp giảm nguy cơ làm tổ thất bại và phá thai dị tật trên lâm sàng mà còn giúp sinh ra các em bé khỏe mạnh [18],[19],[20],[21].

Nhờ sự tiến bộ của di truyền học hiện đại, nhiều kỹ thuật di truyền tế bào và phân tử được ứng dụng thành công trong xét nghiệm di truyền trước làm tổ như FISH, CGH, aCGH, QF-PCR, BoBs, hoặc gần đây hơn là giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing/NGS), mỗi kỹ thuật đều có ưu và nhược điểm khác nhau nên việc nghiên cứu tìm ra một kỹ thuật ưu việt để sàng lọc, lựa chọn phôi tốt có bộ NST bình thường là yêu cầu cấp thiết và thực tiễn, giúp cho IVF đạt kết quả cao đảm bảo cho ra đời một thế hệ khỏe mạnh về thể lực, sáng suốt về tinh thần, góp phần nâng cao chất lượng dân số. Trong những năm gần đây, kỹ thuật NGS đã được áp dụng rộng rãi ở Châu Âu và được chứng minh là có giá trị hơn kỹ thuật FISH, aCGH trong việc phát hiện rối loạn NST của phôi [22],[23],[24],[25].

Vì vậy chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới để sàng lọc rối loạn 24 nhiễm sắc thể trước làm tổ” với 3 mục tiêu sau:

- 1. Hoàn thiện quy trình sàng lọc rối loạn 24 nhiễm sắc thể bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) trên tế bào phôi.***
- 2. Đánh giá độ chính xác của kỹ thuật NGS so với kỹ thuật aCGH trong sàng lọc rối loạn 24 nhiễm sắc thể trên tế bào phôi.***
- 3. Đánh giá bước đầu kết quả sàng lọc phôi trước làm tổ bằng kỹ thuật NGS.***

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN

1.1. Tình hình vô sinh trên thế giới và tại Việt Nam

1.1.1. Khái niệm vô sinh

Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), vô sinh là tình trạng một cặp vợ chồng quan hệ tình dục đều 2-3 lần/tuần, không dùng bất kỳ biện pháp tránh thai nào, mà không có thai tự nhiên trong thời gian một năm.

1.1.2. Tình hình vô sinh trên Thế giới và Việt Nam

Theo WHO, năm 2013 tỷ lệ vô sinh là 10-15% cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh sản [26].

Nghiên cứu của Maya và cộng sự (2012) phân tích 277 cuộc điều tra về sức khỏe sinh sản của 101 nước trên thế giới từ 1990 đến 2010 cho thấy tỷ lệ mới bị vô sinh nguyên phát là 1,9% năm 1990 lên đến 2,2% năm 2010, vô sinh thứ phát là 9,3% năm 1990 lên 11,1% năm 2010. Như vậy, tình hình vô sinh có xu hướng ngày càng tăng [27].

Nghiên cứu của Tracey và cộng sự (2013) cũng cho thấy tỷ lệ vô sinh có xu hướng ngày càng tăng, tỷ lệ hiện mắc vô sinh ở Canada có khác nhau ở các lứa tuổi, năm 2009-2010 là khoảng 11,5%-15,7% [28].

Nghiên cứu của Mohammad và cộng sự (2013) tiến hành bằng cách phỏng vấn 17.187 phụ nữ trong độ tuổi sinh sản ở các vùng khác nhau ở Iran, kết quả cho thấy: tỷ lệ vô sinh nguyên phát là 20,2% [29].

Nghiên cứu của Ashok và cộng sự (2015), thống kê các báo cáo về tình hình vô sinh trên toàn cầu cho thấy khoảng 15% các cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh đẻ có bị vô sinh, trong đó nguyên nhân vô sinh do nữ là 50%, do nam là 20-30%, do cả nam và nữ là 20-30%. Trong đó tỷ lệ vô sinh nam thay đổi khác nhau ở các nước (2,5-12%) [30].

Tỷ lệ vô sinh ở các nước kém phát triển cao hơn và nguyên nhân chủ yếu do ảnh hưởng của các bệnh truyền nhiễm [31].

Ở Việt Nam, một số công trình nghiên cứu về vô sinh cho thấy tỷ lệ vô sinh có xu hướng tăng. Điều tra dân số năm 1980, tỷ lệ này chỉ ở mức 7-10%, đến năm 1982, tỷ lệ vô sinh tăng lên đến 13%, trong đó tỷ lệ vô sinh nữ chiếm 54%, vô sinh nam chiếm 36%, vô sinh không rõ nguyên nhân chiếm 10% [32].

Nguyễn Việt Tiến (2009) nghiên cứu trên 14.396 cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh đẻ (tuổi từ 15-49), tại 8 tỉnh đại diện cho 8 vùng sinh thái của cả nước cho thấy tỷ lệ vô sinh chung trên phạm vi toàn quốc là 7,7%, trong đó vô sinh nguyên phát là 3,9% và vô sinh thứ phát là 3,8% [33].

Trần Quán Anh (2009) tỷ lệ vô sinh ở nước ta là 15%, trong đó vô sinh nam chiếm trên 50% và tỷ lệ vô sinh đang có xu hướng ngày càng tăng [34].

Nghiên cứu năm 2010 của Nông Minh Hoàng ở 4 tỉnh phía Bắc nước ta thì tỷ lệ vô sinh là 7,1%. Trong đó Hải Phòng là 8,5%, Điện Biên 6,9%, Quảng Ninh 5,7% và Thanh Hóa là 7,2% [35].

Nguyễn Đức Nhựt (2015) đã phát hiện tỷ lệ mất đoạn AZF ở những người thiếu tinh nặng và vô tinh là 14-30% [36].

Nhìn chung, theo thống kê của các nghiên cứu ở Việt Nam và trên thế giới đều cho rằng vô sinh có xu hướng tăng, nguyên nhân vô sinh do nam giới chiếm tỷ lệ gần bằng với vô sinh do nữ giới. Với các số liệu nêu trên, rõ ràng vô sinh đang trở thành một vấn đề đáng lo ngại của y học và xã hội ở Việt Nam.

1.1.3. Điều trị vô sinh

Điều trị vô sinh bao gồm các liệu pháp y học thông thường, như sử dụng thuốc hoặc can thiệp bằng thủ thuật, phẫu thuật cơ quan sinh sản hoặc dùng kỹ thuật hỗ trợ sinh sản.

Theo các chuyên gia về sản phụ khoa và hiếm muộn, chỉ có khoảng 40% nguyên nhân vô sinh có thể giải quyết được bằng điều trị thuốc hoặc phẫu thuật, còn lại 60% là cần áp dụng các biện pháp hỗ trợ sinh sản hiện đại. Trong đó phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm (In Vitro Fertilization/IVF) là một phương pháp hỗ trợ sinh sản có vai trò quan trọng trong điều trị vô sinh, và ngày càng được phát triển rộng khắp trên thế giới.

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

1.2.1. Khái niệm

IVF là kỹ thuật cho noãn và tinh trùng kết hợp với nhau trong phòng thí nghiệm (thay vì trong vòi trứng người phụ nữ). Sau đó, phôi hình thành sẽ được chuyển trở lại vào buồng tử cung. Quá trình phát triển của phôi và thai sẽ diễn ra bình thường trong tử cung người mẹ.

Tỷ lệ thành công của mỗi chu kỳ điều trị IVF cổ điển trung bình trên thế giới hiện nay khoảng 33%-50%. Tỷ lệ này phụ thuộc vào tuổi bệnh nhân, chỉ định điều trị và phác đồ điều trị của từng trung tâm.

Năm 1978, em bé đầu tiên từ IVF, Louise Brown ra đời đã đánh dấu bước đầu cho sự phát triển của IVF trên người.

Hiện nay mỗi năm trên thế giới có khoảng 1,5 triệu chu kỳ IVF và có xu hướng tăng dần, dẫn đến sự ra đời của hơn 350.000 trẻ em trên toàn thế giới [37]. Ở các nước phát triển như Bắc Âu, Tây Âu và Úc, có từ 1-5% trẻ mới sinh hàng năm là từ IVF [38].

1.2.2. Chỉ định

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

- + Tác nghẽn ống dẫn trứng.
- + Tinh trùng ít, yếu, dị dạng. Không có tinh trùng trong tinh dịch, cần mổ vi phẫu lấy tinh trùng từ mào tinh hoặc tinh hoàn.

- + Hiếm muộn không rõ nguyên nhân, IUI nhiều lần thất bại.
- + Trường hợp xin noãn.
- + Sàng lọc, chẩn đoán di truyền trước làm tổ.

1.2.3. Quy trình kỹ thuật IVF

Bước 1: Chuẩn bị noãn.

Bước 2: Cho noãn thụ tinh với tinh trùng.

Bước 3: Chọn lựa phôi.

Bước 4: Chuyển phôi vào buồng tử cung.

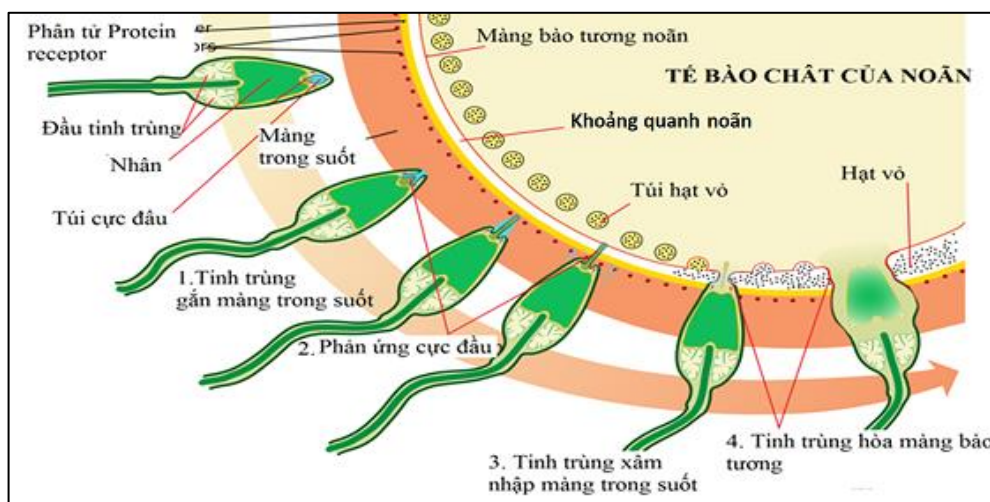
1.2.3.1. Chuẩn bị noãn

- + Kích thích buồng trứng bằng thuốc nội tiết để có nhiều nang noãn, khi có nang noãn trưởng thành chọc hút lấy noãn [39],[40],[41],[42].
- + Xác định noãn bào: dịch nang sau khi chọc hút cần nhanh chóng kiểm tra tìm noãn trong dịch nang [43].
- + Đánh giá chất lượng của noãn bào.
- + Xử lý hỗn hợp gò mầm: gò mầm xung quanh noãn là một hàng rào đối với tinh trùng. Trong thụ tinh ống nghiệm nên loại bỏ gò mầm trước khi thụ tinh [43].

1.2.3.2. Cho noãn thụ tinh với tinh trùng trong phòng thí nghiệm

❖ Quá trình thụ tinh trong IVF cổ điển

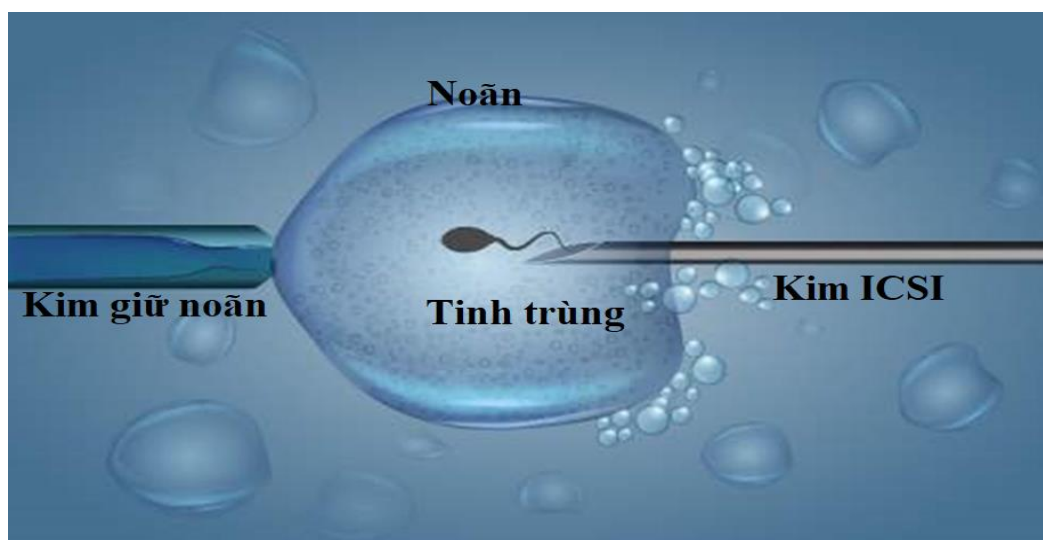
Quá trình thụ tinh trong IVF cổ điển trải qua các giai đoạn: (1) tinh trùng gắn màng trong suốt, (2) phản ứng cực đầu, (3) xâm nhập vào màng trong suốt, (4) hòa màng bào tương noãn và tinh trùng, (5) hoạt hóa noãn và (6) sự hình thành và hòa nhập của 2 tiền nhân.



Hình 1.1. Các giai đoạn thụ tinh bình thường
(Nguồn: Acrosome reaction diagram en.svg - Mariana Ruiz Villarreal)

❖ Quá trình thụ tinh trong IVF/ ICSI

Trong kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (IntraCyttoplasmic Sperm Injection/ICSI), một tinh trùng sẽ được bắt động, thu giữ bằng một vi kim, và được tiêm thẳng vào bào tương của noãn (hình 1.2). Sự thụ tinh trong ICSI diễn ra khác với bình thường do không có các rào cản sinh học bên ngoài như: lớp tế bào hạt quanh noãn, màng trong suốt, màng bảo tương không còn tác dụng chọn lọc tinh trùng. Do đó quá trình thụ tinh trong ICSI chỉ bắt đầu bằng hiện tượng hoạt hóa noãn và hình thành tiền nhân.



Hình 1.2. Kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn/ICSI
(Nguồn: Create Fertility-UK)

Ưu điểm lớn nhất của ICSI là cho dù chất lượng tinh trùng bất thường đến đâu, chỉ cần có một tinh trùng sống là thụ tinh có thể xảy ra. Vì thế kỹ thuật ICSI được xem là phương pháp điều trị thường quy cho các trường hợp bất thường tinh trùng nặng.

Một nghiên cứu tổng quan hệ thống cho thấy ở những trường hợp bất thường tinh trùng, tỷ lệ thụ tinh của ICSI cao hơn so với IVF cổ điển [44].

Trường hợp đáp ứng buồng trứng kém, bệnh nhân cũng được chỉ định thực hiện kỹ thuật ICSI để phòng ngừa trường hợp không thụ tinh hoặc thụ tinh thấp khi làm IVF cổ điển. Ngoài ra, một số trung tâm còn mở rộng chỉ định ICSI cho các trường hợp thất bại IUI và IVF cổ điển nhiều lần, các trường hợp vô sinh không rõ nguyên nhân...

Trường hợp thực hiện kỹ thuật di truyền trước làm tổ, 100% các ca phải được thụ tinh bằng ICSI để tránh hiện tượng lai tạp gen của tinh trùng còn bám trên màng khi thực hiện kỹ thuật IVF cổ điển [45].

❖ Sự phát triển của phôi trước khi làm tổ

Sau khi thụ tinh, hợp tử bắt đầu quá trình phân chia, tạo thành các tế bào nhỏ gọi là phôi bào. Quá trình này tương tự với quá trình nguyên phân ở tế bào sinh dưỡng trưởng thành. Tuy nhiên, giữa hai quá trình này có một điểm khác biệt quan trọng. Đó là sau khi phân chia, các tế bào sinh dưỡng con sẽ tiếp tục tăng trưởng cho đến khi đạt kích thước bằng với tế bào mẹ ban đầu. Sau đó, chúng mới bắt đầu phân chia tiếp tục. Ở tế bào phôi, các phôi bào phân cắt thành các phôi bào nhỏ hơn. Các phôi bào này lại tiếp tục phân chia mà không có sự tăng trưởng về kích thước.

- *Phôi ngày 1*

Noãn được thụ tinh tạo thành hợp tử và phát triển thành phôi qua nhiều giai đoạn, khởi đầu là giai đoạn tiền nhân. Tiền nhân đực và tiền nhân cái thường hình thành cùng một lúc. Tiền nhân đực hình thành gần vị trí tinh trùng thâm nhập và tiền nhân cái hình thành ở cực bào tương có thoi phân bào.

Khoảng 4 giờ sau khi tiêm tinh trùng vào bào tương của noãn hoặc 5-6 giờ sau cấy noãn với tinh trùng có thể nhìn thấy hình ảnh các tiền nhân có kích thước nhỏ và mờ.

Khoảng 15 giờ sau khi thụ tinh, hai tiền nhân nằm sát nhau và có hình số 8, và phần tiếp xúc sát nhau tạo thành một mặt phẳng, đồng thời các hạch nhân (nucleoli) sẽ di chuyển và xếp hàng cạnh vùng tiếp xúc hai tiền nhân. Sau khi hai tiền nhân tiếp cận và hòa nhập vào nhau, hợp tử bước vào lần phân chia đầu tiên.

Quan sát dưới kính hiển vi vào thời điểm 18 giờ sau thụ tinh, nếu thấy 2 tiền nhân (và có thể kèm hai thể cực) là dấu hiệu chắc chắn thụ tinh đã xảy ra [46]. Mỗi tiền nhân có khoảng 1 đến 9 hạch nhân. Tiền nhân nhỏ có ít hạch nhân hơn [47].

- Phôi ngày 2-3

Sự phân chia của phôi bao gồm một loạt các chu kỳ phân bào của bào tương, mặc dù vậy kích thước phôi thay đổi không đáng kể (hình 1.3). Trung thể của tinh trùng kiểm soát sự phân chia đầu tiên sau thụ tinh [48].

Sự phân chia lần 1 kết thúc sau thụ tinh 24 giờ tạo thành phôi 2 tế bào, lần phân chia này là chu kỳ kéo dài nhất, các chu kỳ sau chỉ khoảng 18 giờ. Những phân chia này kiểu như nguyên phân của tế bào bình thường, các tế bào con được tạo ra gọi là các phôi bào (blastomere). Phân chia lần II kết thúc sau thụ tinh 40 giờ, tạo thành 4 phôi bào có kích thước tương đương nhau. Vào ngày 3, phôi chứa 6-12 phôi bào và ngày thứ 4 gồm 16-32 tế bào [49].

Các phôi bào con được sinh ra kích thước chỉ bằng một nửa tế bào ban đầu và chúng vẫn tiếp tục phân chia nhỏ hơn. Đây là điểm rất khác biệt rất quan trọng của giai đoạn phân chia [50]. Càng về sau, sự khác biệt giữa các phôi bào càng tăng lên do sự phân chia các thành phần bào tương không đồng đều hoặc do những thay đổi diễn ra trong bản thân phôi bào khi phát triển. Nhân của mỗi phôi bào sẽ được định hướng theo môi trường bào tương khác nhau và vì thế ảnh hưởng lên hoạt động hệ gen cũng khác nhau. Kết quả là

mỗi phôi bào sẽ thiết lập cho riêng nó một chương trình phát triển và sẽ tăng dòng tế bào đặc hiệu. Những lần phân chia đầu tiên thường đồng bộ nhưng những lần sau thì không. Các phôi bào được tổ chức thành từng nhóm hay từng lớp và mỗi nhóm này có tốc độ phân chia đặc trưng riêng. Đây là những cơ sở cho sự hình thành và biệt hóa cơ quan sau này như thần kinh, cơ xương.

Kích thước toàn bộ của phôi không thay đổi trong giai đoạn phân chia, vẫn giữ nguyên hình dạng của màng trong suốt. Trong chu kỳ phân bào đầu tiên ở giai đoạn cuối, bào tương của hợp tử kéo dài ra và thắt lại dần ở giữa cho đến khi hợp tử phân chia thành hai phôi bào. Quá trình này tiếp tục trong những chu kỳ phân bào tiếp theo và kích thước của phôi bào giảm khoảng 28,5% cho mỗi chu kỳ phân bào. Trong 3 chu kỳ phân bào đầu tiên, kích thước của phôi thường ít thay đổi. Phôi có 2 đến 8 phôi bào phụ thuộc chủ yếu vào sự dịch mã (translation) từ các chất liệu RNA của mẹ để phân chia [51].

Trong thực tiễn, phôi có 2 phôi bào thường thấy ở thời điểm 24 giờ sau thụ tinh (có khi sớm hơn vào khoảng 20 giờ) và tồn tại cho đến 42 giờ. Phôi có 4 phôi bào ở thời điểm 36-60 giờ sau thụ tinh. Phôi có 8 phôi bào ở thời điểm sau 54 giờ và thường trước 72 giờ. Ở người, còn thấy phôi có 3-5 và 7 phôi bào đó là do phôi được quan sát khi đang phân chia. Một số nghiên cứu thấy rằng phôi nam phát triển nhanh hơn phôi nữ [52],[53].



Hình 1.3. 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: Red Rock Fertility Center - USA)

- Phôi ngày 4 (phôi dâu)

Ở người phôi dâu bắt đầu hình thành khi phôi ở giai đoạn 8 phôi bào và bắt đầu quá trình kết đặc (compaction). Quá trình phôi kết đặc là một quá trình hình thành các liên kết chặt chẽ giữa các phôi bào, phần phôi bào tiếp xúc với nhau tăng lên và dàn phẳng ra tạo thành một khối không nhìn rõ các ranh giới giữa các phôi bào, bề mặt của phôi được phủ một lớp vi nhung mao (microvilli). Các phôi bào hoặc mảnh vụn tế bào mà không hình thành liên kết với các phôi bào khác sẽ bị đẩy ra ngoài khối phôi nhưng vẫn ở phía trong màng trong suốt cho tới khi phôi thoát màng [54]. Khi phôi bắt đầu kết đặc lại, các phôi bào tương tác với nhau làm các phôi bào không còn đặc tính toàn năng (totipotency) nữa và đây là sự khởi đầu cho sự phiên 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 1.4). Phôi dâu ở người có thể xuất hiện sớm khoảng 65 giờ sau thụ tinh, nhưng thường xuất hiện giữa ngày thứ 3 và thứ 4 sau thụ tinh [55].



Hình 1.4. 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: Red Rock Fertility Center - USA)

- Phôi ngày 5-6 (phôi nang)

Phôi nang là giai đoạn cuối cùng của quá trình phát triển trước khi có hiện tượng thoát màng để làm tổ. Sự phát triển của phôi nang trải qua nhiều giai đoạn như tạo nang (giai đoạn phôi nang sớm) (hình 1.5), gia tăng số lượng tế bào và tăng thể tích của khoang bên trong (giai đoạn hoàn chỉnh). Các tế bào trong phôi nang được biệt hóa thành hai loại, nguyên bào lá nuôi và nguyên bào phôi. Quá trình tạo nang bao gồm sự tích lũy dịch vận chuyển bởi các nguyên bào lá nuôi. Để hoàn thành quá trình này, nguyên bào lá nuôi đầu tiên phụ thuộc vào sự hoàn thành quá trình phân cực tế bào và hình thành mối liên kết chặt giữa các nguyên bào lá nuôi. Sự liên kết và vị trí các phôi bào trong phôi kiểm soát sự phân cực tế bào.



Hình 1.5. 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)

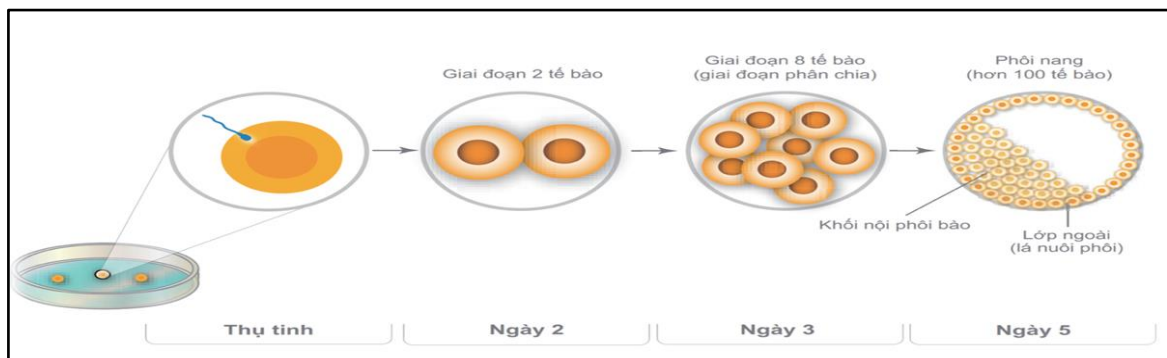
(Nguồn: Red Rock Fertility Center - USA)

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

Trong quá trình hình thành phôi nang, 2 loại phôi bào được hình thành là nguyên bào phôi (Inner Cell Mass/ICM) và nguyên bào lá nuôi (Trophectoderm/TE).

Nguyên bào lá nuôi là loại phôi bào được biệt hóa đầu tiên trong quá trình hình thành thai. Hai loại phôi bào này ngày càng khác nhau khi chúng di chuyển tới các vị trí mới trong quá trình tạo nang. Nguyên bào lá nuôi có hình bầu dục và phân cực (polarization) trong khi đó nguyên bào phôi vẫn giữ hình tròn và hình thái không thay đổi. Các nguyên bào lá nuôi nối với nhau qua những phần tiếp xúc bề mặt nhỏ, trong khi đó nguyên bào phôi tiếp xúc chặt chẽ với nhau tạo thành một khối. Vị trí và sự phát triển của nguyên bào lá nuôi và nguyên bào phôi phụ thuộc vào sự phân cực và sự hình thành trục phân bào của phôi được hình thành từ khi trứng mới bắt đầu được thụ tinh. Các nguyên bào phôi di chuyển về phía một cực của phôi gọi là cực phôi (embryonic pole), các phôi bào này liên kết chặt với nhau và có đặc tính đa năng (pluripotent). Các nguyên bào lá nuôi tạo thành hàng rào bên ngoài bảo vệ mầm phôi và được biệt hóa để thực hiện chức năng này [56].

Tốc độ phân chia của nguyên bào lá nuôi nhanh hơn so với tốc độ phân chia của nguyên bào phôi. Nguyên bào lá nuôi nhân đôi khi bắt đầu quá trình tạo nang vào ngày thứ 4 để tạo thành phôi nang vào ngày thứ 5, trong khi đó nguyên bào phôi nhân lên vào ngày thứ 5 và 6. Khi phôi nang lớn dần, tốc độ nhân lên của nguyên bào lá nuôi là 1,5 chu kỳ/24giờ nhanh hơn so với nguyên bào phôi [57]. Thông thường tổng số phôi bào của phôi nang là trên 60 phôi bào. Ở người, phôi nang ngày 5 có khoảng 60 phôi bào, tăng đến 160 vào ngày 6 và trên 200 sau khi thoát màng vào ngày 7; 40% số phôi bào tạo mầm phôi [57] (hình 1.6).



Hình 1.6. Các giai đoạn phát triển phôi
(Nguồn: *Embryo Options - USA*)

1.2.3.3. Chọn lựa phôi

Hiện nay, có 2 cách để chọn lựa phôi IVF: chọn theo hình thái và chọn theo di truyền.

❖ Đánh giá chất lượng phôi theo hình thái

* Đánh giá tiền nhân

Đánh giá tiền nhân phụ thuộc vào kích thước của tiền nhân và vị trí của tiền nhân. Có nhiều hệ thống thang điểm để đánh giá tiền nhân. Hệ thống được sử dụng phổ biến ở Việt Nam là đồng thuận về hệ thống đánh giá tiền nhân của tổ chức Alpha (bảng 1.1) [58].

Bảng 1.1. Đồng thuận về hệ thống đánh giá tiền nhân của tổ chức Alpha [58]

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

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

Hệ thống được dùng phổ biến ở Việt Nam và châu Âu gọi là đánh giá phôi đồng thuận của tổ chức Alpha (bảng 1.2) [58].

Bảng 1.2. Đồng thuận về hệ thống đánh giá phôi ở giai đoạn phân chia của tổ chức Alpha [58]

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

* Đánh giá phôi nang ngày 5 và 6.

Đánh giá phôi nang dựa vào độ phát triển rộng của khoang phôi nang và hiện tượng thoát màng (hình 1.7). Phôi nang được đánh giá dựa vào tiêu chuẩn của Gardner [59].

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

- + Giai đoạn 1: phôi nang giai đoạn sớm (early blastocyst) khi khoang dịch chiếm dưới $\frac{1}{2}$ tổng thể tích của phôi.
- + Giai đoạn 2: phôi nang (blastocyst) khi khoang dịch chiếm trên $\frac{1}{2}$ tổng thể tích của phôi.
- + Giai đoạn 3: phôi nang đầy (full blastocyst) khi khoang dịch chiếm hầu hết thể tích của phôi.

- + Giai đoạn 4: phôi nang rộng (expanded blastocyst) khi khoang dịch phát triển rộng làm cho màng trong suốt bắt đầu mỏng dần.
- + Giai đoạn 5: phôi nang đang thoát màng (hatching blastocyst) khi nguyên bào lá nuôi bắt đầu thoát ra khỏi màng trong suốt.
- + Giai đoạn 6: phôi nang đã thoát màng (hatched blastocyst) khi phôi nang đã hoàn toàn thoát ra khỏi màng trong suốt

Đánh giá bước 2: dựa vào đặc điểm nguyên bào phôi và nguyên bào lá nuôi

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



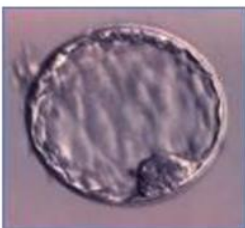
Phôi nang giai đoạn sớm



Phôi nang



Phôi nang đầy



Phôi nang rộng



Phôi nang đang thoát màng



Phôi nang đã thoát màng

Hình 1.7. Phân loại phôi nang [56]

❖ **Đánh giá chất lượng phôi dựa theo di truyền**

Nhiều nghiên cứu phôi người ở giai đoạn sớm đã chỉ ra rằng không phải tất cả phôi IVF hình thái bình thường đều có bộ NST bình thường. Các bất thường này không nhận biết được bằng cách quan sát phôi dưới kính hiển vi mà phải áp dụng các kỹ thuật di truyền hiện đại để phân tích, có hơn 50% phôi tạo ra trong ống nghiệm có chứa phôi bào bị rối loạn di truyền, tỷ lệ này tăng lên đáng kể khi người phụ nữ trên 35 tuổi [8],[9],[11],[12],[60].

Hiện nay có rất nhiều kỹ thuật di truyền tế bào phân tử để đánh giá NST cho phôi IVF, những kỹ thuật đã được kiểm chứng đồng thời đã và đang được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản như kỹ thuật FISH, CGH, aCGH, NGS...

1.2.3.4. Chuyển phôi vào buồng tử cung và theo dõi kết quả

Đối với IVF cổ điển, sau khi chọn lựa được phôi có hình thái tốt nhất sẽ chuyển vào buồng tử cung và theo dõi sự phát triển của thai. Dù vậy nhưng tỷ lệ thành công của IVF cổ điển còn thấp, nguyên nhân chính là do rối loạn di truyền của phôi [6], hoặc và niêm mạc tử cung mỏng; lạc nội mạc tử cung; kháng progesterone; mô sẹo trong khoang nội mạc tử cung [61],[62],[63]... Do đó, xu hướng IVF ngày nay là IVF/ICSI và xét nghiệm di truyền trước làm tổ (Preimplantation genetic testing/PGT).

Các chỉ định chính của PGT bao gồm tuổi mẹ cao trên 35 tuổi [64],[65],[66]; thất bại IVF nhiều lần [67],[68]; sảy thai liên tiếp [69],[70]; vô sinh nam nghiêm trọng [71]; các trường hợp cặp vợ chồng mang rối loạn di truyền ở mức độ NST hoặc mức độ gen.

Đặc biệt, ở một số quốc gia, bác sĩ lâm sàng hiện đang cung cấp xét nghiệm này cho tất cả bệnh nhân IVF [72].

1.3. Các xét nghiệm di truyền trước làm tổ

Xét nghiệm di truyền trước làm tổ (Preimplantation genetic testing/PGT) là xét nghiệm phân tích DNA từ tế bào phôi để xác định các bất thường di truyền [73], bao gồm:

- PGT-A (Preimplantation genetic testing for Aneuploidies): Xét nghiệm di truyền trước làm tổ phát hiện lệch bội NST.
- PGT-M (Preimplantation genetic testing for monogenic/single gene disorders): Xét nghiệm di truyền trước làm tổ phát hiện rối loạn đơn gen.
- PGT-SR (Preimplantation genetic testing for chromosome structural rearrangements): Xét nghiệm di truyền trước làm tổ phát hiện rối loạn cấu trúc NST.

1.3.1. PGT-A

Ở người, trong mỗi tế bào có $2n = 46$ NST, bao gồm 23 cặp NST (22 cặp NST thường và 1 cặp NST giới tính). Ở nam giới cặp NST giới tính là XY và 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 NST trong 46 NST bình thường gọi là thể lệch bội (aneuploidy).

PGT-A được sử dụng để sàng lọc phôi phát hiện lệch bội NST, thay cho thuật ngữ Sàng lọc di truyền trước làm tổ (Preimplantation Genetic Screening/PGS) và Sàng lọc nhiễm sắc thể toàn diện cho phôi IVF (Comprehensive Chromosomal Screening). PGT-A cho phép sàng lọc 46 NST của phôi để tìm ra các bất thường về số lượng NST dạng lệch bội (aneuploidy).

PGT-A được ứng dụng để chọn phôi có khả năng làm tổ cao nhất và dẫn đến mang thai thành công [20]. Theo nghiên cứu của Verpoest và cộng sự

(2018), nhóm sử dụng PGT-A để chọn phôi có tỷ lệ mang thai cao hơn và tỷ lệ sảy thai thấp hơn so với nhóm không sử dụng PGT-A [74].

PGT-A còn được Zore và cộng sự (2018) ứng dụng để đánh giá tình trạng khảm của phôi, kết quả là nhóm phôi thể khảm vẫn có khả năng làm tổ và phát triển nhưng tỷ lệ mang thai thấp (30%) và tỷ lệ sảy thai cao hơn (40%) so với nhóm có phôi bình thường có tỷ lệ mang thai là 53,8% và tỷ lệ sảy thai là 18,2% [75].

Các kỹ thuật di truyền ứng dụng trong PGT-A:

- Kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang (FISH).
- Kỹ thuật Karyolite-BoBs.
- Kỹ thuật lai so sánh hệ gen (aCGH).
- Kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (NGS).

1.3.2. PGT-SR

PGT-SR được thực hiện trên các phôi để phát hiện các rối loạn cấu trúc NST. Các rối loạn cấu trúc NST này có nguồn gốc từ bố hoặc mẹ, có chỉ định trước và được lưu ý trong quá trình thực hiện hỗ trợ sinh sản. Phương pháp này giống PGT-A là cùng sử dụng các kỹ thuật xét nghiệm phân tích rối loạn 24 NST của phôi như aCGH hay NGS, tuy nhiên tập trung vào các rối loạn cấu trúc NST của phôi.

Chỉ định xét nghiệm PGT-SR: tiền sử vợ hoặc chồng hoặc trong gia đình có rối loạn cấu trúc NST: đảo đoạn, chuyển đoạn NST, chuyển đoạn hòa nhập tâm NST (Robertsonian translocation).

Các kỹ thuật di truyền ứng dụng trong PGT-SR:

- Kỹ thuật aCGH
- Kỹ thuật NGS

1.3.3. PGT-M

PGT-M được sử dụng để mô tả thay thuật ngữ chẩn đoán di truyền trước làm tổ (Preimplantation genetic diagnosis/ PGD). Xét nghiệm này được thực hiện trên các phôi, nhằm phát hiện các bệnh di truyền do đột biến gen đã định hướng từ trước hoặc có tiền sử gia đình rõ ràng.

PGT-M được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1990, chỉ định chẩn đoán di truyền cho phôi có nguy cơ mắc một rối loạn di truyền liên kết NST giới tính X. PGT-M được ứng dụng để giúp các cá nhân hoặc các cặp vợ chồng giảm nguy cơ sinh con mắc chứng rối loạn di truyền đã biết do đột biến đơn gen như bệnh xơ nang, bệnh tan máu bẩm sinh Thalassemia, bệnh ưa chảy máu Hemophilia, Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, loạn dưỡng cơ tủy, loạn dưỡng cơ bẩm sinh, bệnh bạch tạng, bệnh vảy cá bẩm sinh, thậm chí bệnh ung thư bao gồm ung thư vú và ung thư buồng trứng di truyền (*BRCA1* và *BRCA2*), hội chứng Li Fraumeni (*LFD1*) và polyp tuyến thượng thận gia đình (*APC*)...

Sallevelt và cộng sự (2017) đã báo cáo về việc sử dụng PGT-M tìm đột biến m.3243A>G gây ra bệnh não ty thể với nhiễm toan lactic và các con giống như đột quy (*MELAS*).

Trachoo và cộng sự đã báo cáo về trường hợp trẻ sơ sinh cho cặp vợ chồng mang mầm bệnh thoái hóa thần kinh có con khỏe mạnh nhờ ứng dụng PGT-M trên phôi để tìm đột biến gen *PANK2* gây ra bệnh thoái hóa thần kinh. Ngày nay, với công nghệ di truyền hiện đại, cho phép ứng dụng PGT-M phát hiện các rối loạn di truyền đơn gen khác nhau.

Chỉ định xét nghiệm PGT-M: tiền sử vợ hoặc chồng mang gen bệnh, hoặc trong gia đình có người mắc bệnh di truyền do đột biến gen.

Các kỹ thuật được ứng dụng trong PGT-M:

- Kỹ thuật PCR, Realtime-PCR;
- Kỹ thuật giải trình tự gen trực tiếp Sanger;
- Kỹ thuật microsatellite DNA, MLPA...

Như vậy, ứng dụng PGT làm giảm nguy cơ mang thai rối loạn NST, giảm thời gian và chi phí để có được một em bé khỏe mạnh bằng cách giúp chọn phôi tốt nhất để chuyển, cũng như mang lại hy vọng cho những gia đình có tiền sử sinh con dị tật, sảy thai liên tiếp hoặc thai chết lưu không rõ nguyên nhân. PGT cũng đảm bảo cấy phôi đơn, tránh những rủi ro đa thai, đảm bảo sức khỏe sinh sản người mẹ. IVF kết hợp với xét nghiệm PGT được xem là biện pháp dự phòng các rối loạn di truyền sớm ở mức độ NST, biện pháp chủ động để người mẹ có thể sinh được con khỏe mạnh.

Để làm PGT cần nuôi cấy phôi đến ngày thứ 3 hoặc 5, làm sinh thiết phôi để xét nghiệm di truyền, phát hiện bất thường NST. Như vậy, để thực hiện xét nghiệm di truyền trước làm tổ cần phải thực hiện hai kỹ thuật chính là kỹ thuật sinh thiết phôi và kỹ thuật xét nghiệm di truyền của phôi.

1.4. Kỹ thuật sinh thiết phôi

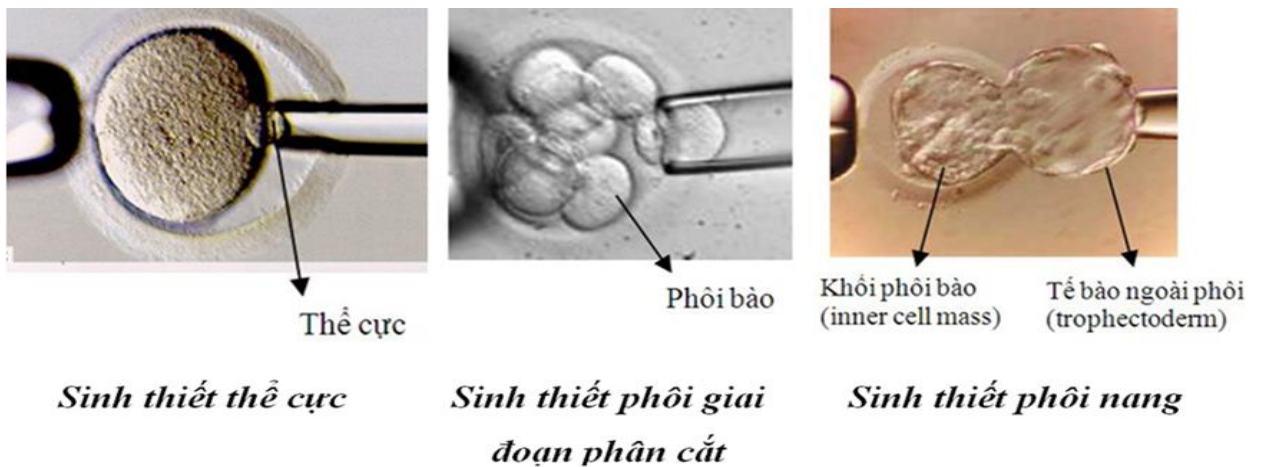
1.4.1. Quy trình sinh thiết phôi

Quy trình sinh thiết chung 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 trứng hay phôi. Sau đó trứng hay phôi sẽ tiếp tục được nuôi cấy, mẫu vật được cố định để sàng lọc phát hiện rối loạn di truyền.

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.

1.4.2. Thời điểm sinh thiết phôi

Sinh thiết phôi có thể được thực hiện ở 3 giai đoạn khác nhau: sinh thiết ngay sau 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 5-6 sau thụ tinh). Mỗi giai đoạn sinh thiết đều mang ưu điểm, khuyết điểm cũng như chỉ định riêng.



Hình 1.8. Ba giai đoạn thực hiện sinh thiết phôi

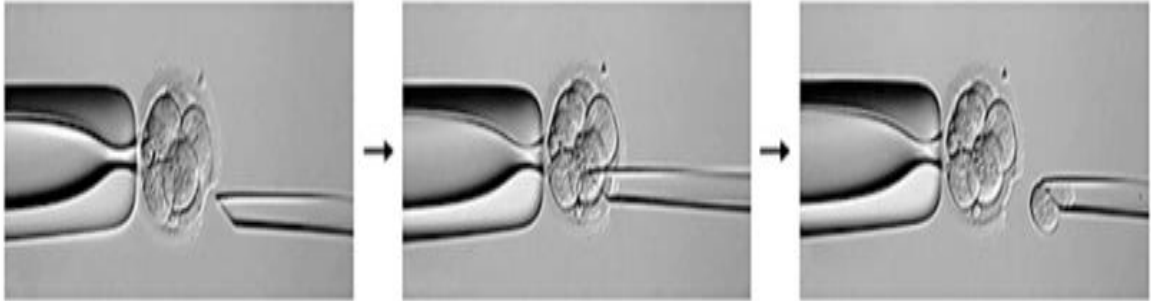
(Nguồn: <https://tudu.com.vn>)

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 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 nên kết quả không phản ánh được chính xác tình trạng rối loạn NST của phôi.

Phôi ngày 3 có tỷ lệ lệch bội NST và phôi ở thể khảm khá cao 50% [76] nhưng đến giai đoạn phôi nang tỷ lệ này giảm đáng kể còn 3-5% [77],[78],[79]. Như vậy, theo logic sinh thiết phôi ở giai đoạn phôi nang, nơi có tỷ lệ khảm thấp hơn, sẽ có kết quả sàng lọc rối loạn NST chính xác hơn.

Hơn nữa, một số phôi lệch bội NST ngày 3 có thể tự sửa chữa thành phôi bình thường khi phát triển thành phôi nang. Như vậy PGT vào ngày thứ 3 của

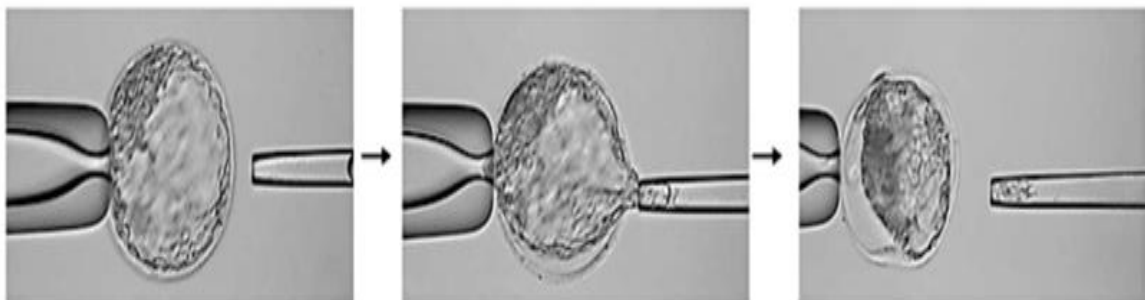
sự phát triển phôi không phải lúc nào cũng đại diện về tình trạng rối loạn NST của phôi.



Hình 1.9. Sinh thiết phôi ngày 3 lấy phôi bào

(Nguồn: Red Rock Fertility Center - USA)

Đối với sinh thiết phôi nang, khoảng 5-10 tế bào của nguyên bào lá nuôi (TE) 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 tia laser.



Hình 1.10. Sinh thiết phôi nang lấy tế bào ngoài phôi

(Nguồn: Red Rock Fertility Center - USA)

Sinh thiết phôi nang được thực hiện chủ yếu trên phôi tươi. Tuy nhiên Whitney và cộng sự (2016) đã chứng minh rằng việc rã đông phôi ngày 5 để sinh thiết và thực hiện xét nghiệm sàng lọc di truyền vẫn mang lại giá trị sàng lọc như phôi tươi ngày 5-6.

Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu về vị trí sinh thiết phôi, thời điểm sinh thiết phôi cũng như đánh giá nguy cơ trên trẻ sơ sinh có sinh thiết phôi.

Một nghiên cứu của Magli và cộng sự (2016) còn tiến hành hút dịch trong nang (blastocoelic fluid/BF) của phôi ngày 5, nhằm sử dụng DNA trong khoang dịch của phôi nang để khuếch đại hệ gen (Whole Genome Application-WGA) và tiến hành xét nghiệm di truyền cho phôi IVF và so sánh với kết quả xét nghiệm từ nguyên bào lá nuôi của phôi. Tuy nhiên tỷ lệ WGA chỉ thành công 82%. Độ phù hợp của phôi bình thường là 97,1% (67/69), với độ phù hợp trên mỗi nhiễm sắc thể là 98,4%. Hiện tại, nghiên cứu bổ sung đang được tiến hành với mục đích tối ưu hóa các kỹ thuật có thể phân tích các DNA của dịch trong nang của phôi nang, mở ra một hướng mới trong nghiên cứu đánh giá tình trạng di truyền của phôi [80].

Whitney và cộng sự (2019) đã thực hiện sinh thiết phôi ngày 7 để so sánh với sinh thiết phôi ngày 5, ngày 6. Nghiên cứu này được thực hiện ở những bệnh nhân có ít phôi nang và phôi phát triển chậm sau 144h, phôi này thường bị đánh giá thấp và xu hướng loại bỏ nhưng tác giả vẫn tiếp tục nuôi cấy thêm 24 giờ đến 168 giờ sau thụ tinh (phôi ngày 7) rồi tiến hành sinh thiết. Mặc dù, một số phôi ngày 7 vẫn có kết quả xét nghiệm sàng lọc di truyền bình thường, tuy nhiên kết quả cho thấy tỷ lệ thai làm tổ, tỷ lệ sinh sống của phôi ngày 7 vẫn thấp hơn phôi có kết quả xét nghiệm di truyền bình thường và hình thái tốt ở ngày 5-6 [81].

He và cộng sự (2019) đã so sánh: tuổi thai, cân nặng khi sinh và tỷ lệ sinh non, tình trạng nhẹ cân cũng như tình trạng thai nhi quá to (macrosomia) của 1.721 trẻ sơ sinh giữa nhóm có sinh thiết phôi nang và nhóm không sinh thiết phôi (nhóm chứng) để điều tra xem liệu sinh thiết phôi nang trong xét nghiệm di truyền trước làm tổ có làm tăng nguy cơ bất lợi ở trẻ sơ sinh hay không. Kết quả cho thấy sinh thiết phôi nang không làm tăng rủi ro bất lợi cho sơ sinh khi so sánh với nhóm đối chứng [82].

Như vậy, tại thời điểm này sinh thiết nguyên bào lá nuôi và xét nghiệm di truyền phôi ở giai đoạn phôi nang ngày 5-6 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 đoán. Vì sinh thiết phôi ở giai đoạn phân cắt có ảnh hưởng xấu đến sự phát triển của phôi so với sinh thiết phôi nang, làm cho tốc độ phát triển của phôi chậm đáng kể [83]. Trong khi đó, sinh thiết phôi nang, chỉ lấy nguyên bào lá nuôi, còn nguyên bào phôi bào vẫn được bảo tồn nên sự phát triển tiếp theo của phôi không bị ảnh hưởng mà tính đại diện cho phôi là cao hơn DNA trong dịch ở trong nang [84],[85]. Do đó, sinh thiết giai đoạn phôi phân cắt kém hơn sinh thiết phôi nang về cả độ chính xác cũng như mức độ tổn thương phôi.

Sau khi lấy sinh thiết phôi, các tế bào phôi được rửa trong dung dịch đệm phosphate (PBS+PVP) vô trùng, sau đó được chuyển sang phòng xét nghiệm để sàng lọc, chẩn đoán rối loạn NST.

1.5. Các kỹ thuật di truyền ứng dụng trong xét nghiệm di truyền trước làm tổ

1.5.1. Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH)

Nguyên lý: FISH (Fluorescence in situ hybridization) là kỹ thuật di truyền tế bào - phân tử 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 [86].

Kỹ thuật FISH được sử dụng lần đầu tiên để xét nghiệm phôi người vào năm 1992 [87]. Một vài nghiên cứu đã cho thấy sàng lọc phôi bằng kỹ thuật 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 nhiều nghiên cứu sau đó lại khẳng định, FISH không làm tăng hiệu quả cho IVF, do những

hạn chế nổi bật của kỹ thuật FISH, chỉ kiểm tra được một lượng giới hạn NST (tối đa là 12 cặp NST trong đó có 5 NST phổ biến là NST số 13, 18, 21, X, Y) từ 1 tế bào phôi ngày 3 nên tỷ lệ chẩn đoán âm tính giả cao, FISH không cho ra kết quả toàn diện về toàn bộ 24 NST của phôi thai [25],[71]. Các nghiên cứu đầu tiên sử dụng công nghệ sàng lọc toàn bộ NST cho thấy rằng 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 NST của phôi có bình thường hay không [25],[88],[89].

Một điểm hạn chế nữa của kỹ thuật FISH là kỹ thuật thực hiện khó, đòi hỏi kinh nghiệm khi cố định và dàn trải một phôi bào ra phiến kính. Kết quả 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. Mặt khác kỹ thuật FISH đòi hỏi thiết bị và chuyên môn cao nên khó triển khai rộng rãi trên quy mô lớn [90],[91].

Vì vậy hiện nay FISH ít được ứng dụng trong PGT-A

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. Kỹ thuật lai so sánh hệ gen (CGH)

Kỹ thuật CGH (Comparative Genomic Hybridization) là kỹ thuật di truyền tế bào - phân tử được phát triển trong thập niên 1990.

Kỹ thuật CGH khắc phục nhược điểm của kỹ thuật FISH, có thể đánh giá được rối loạn số lượng toàn bộ NST trong một tế bào ở giai đoạn kỳ giữa.

Nguyên lý: Kỹ thuật sử dụng việc đánh dấu toàn bộ hệ gen trên mẫu nghiên cứu và mẫu đối chứng, sau đó đem lai với nhau và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang để phát hiện sự mất cân bằng của bộ NST [92],[93].

Năm 2000, Voullaire và cộng sự đã ứng dụng lần đầu kỹ thuật CGH để phân tích rối loạn di truyền cho 63 tế bào phôi từ 12 phôi IVF, kết quả cho thấy tỷ lệ phôi bất thường rất cao, cao hơn so với các phát hiện bằng kỹ thuật FISH (chỉ 25% bình thường). Lần đầu tiên kỹ thuật CGH cho phép phát hiện thể khảm, đồng thời phát hiện ra bất thường trên nhiều cặp NST (19 cặp NST), khắc phục được hạn chế của kỹ thuật FISH (tối đa 12 NST). Điều đáng nói là có 3 trong số 12 phôi được ưu tiên lựa chọn để làm tổ dựa vào hình thái tốt thì có rối loạn NST dạng lệch bội và dạng khảm rất cao. Như vậy CGH cho phép loại trừ một tỷ lệ phôi hình thái bình thường nhưng có xác suất sống kém do rối loạn di truyền giúp có thể cải thiện tỷ lệ có thai sau khi IVF [94].

Tuy nhiên, kỹ thuật CGH cũng vấp phải giới hạn về độ phân giải, chỉ cho phép phát hiện các bất thường nằm trong giới hạn 10-20 Mb, có thể tới 5-10 Mb nên CGH vẫn còn nhiều hạn chế như chỉ có thể phát hiện rối loạn số lượng NST và rối loạn cấu trúc không cân bằng. CGH không thể phát hiện rối loạn thể cấu trúc mà không có thay đổi số bản sao, chuyển đoạn NST cân bằng và hoặc NST vòng. Thời gian phân tích kết quả của CGH lâu, khoảng 3-4 ngày.

1.5.3. Kỹ thuật lai so sánh hệ gen kết hợp microarray (aCGH)

Kỹ thuật lai so sánh hệ gen kết hợp microarray (Microarray-based Comparative Genomic Hybridization/ aCGH) đã giải quyết những tồn tại của CGH.

1.5.3.1. Nguyên lý hoạt động

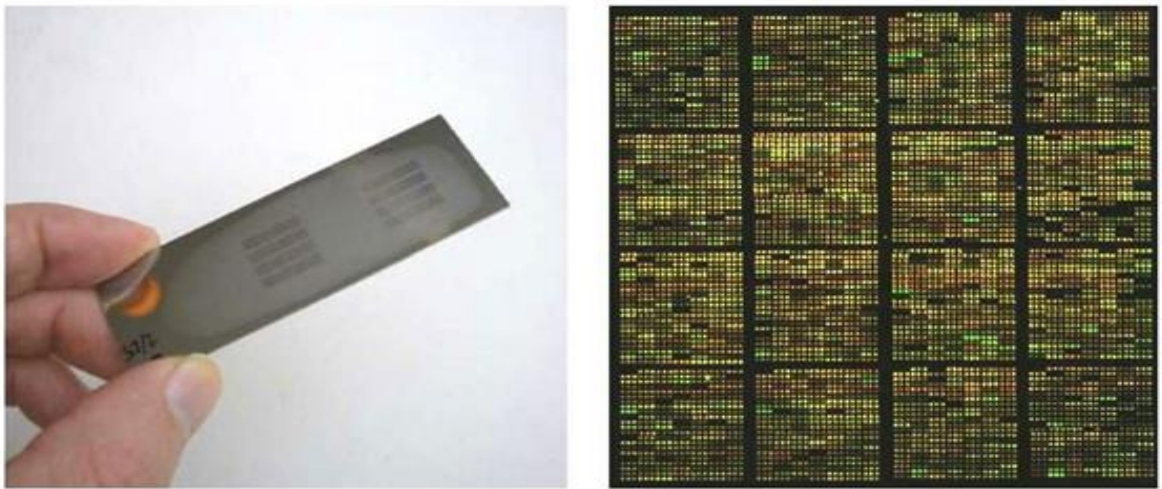
Nguyên lý hoạt động của aCGH giống CGH. Tuy nhiên trong kỹ thuật aCGH sử dụng các array hay còn gọi là các con chip DNA. Các con chip DNA được tạo thành từ các đoạn dò có kích thước nhỏ (oligo probe) bao phủ toàn bộ hệ gen của NST. Số lượng probe có thể lên tới 1.000.000/ array, có độ lặp lớn, vì vậy phát hiện được nhiều biến thể di truyền.

Có hai loại đoạn dò được sử dụng phổ biến trong kỹ thuật aCGH để phát hiện các bất thường của NST:

- ❖ *Các đoạn dò là nhiễm sắc thể vi khuẩn nhân tạo* (Bacterial artificial chromosomes/ BACs) chứa các đoạn ngắn DNA với kích thước thay đổi từ 75 đến 150 Kbp được sử dụng để phát hiện các thay đổi đơn bản (single copy) trong hệ gen với độ nhạy cao. Nhược điểm của BACs là không cho phép đánh giá những bất thường có kích thước bé hơn kích thước của các đoạn dò. Một nhược điểm khác của BACs là việc tạo ra các dòng BACs phục vụ cho kỹ thuật aCGH khá tốn kém và tiêu tốn nhiều thời gian.
- ❖ *Các đoạn dò oligonucleotit gọi tắt là oligo* là các đoạn DNA ngắn nhân tạo có kích thước từ 25 đến 85 bazơ (mer). Các oligonucleotit được thiết kế và tổng hợp khá dễ dàng, tùy theo mức độ thiết kế mà các đoạn dò oligonucleotit cho phép đánh giá toàn bộ hệ gen với độ phân giải rất cao, nhờ đó aCGH có thể phát hiện các trường hợp thừa hoặc mất các đoạn rất ngắn trong hệ gen.

Đã có nhiều nghiên cứu so sánh tính hiệu quả của BACs và các oligonucleotit trong việc phát hiện các bất thường trên hệ gen, kết quả cho thấy các oligonucleotit cho phép phát hiện nhiều bất thường hơn và các bất thường có kích thước nhỏ hơn so với BACs [95]. Về mặt thực hành aCGH được chia làm hai loại:

- + Array có mục tiêu (targeted array): gồm ít đoạn dò, phủ tối đa những vùng đã được biết có các gen gây bệnh.
- + Array toàn bộ hệ gen (whole genome array): gồm các đoạn dò phủ toàn bộ hệ gen.



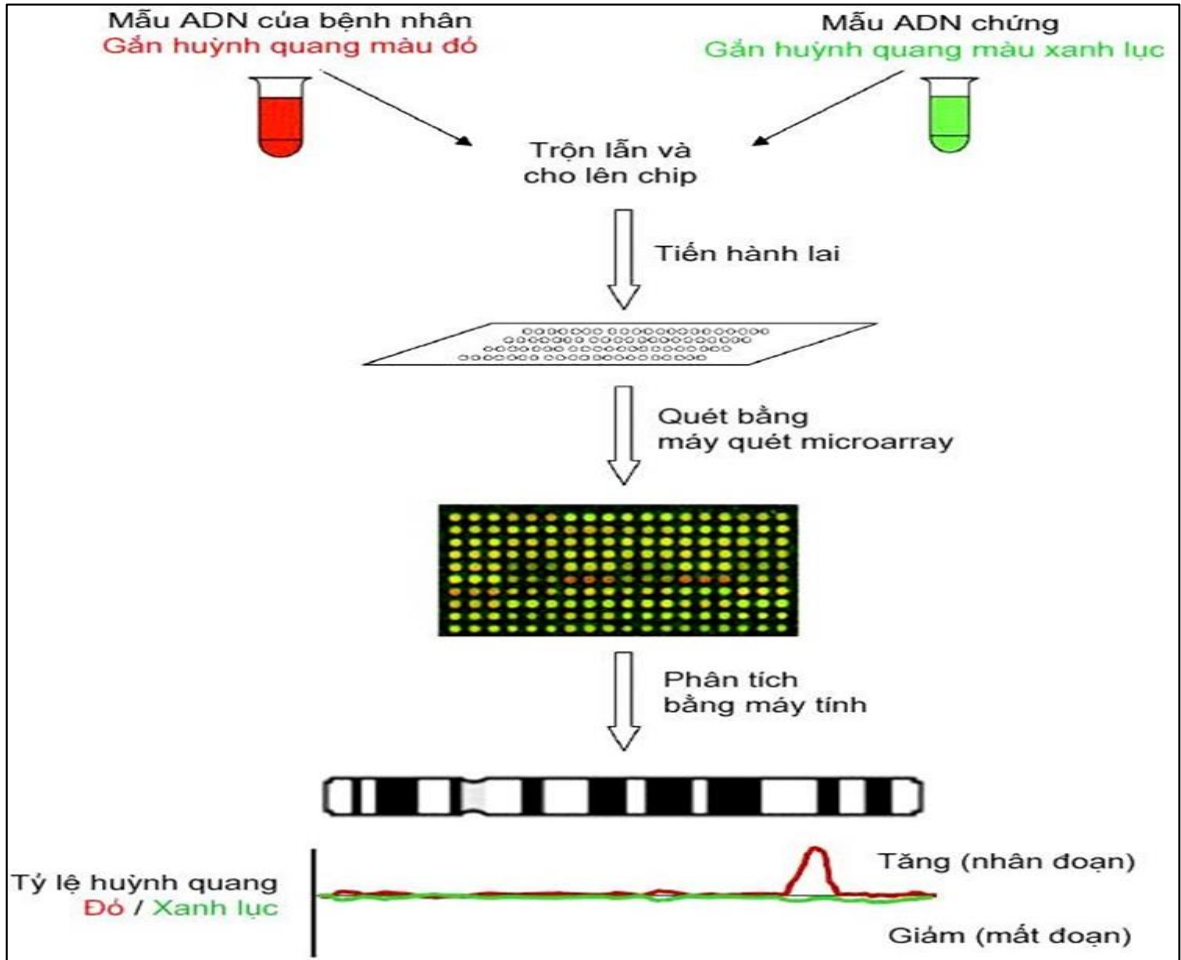
Hình 1.11. Chip sử dụng trong kỹ thuật microarray

1.5.3.2. Quy trình hoạt động

Đầu tiên mẫu DNA cần phân tích sẽ được cắt thành những đoạn ngắn, những đoạn DNA này được nhuộm màu huỳnh quang, mẫu DNA chứng không mang bất thường về mặt di truyền sẽ được nhuộm bằng một màu huỳnh quang khác, hai loại màu huỳnh quang được sử dụng phổ biến là màu đỏ và xanh lục. Sau đó hai mẫu DNA này sẽ được trộn lẫn với nhau và cho lên con chip để tiến hành quá trình lai. Các đoạn DNA này sẽ lai với các đoạn dò tương ứng trên con chip. Sau khi hoàn tất quá trình lai con chip sẽ được đọc trên máy quét microarray (microarray scanner) để đo lượng huỳnh quang màu đỏ và xanh lục ứng với mỗi vị trí trên con chip (hình 1.11) [96],[97],[98] và phân tích bằng phần mềm chuyên dụng trên máy tính để tính tỉ số giữa màu huỳnh quang đỏ và xanh lục tại mỗi vị trí ứng với một đoạn dò đặc hiệu trên chip để xác định tình trạng thừa, thiếu hoặc cân bằng vật liệu di truyền giữa mẫu DNA cần phân tích và DNA chứng tại vị trí đó (hình 1.12) [99],[100].

Nếu mẫu DNA cần phân tích có lượng bình thường sẽ thể hiện trên chip bằng màu vàng do có sự cân bằng giữa lượng DNA cần phân tích và mẫu DNA chứng, nếu bị thừa DNA sẽ thể hiện bằng màu đỏ do có lượng DNA cần

phân tích nhiều hơn so với mẫu DNA chứng và nếu bị thiếu DNA sẽ thể hiện bằng màu xanh lá cây do có lượng DNA cần phân tích ít hơn so với mẫu DNA chứng.



Hình 1.12. Quy trình hoạt động của kỹ thuật aCGH

1.5.3.3. Ứng dụng aCGH trong sàng lọc phôi

Kỹ thuật này đã được áp dụng thành công trong chẩn đoán trước làm tổ từ năm 2004 [101]. Năm 2010, phương pháp này đã được kiểm chứng xác minh và được ứng dụng trong điều trị lâm sàng phục vụ chẩn đoán trước làm tổ ở một số nước tiên tiến như Hoa Kỳ và Châu Âu [25].

Năm 2004, Hu và cộng sự đã sử dụng aCGH để phát hiện các lệch bội NST của NST số 13 và 15 và trong các tế bào đơn sau khi khuếch đại bằng kỹ

thuật DOP-PCR (Degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction). Cùng năm, kỹ thuật aCGH cũng được Wells và cộng sự áp dụng thành công cho việc phát hiện lệch bội trong các tế bào đơn lẻ sau khi khuếch đại toàn bộ bộ gen bằng DOP-PCR hoặc một phương pháp thay thế được gọi là khuếch đại đa chuyển vị [102],[103]. Kỹ thuật aCGH cho phép phân tích NST toàn diện trong vòng chưa đầy 48 giờ với kỹ thuật thuận tiện.

Theo Traversa và cộng sự năm 2011, sử dụng phương pháp aCGH thấy 43% phôi nang bị lệch bội NST trong đó 55% lệch bội NST ở 1 cặp NST, 41% ở 2 cặp và 7% phức tạp (≥ 3 cặp NST) [104].

Năm 2011, Alfarawati sử dụng phương pháp aCGH kiểm tra 500 phôi nang và thấy 283 (56,7%) có lệch bội [105].

Rubio và cộng sự năm 2013 sử dụng phương pháp aCGH kiểm tra phôi của 556 bệnh nhân có tiền sử sảy thai liên tiếp, phôi không làm tổ liên tiếp, vô sinh nam, và phụ nữ lớn tuổi, thấy tỷ lệ lệch bội NST là 73,5% [106].

Hiện nay, có thể nói aCGH là kỹ thuật hiệu quả cho phép phân tích một cách toàn diện bộ NST.

Ưu điểm:

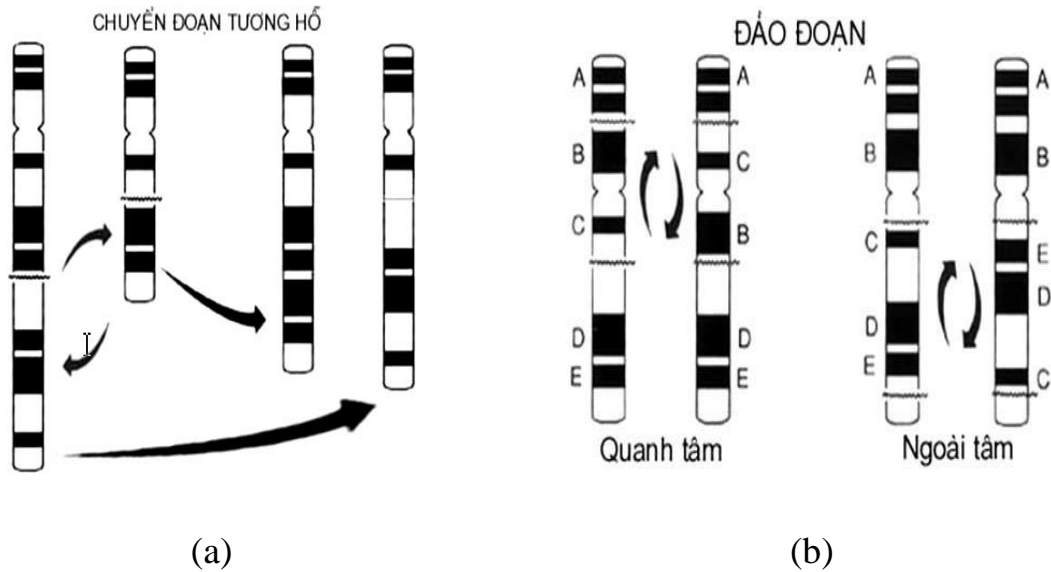
- Kỹ thuật aCGH có khả năng đánh giá toàn bộ 46 NST chỉ trong một xét nghiệm duy nhất và phát hiện các bất thường mất cân bằng của NST bao gồm các trường hợp lệch bội, mất hoặc nhân đoạn của NST chính xác hơn nhiều so với phương pháp lập karyotype.
- Kỹ thuật aCGH cho phép phát hiện các bất thường của NST ngay cả khi không có định hướng trong chẩn đoán, đây là một ưu thế của aCGH so với kỹ thuật FISH.

- aCGH cũng phát hiện được các trường hợp khảm, tuy nhiên sự chính xác trong chẩn đoán còn phụ thuộc vào tỷ lệ giữa dòng tế bào bình thường và dòng tế bào đột biến [107],[108]. Trong trường hợp khảm với dòng tế bào đột biến dạng lệch bội, aCGH cho phép phát hiện được ở mức khảm từ 10% trở lên trong khi đó tình trạng khảm với dòng tế bào đột biến mang nhân đoạn hoặc mất đoạn của một NST được phát hiện ở mức khảm từ 20-30% trở lên [109].

Nhược điểm:

- Xuất phát từ nguyên tắc của kỹ thuật, các chip aCGH được sử dụng cho PGT có khoảng 4.000 - 1.000.000 điểm đánh dấu (chạy trùng lặp) được đặt cách nhau trong bộ gen. aCGH là một giao thức ghi nhận tỷ lệ trong đó mẫu lâm sàng được so sánh với các mẫu DNA 46,XY và 46,XX bình thường. Nhưng do không có kiểu gen được tạo ra nên aCGH không thể phân biệt giữa 46,XX từ 69,XXX hoặc 46,XY từ 69,XXY do đó một số trường hợp dù đã được xét nghiệm sàng lọc trước làm tổ vẫn cần tư vấn làm xét nghiệm chẩn đoán trước sinh (lập karyotype) khi cần thiết.
- aCGH không xác định bất thường di truyền đơn gen. Các aCGH được sử dụng cho PGT bởi tất cả các phòng thí nghiệm thương mại chỉ có thể xác định toàn bộ NST và không được thiết kế hoặc xác nhận để xác định rối loạn cấu trúc NST. Đặc biệt là các trường hợp bất thường trong cấu trúc NST ở dạng cân bằng như chuyển đoạn cân bằng và đảo đoạn do không xảy ra tình trạng thừa hoặc thiếu vật liệu di truyền (hình 1.13) [95],[110].
- aCGH cũng không thể phát hiện được các trường hợp khảm có tỷ lệ khảm thấp hơn 10% đối với trường hợp lệch bội và dưới 20-30% đối với trường hợp bất thường cấu trúc NST dạng mất cân bằng [109].

Các trường hợp bệnh lí di truyền gây ra do đột biến điểm, loại đột biến gen chỉ liên quan đến một cặp base trên DNA và các trường hợp đột biến gen mà trong đó số cặp base bị ảnh hưởng bé hơn số base được sử dụng làm đoạn dò trong kỹ thuật aCGH sẽ không thể được chẩn đoán bằng kỹ thuật aCGH.



Hình 1.13. Các dạng bất thường NST cân bằng

(a) Chuyển đoạn tương hỗ giữa 2 cặp NST không tương đồng

(b) Đảo đoạn quanh tâm và đảo đoạn ngoài tâm

1.5.4. Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS)

1.5.4.1. Khái niệm và nguyên lí hoạt động

Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing/ NGS) 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 1500 bp, hay pyrosequencing không quá 100 bp, thì giải trình tự thế hệ mới cho phép giải được từ 36 Gb đến 600 Gb, có nghĩa là cho phép giải trình tự nguyên hệ 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 hệ gen.

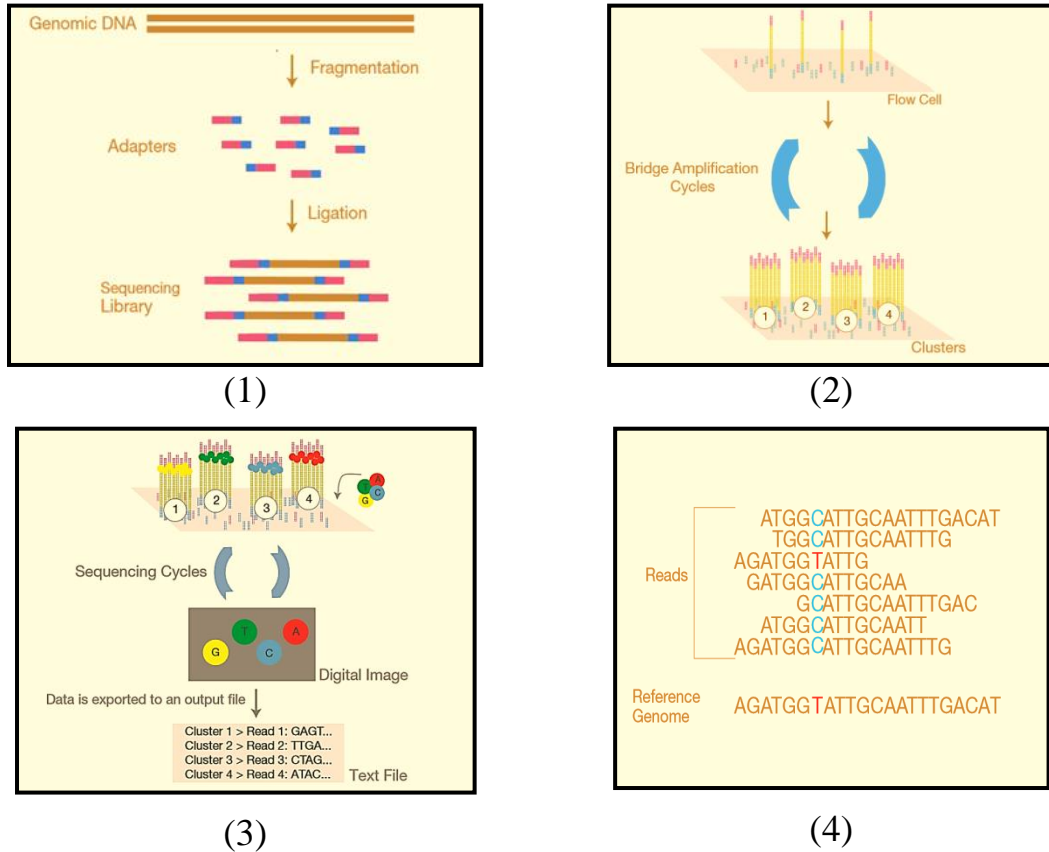
Mặc dù aCGH là kỹ thuật đầu tiên cho phép sàng lọc được cả 24 NST và hiện đang được ứng dụng rộng rãi trong sàng lọc lệch bội NST của phôi trước làm tổ tại nhiều trung tâm IVF trên thế giới [25],[103],[106]. Tuy nhiên, công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) gần đây cũng đã được ứng dụng trong sàng lọc lệch bội NST của phôi trước làm tổ với độ chính xác cao, tỉ lệ thành công cao và giá thành hợp lý [111],[112].

1.5.4.2. Quy trình hoạt động kỹ thuật NGS

Quy trình hoạt động của NGS bao gồm 4 giai đoạn chính (hình 1.14):

- + Chuẩn bị thư viện (1): 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). 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.
- + Khuếch đại cầu các đoạn DNA (2): Sau khi đã chuẩn bị được thư viện là các phân đoạn DNA, các thư viện này sẽ được khuếch đại bằng phương pháp PCR. Sau đó tiến hành tinh sạch sản phẩm PCR và được đo nồng độ bằng phương pháp định lượng Qubit, nếu nồng độ đạt tiêu chuẩn sẽ được tiến hành chuẩn hóa thư viện để phục vụ giải trình tự.
- + Giải trình tự (3): Thư viện được đưa lên máy và giải trình tự gen thế hệ mới như NextSeq hoặc Miseq.
- + Phân tích số liệu (4): Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm Bluefuse. 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>.



Hình 1.14. Quy trình thực hiện giải trình tự gen thế hệ mới NGS

1.6. Tình hình ứng dụng kỹ thuật NGS trong PGT trên thế giới và Việt Nam

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 làm tổ dựa trên kỹ thuật NGS có nhiều điểm khác so với các kỹ thuật khác. NGS thực hiện chỉ cần 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 các kỹ thuật ra đời trước đó 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 [113].

Một nghiên cứu của Fiorentino và cộng sự (2014) chứng minh rằng kỹ thuật sàng lọc 24 NST dựa trên NGS có độ phân giải cao và cho phép phát hiện chính xác sự mất cân bằng phân đoạn nhỏ đến ~14 Mb, NGS cho phép kiểm tra được hơn 100.000.000 điểm/bộ NST (NST). Tiềm năng xác định các thay đổi phân đoạn cũng đã được báo cáo trong các nghiên cứu xác nhận trước đó trên các tế bào đơn và được khẳng định trên phôi ở giai đoạn phôi nang. Phát hiện lệch bội NST, lặp đoạn hoặc mất đoạn một cách chính xác (99,9%) , độ nhạy 100%. Có thể xét nghiệm được toàn bộ bộ NST 1 lần. Quy trình có thể được hoàn thành trong <24 h, một khung thời gian tương thích với việc chuyển phôi tươi [22].

Nghiên cứu của Zhou và cộng sự (2018) trên 5.735 phôi nang của 1.854 cặp vợ chồng, thực hiện PGT-A (n = 770) và PGT-SR (n = 1.084). Kết quả là 1.686 phôi nang bình thường sau PGT đã được chuyển vào buồng tử cung dẫn đến mang thai lâm sàng, 49% ở nhóm có thực hiện PGT-SR và 47% ở nhóm có thực hiện PGT-A. Tỷ lệ sảy thai là khoảng 9% ở cả hai nhóm. Tại thời điểm công bố, có 84 xét nghiệm chẩn đoán trước sinh và 645 trẻ sinh được coi là bình thường và khỏe mạnh. Đặc biệt, tần suất của rối loạn cấu trúc NST (lệch bội từng phần NST) của phôi nang là 10,13% (581/5.735); hiện tượng này không liên quan đến tuổi mẹ và xảy ra trên tất cả các nhiễm sắc thể. Và trong số đó có 40 phôi nang với rối loạn cấu trúc NST phát hiện bởi NGS được hiến tặng để nghiên cứu tiếp theo, phân tích lại bằng lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) để xác nhận tính chính xác của NGS. 39 phôi đã được rửa đông thành công và cố định để phân tích bằng FISH. FISH xác nhận phôi lệch bội từng phần trong tất cả 39 phôi nang. Như vậy, lệch bội từng phần NST với kích thước >16 Mb xảy ra trong phôi nang và có thể được phát hiện bởi NGS [114].

Theo Escribà và cộng sự (2019), ứng dụng NGS để phát hiện được các lệch bội NST của phôi nang, đặc biệt tập trung phân tích lệch bội từng phần NST với kích thước >5 Mb. Kết quả cho thấy tỷ lệ phôi lệch bội là 53,5% (1.909/3.565), trong đó 8,4% (299/3.565) phôi nang biểu hiện lệch bội từng phần ở một hoặc nhiều nhiễm sắc thể [115].

Nghiên cứu của Liss và cộng sự (2018) đã phân tích tỷ lệ sinh trong các chu kỳ IVF ở 112 phôi được xét nghiệm di truyền trước làm tổ bằng NGS và 85 phôi không được xét nghiệm sàng lọc (nhóm chứng). Tỷ lệ sinh sống trên một chu kỳ có ứng dụng NGS cao hơn ~ 18,5% so với nhóm chứng (42,0% so với 23,5% tương ứng; $p = 0,012$). Sự khác biệt giữa nhóm nghiên cứu và nhóm chứng cũng có ý nghĩa đối với có thai lâm sàng (42,0% so với 23,5% tương ứng; $p = 0,012$), có thai sinh hóa (41,2% so với 22,2% tương ứng; $p = 0,001$) và tỷ lệ sảy thai (9,6% so với 28,6% tương ứng, $p = 0,027$). Kết quả cho thấy PGT/NGS là một phương pháp hữu ích để lựa chọn phôi và nên được thực hiện trong thực hành lâm sàng thường quy để cải thiện tỷ lệ thành công của IVF [116].

Theo báo cáo của Rechistky và cộng sự (2019) về việc ứng dụng NGS vào PGT-M để phát hiện phôi có nguy cơ mắc các ung thư liên quan đến di truyền (bao gồm ung thư vú và ung thư buồng trứng di truyền (*BRCA1* và *BRCA2*), hội chứng Li Fraumeni (*LFD1*) và polyp tuyến thượng thận gia đình (*APC*)), 702 phôi nang của 383 cặp vợ chồng có nguy cơ được thực hiện PGT-M. Kết quả có 684 phôi bình thường trải qua 484 chu kỳ chuyển phôi. Kết quả là 282 sản phụ mang thai và 316 đứa trẻ được sinh ra mà không có đột biến gây ung thư. Các cũng báo cáo rằng việc đồng thời sàng lọc lệch bội 24 NST khi tuổi mẹ cao đã làm tăng tỷ lệ mang thai trong nhóm PGT-M tăng từ 50% đến 70% và giảm tỷ lệ sảy thai từ 14% xuống 9% [117].

Gần đây, Ramos và cộng sự (2019) đã chứng minh sử dụng NGS để PGT-A cho phôi đông ngày 5, vẫn mang lại giá trị sàng lọc như phôi tươi ngày 5. Tỷ lệ có thai tương đương cả 2 nhóm với sinh thiết phôi đông (67%) và sinh thiết phôi tươi (69%). Điều này giúp cho các cặp vợ chồng có phôi đông vẫn có cơ hội để tham gia PGT và giúp giảm bớt những lo ngại liên quan đến việc đưa phôi vào 2 quá trình thủy tinh hóa và rã đông phôi [118].

Các kết quả lâm sàng thu được trong các nghiên cứu từ chu trình PGT được thực hiện với phương pháp NGS rất đáng khích lệ, theo Fragouli và cộng sự (2010); Fiorentino và cộng sự (2011); Forman và cộng sự (2012); Scott và cộng sự (2013), tỷ lệ mang thai lâm sàng đã tăng đáng kể 62%-63,8% (tuổi trung bình $38,5 \pm 2,1$ tuổi).

Friedenthal và cộng sự (2018) đã đánh giá sự khác biệt về kết quả mang thai khi sử dụng NGS so với aCGH trong phôi chuyển đông lạnh đơn (single thawed euploid embryo transfer/ STEET) trong một đánh giá hồi cứu. Tổng cộng có 916 chu kỳ STEET từ 2014 đến 2016 đã được xem xét và bao gồm 548 trường hợp NGS và 368 trường hợp sử dụng aCGH. Các kết quả được phân tích bao gồm tỷ lệ mang thai, tỷ lệ sinh sống và tỷ lệ sảy thai. Tỷ lệ mang thai cao hơn đáng kể ở nhóm NGS so với nhóm aCGH (71,6% so với 64,6%). Tỷ lệ sinh sống ở nhóm NGS cao hơn đáng kể (62% so với 54,4%). Tỷ lệ sảy thai tự nhiên không khác biệt đáng kể trong nhóm NGS so với nhóm aCGH (12,4% so với 12,7%). Tác giả kết luận rằng PGT-A sử dụng NGS cải thiện đáng kể kết quả mang thai so với PGS sử dụng aCGH trong chu kỳ STEET. NGS có khả năng xác định và sàng lọc phôi khảm, phôi lệch bội từng phần hoặc tam bội. Kết quả mang thai nhờ ứng dụng NGS có thể được cải thiện do loại trừ được các phôi bất thường này [18].

Ở Việt Nam thụ tinh trong ống nghiệm được thực hiện từ năm 1998. Hiện nay, trên toàn quốc đã có 34 trung tâm IVF được cấp phép hoạt động và thực hiện khoảng 30 nghìn chu kỳ điều trị vô sinh, hiếm muộn mỗi năm. Tuy nhiên, các nghiên cứu về ứng dụng sàng lọc di truyền cho phôi trước làm tổ chưa nhiều, kỹ thuật ứng dụng trước đó là FISH và aCGH mà có nghiên cứu nào về ứng dụng kỹ thuật NGS. Nghiên cứu này của chúng tôi là nghiên cứu đầu tiên về NGS, bắt đầu thực hiện từ năm 2016.

1.7. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể của noãn và phôi

1.7.1. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở noãn

Tỷ lệ lệch bội NST ở noãn tương đối cao và tăng dần ở phụ nữ lớn tuổi. Theo 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 lệch bội NST ở nhóm <35 tuổi là 50%; 35-39 tuổi là 60% và trên 40 tuổi là 66,7%) [119].

Sher và cộng sự khi sử dụng phương pháp CGH cho noãn của phụ nữ <35 tuổi thấy 64% bị lệch bội NST. Noãn bị lệch bội NST sẽ dẫn tới phôi bị lệch bội 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 lệch bội NST [120].

1.7.2. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở tiền nhân

Giannaroli và cộng sự (2003), dùng phương pháp FISH 8 đầu dò (X, Y, 13, 15, 16, 18, 21, 22) kiểm tra 496 phôi thấy tỷ lệ lệch bội 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 lệch bội NST [121].

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 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) [122].

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 lệch bội 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 lệch bội NST. Tỷ lệ lệch bội 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 thường [123].

1.7.3. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi ngày 3

Sau khi thụ tinh phôi thường được nuôi cấy thêm khoảng 3 ngày (giai đoạn phân chia) đến 5-6 ngày (giai đoạn phôi nang). Trên 50% phôi tạo ra trong ống nghiệm ở giai đoạn phân chia có lệch bội NST, tỷ lệ này tăng lên đến trên 80% ở phụ nữ lớn tuổi. Năm 2012, AlAsma và cộng sự dùng phương pháp FISH 9 đầu dò (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, Y) đánh giá 393 phôi ngày 3 của 70 bệnh nhân có tuổi trung bình 34,6 có tiền sử sảy thai bị lệch bội NST (thai tự nhiên hay thai IVF), tỷ lệ lệch bội NST là 67,8%. NST có tỷ lệ lệch bội cao là 16 và 22 [124].

Rabinowitz và cộng sự (2012) sử dụng kỹ thuật aSNP đánh giá 274 phôi ngày 3 của 32 phụ nữ (tuổi từ 26-47, trung bình 38) thấy tỷ lệ lệch bội NST là 72,3%, tỷ lệ này là 65,7% và 76,2% tương ứng lần lượt với phụ nữ ≤ 36 tuổi và trên 36 trong đó 19,7% có một NST bị ảnh hưởng, 52,5% có nhiều NST bị rối loạn [125].

Trong thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên của Rubio và cộng sự (2013) sử dụng FISH với 9 đầu dò 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X và Y nghiên cứu 265 phôi ngày 3 của 91 phụ nữ có phôi không làm tổ liên tiếp (tuổi trung bình 35,2), và 485 phôi của 93 phụ nữ lớn tuổi (41-44 với tuổi trung bình là 41,8), tỷ lệ lệch bội NST tương ứng là 57,3% và 69,2%. Trong nghiên cứu này NST bị ảnh hưởng nhiều nhất ở phụ nữ bị phôi không làm tổ liên tiếp lần lượt là 22, 13, 16, 21, 18, XY, 15 và 17, và ở nhóm phụ nữ lớn tuổi là 22, 16, 21, 15, 13, 18, 17 và X,Y [64].

Trong một nghiên cứu khác của Rubio và cộng sự (2013) sử dụng phương pháp aCGH kiểm tra phôi của 556 bệnh nhân có tiền sử sảy thai liên tiếp, phôi không làm tổ liên tiếp, vô sinh nam, và phụ nữ lớn tuổi, thấy tỷ lệ lệch bội NST là 73,5% [106].

Ở Việt Nam sàng lọc phôi trước làm tổ đang bắt đầu phát triển, trong một nghiên cứu sơ bộ bước đầu đánh giá kết quả sàng lọc trước làm tổ, Nguyễn Viết Tiên và cộng sự (2014) sử dụng phương pháp FISH đánh giá 5 NST 13, 18, 21, X, Y đã công bố tỷ lệ lệch bội NST của 37 phôi ngày 3 là 45,9%, hay gặp nhất ở NST 21, thấp nhất ở NST giới tính và NST 13 [126].

Trong một nghiên cứu khác của Hoàng Thị Hương và cộng sự (2014), cũng sử dụng phương pháp FISH 5 đầu dò cho 127 phôi ngày 3 có 68 phôi bào, thấy tỷ lệ lệch bội NST là 46,4%, hay gặp nhất là NST 21, sau đó là 13 và thấp nhất là NST giới tính [127].

1.7.4. Tỷ lệ lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi nang

Mặc dù một số phôi bất thường ngừng phát triển từ giai đoạn ngày 3 và 5 nhưng phần lớn vẫn phát triển đến giai đoạn phôi nang. Ở giai đoạn phôi nang, trên 40% phôi bị lệch bội NST, tỷ lệ này tăng cùng với tuổi mẹ. Schoolcraft và cộng sự (2010), sử dụng phương pháp CGH trên 269 phôi

nang của 45 bệnh nhân có tuổi trung bình là 37 tuổi thấy tỷ lệ lệch bội NST là 51,3% [128]

Fragouli và cộng sự (2010) cũng dùng CGH ở nhóm bệnh nhân tuổi trung bình 39,8 thấy tỷ lệ lệch bội NST ở phôi nang là 45,2% [129].

Traversa và cộng sự (2011), sử dụng phương pháp aCGH thấy 43% phôi nang bị lệch bội NST trong đó 55% lệch bội NST ở 1 cặp NST, 41% ở 2 cặp và 7% phức tạp (≥ 3 cặp NST) [104].

1.7.5. Tỷ lệ phôi thể khảm

Nhờ có kỹ thuật IVF mà các bất thường về NST của phôi người giai đoạn trước làm tổ đã được phát hiện. Vào năm 1993, Delhanty và cộng sự lần đầu tiên công bố hiện tượng phôi thể khảm giai đoạn trước làm tổ [130]. Phôi thể khảm có thể chứa dòng phôi bào bình thường với dòng phôi bào bất thường, hoặc có thể chứa các dòng phôi bào bất thường khác nhau.

Tỷ lệ phôi thể khảm thay đổi từ 15% [10] lên đến trên 90% [131]. Một trong những lý do khiến tỷ lệ phôi thể khảm chênh lệch khá nhiều ở các nghiên cứu khác nhau là do tiêu chuẩn xác định phôi thể khảm được sử dụng khác nhau. Ví dụ, trong nghiên cứu của Baart và cộng sự (2006) và nghiên cứu của Ziebe và cộng sự (2003), nếu có mặt một số lượng nhỏ phôi bào bất thường trong phôi vẫn được coi là phôi bình thường [132],[133]. Các tác giả này cho rằng những phôi này vẫn có khả năng phát triển bình thường. Một nguyên nhân khác là nhiều nghiên cứu về phôi thể khảm được tiến hành trên những phôi thừa, không được sử dụng để chuyển phôi hoặc dự trữ đông lạnh, những phôi này thường có chất lượng kém hơn. Van Echten Arends (2011) phân tích tổng hợp (metaanalysis) 36 nghiên cứu riêng lẻ về hiện tượng phôi thể khảm ở ngày 3, thấy trong 815 phôi thừa, chỉ có 177 (22%) phôi là bình thường, 599 (73%) phôi thể khảm và 39 (5%) phôi có các bất thường NST

khác. Trong số các phôi thể khảm, 480 phôi (59% số phôi nghiên cứu) có chứa cả dòng phôi bào bình thường và dòng phôi bào bất thường [134].

Voullaire và cộng sự (2002), cũng khẳng định thể khảm là rất phổ biến ở phôi người giai đoạn sớm, và các phôi có chứa các tế bào bất thường riêng lẻ hoặc hỗn hợp nhiều loại bất thường [135].

Phôi thể khảm thường chỉ phát triển 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 [136]. Santos và cộng sự nghiên cứu 18 phôi dâu, thấy tỷ lệ phôi thể khảm giảm từ 83% trong ngày 4 xuống còn 42% ở phôi nang ngày 8 [137].

1.7.6. Hiện tượng tự sửa chữa của phôi lệch bội nhiễm sắc thể ngày 3

Phôi ngày 3 có tỷ lệ lệch bội NST và phôi ở thể khảm khá cao [138] nhưng đến giai đoạn phôi nang tỷ lệ này giảm đáng kể [139]. Một số phôi lệch bội NST ngày 3 có thể tự sửa chữa thành phôi bình thường khi phát triển thành phôi nang. Năm 2001, Sandalinas sử dụng FISH cho 8 cặp NST (1, 13, 15, 16, 18, 21, 22 và XY) để nghiên cứu lại những phôi được kết luận là bất bình thường theo kết quả của FISH ngày 3 thấy rằng 15% (32/216) có kết quả bình thường sau khi phân tích lại. 66% phôi sửa chữa thành bình thường phát triển đến giai đoạn phôi nang trong khi đó 19% phôi có lệch bội NST phát triển đến giai đoạn phôi nang [140]. Theo Li và cộng sự (2005) sử dụng FISH theo dõi 5 cặp NST 13, 18, 21, X và Y của phôi nang (ngày 5-6) phát triển từ phôi mà ngày 3 đã chẩn đoán là lệch bội NST đã kết luận: 19,6% phôi lệch bội NST ngày 3 phát triển đến giai đoạn phôi nang trong số đó 40% được chẩn đoán lại bình thường [141].

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

- + Các phôi bào có số lượng NST bình thường có khả năng phân chia tốt hơn, các phôi bào bất thường bị ngừng phát triển; đồng thời những phôi bào bình thường này sẽ có xu hướng di chuyển và biệt hóa thành mầm phôi [142],[143].
- + Hệ thống gen của phôi chưa hoàn toàn hoạt hóa vào ngày thứ 3 của giai đoạn phân chia [144]. Chất lượng của noãn và các protein, các chất sao chép gen của noãn bị giảm đi theo thời gian do sự tích tụ của các tia xạ, các chất độc hại, các tác động oxy hóa gây tổn thương ty thể, các telomere ngắn lại dẫn đến mất kiểm soát chu kỳ tế bào tạo ra những sai lệch về NST. Hiện tượng này đặc biệt nghiêm trọng ở những phụ nữ lớn tuổi, tạo nên những sai sót trong sự phân ly của NST trong lần phân chia đầu tiên, tạo nên phôi bị thể khảm. Sau khi gen của phôi được hoạt hóa, cơ chế chết theo chương trình (apoptosis) và các điểm kiểm soát trong chu kỳ tế bào trở nên hoạt hóa, làm giảm số lượng các phôi bào bất thường NST ở giai đoạn phôi nang.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là các phôi nang IVF (phôi ngày 5-6).

- + Mục tiêu 1: Đối tượng nghiên cứu là 24 phôi nang của bệnh nhân IVF để hoàn thiện quy trình sàng lọc rối loạn 24 NST bằng kỹ thuật NGS.
- + Mục tiêu 2,3: Đối tượng nghiên cứu là 52 phôi nang của bệnh nhân IVF để đánh giá độ chính xác của kỹ thuật NGS và đánh giá tính ứng dụng của kỹ thuật NGS trong sàng lọc 24 NST trước làm tổ.

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

- + Bệnh nhân có phôi nang (phôi ngày 5-6) và tự nguyện tham gia hiến phôi để nghiên cứu.
- + Hồ sơ đầy đủ các thông tin: Tuổi, thời gian vô sinh, loại vô sinh, nguyên nhân vô sinh, tình trạng mang thai trước đó, tiền sử điều trị IVF.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- + Các phôi ngày 3.
- + Hồ sơ thông tin của bệnh nhân không đủ.
- + Các bệnh nhân bỏ nghiên cứu, không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Địa điểm nghiên cứu

- + Trung tâm hỗ trợ sinh sản Bệnh viện Phụ sản Hà Nội.
- + Viện mô phôi lâm sàng Quân đội.
- + Phòng xét nghiệm DNA thuộc Bộ môn giải phẫu của Học viện Quân Y Việt Nam.
- + Trung tâm Xét nghiệm di truyền trước làm tổ, Đại học quốc gia Singapore.
- + Bộ môn Y Sinh học - Di truyền, Đại học Y Hà Nội.

2.3. Thời gian nghiên cứu

Đề tài được tiến hành nghiên cứu trong thời gian 4 năm, từ tháng 9 năm 2016 đến tháng 9 năm 2020.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

2.4.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

- + Mục tiêu 1: hoàn thiện quy trình, không áp dụng công thức tính cỡ mẫu. Chúng tôi đã sử dụng tới 24 mẫu phôi nang để thực hiện nghiên cứu.
- + Mục tiêu 2,3: cần ước tính một tỷ lệ trong quần thể với sai số tương đối nên chúng tôi sử dụng công thức tính cỡ mẫu sau:

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

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

ε là độ sai lệch của nghiên cứu so với thực tế (vì khi nghiên cứu chỉ là kết quả của một quần thể = n mà không phải toàn thể cộng đồng nên khi áp dụng cho cộng đồng sẽ có sai lệch ε).

p biểu thị một tỷ lệ đại diện cho 1 tiêu thức nghiên cứu (tỷ lệ bệnh, tỷ lệ rối loạn NST) được xác định ở mục tiêu nghiên cứu và liên quan đến độ sâu của nghiên cứu.

Áp dụng vào nghiên cứu này:

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

- $p = 53\% = 0,53$ (tỷ lệ phôi bị lệch bội NST, trích dẫn tài liệu của Magli 2007 [145]).
- $\varepsilon = 0,27$ (giới hạn cho phép về thống kê).

Thay số liệu vào công thức trên ta có:

$$n = \frac{1,96^2 \times (1 - 0,53)}{0,27^2 \times 0,53} = 47$$

Như vậy, số phôi tối thiểu cần thu thập, phân tích cho mục tiêu 2 và mục tiêu 3 là 47. Thực tế, trong thời gian nghiên cứu, chúng tôi đã có 52 phôi đủ tiêu chuẩn để phục vụ mục tiêu 2,3.

2.4.3. Các định nghĩa được dùng trong nghiên cứu

- ❖ **Nhiễm sắc thể:** là vật thể di truyền tồn tại trong nhân tế bào, bắt màu bằng thuốc nhuộm kiềm tính, do vật chất di truyền tập trung lại thành những sợi ngắn và có số lượng, hình dạng kích thước đặc trưng cho mỗi loài. Ở người, trong mỗi tế bào có $2n = 46$ NST, bao gồm 23 cặp NST (22 cặp NST thường và 1 cặp NST giới tính). Ở nam giới cặp NST giới tính là XY và ở nữ giới cặp NST giới tính là XX. Do vậy nam giới có 24 loại NST, nữ giới có 23 loại NST.
- ❖ **Lệch bội:** là hiện tượng số lượng NST của tế bào tăng lên hoặc giảm đi 1 hoặc vài NST so với bộ NST lưỡng bội ($2n$).
- ❖ **Đơn bội:** là một dạng đột biến số lượng NST, trong đó tế bào đột biến chứa một nửa số nhiễm sắc thể (n).
- ❖ **Đa bội:** là một dạng đột biến số lượng NST, trong đó tế bào đột biến chứa nhiều hơn 2 lần số đơn bội NST ($3n, 4n, 5n, 6n\dots$).

- ❖ **Rối loạn cấu trúc NST:** là sự thay đổi trong cấu trúc của từng NST dẫn đến sắp xếp lại các gen, hay tăng hoặc giảm số lượng gen trên NST (lệch bội từng phần) dẫn đến thay đổi hình dạng và cấu trúc của NST.
- ❖ **Phôi thể khảm:** là phôi có thể chứa dòng phôi bào bình thường và dòng phôi bào rối loạn, hoặc có thể chứa các dòng phôi bào rối loạn khác nhau.
- ❖ **Vô sinh I:** Hai vợ chồng chưa bao giờ có thai, mặc dù sống với nhau trên một năm, quan hệ tình dục đều đặn và không sử dụng biện pháp tránh thai nào.
- ❖ **Vô sinh II:** Hai vợ chồng trước kia đã có con hoặc có thai nhưng sau đó không thể có thai lại, dù sống với nhau trên hai năm, quan hệ tình dục đều đặn và không sử dụng biện pháp tránh thai nào.

2.4.4. Các biến số trong nghiên cứu

Bảng 2.1. Các biến số thông tin chung của bệnh nhân hiến phôi

STT	Thông tin chung của bệnh nhân hiến phôi	Loại biến
1	Tuổi người vợ	Biến định lượng
2	Nguyên nhân vô sinh do vợ	Biến nhị giá (Có/Không)
3	Nguyên nhân vô sinh do chồng	Biến nhị giá (Có/Không)
4	Không rõ nguyên nhân vô sinh	Biến nhị giá (Có/Không)
5	Loại vô sinh	Biến nhị giá (VSI/VSII)
6	Thời gian vô sinh	Biến định lượng (năm)
7	Tiền sử sản khoa	Biến nhị giá (Sảy thai, Thai lưu, Có/Không)
8	Tiền sử IVF thất bại	Biến định lượng (lần)

2.4.4.1. Hoàn thiện quy trình sàng lọc rối loạn 24 nhiễm sắc thể bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) trên tế bào phôi

Bảng 2.2. Các biến số của mục tiêu 1

Mục tiêu	Biến số	Loại biến
Đánh giá chất lượng sản phẩm WGA	Băng sản phẩm điện di	Biến nhị giá (Xuất hiện băng sản phẩm/ Không xuất hiện băng sản phẩm)
	Nồng độ DNA	Biến định lượng
Đánh giá chất lượng giải trình tự gen của phôi bằng NGS	Số lần đọc	Biến nhị giá (Đạt/Không đạt)
	Số lần đọc sau lọc	Biến nhị giá (Đạt/Không đạt)
	% Tổng số lần đọc sau lọc	Biến nhị giá (Đạt/Không đạt)
	Điểm chất lượng trung bình	Biến nhị giá (Đạt/Không đạt)
	Điểm ghép cặp trung bình	Biến nhị giá (Đạt/Không đạt)
	Chỉ số nhiễu của mẫu	Biến nhị giá (Đạt/Không đạt)
	Độ tin cậy vùng	Biến nhị giá (Đạt/Không đạt)
Đánh giá kết quả giải trình tự gen của phôi bằng kỹ thuật NGS	Số phôi không rối loạn NST	Biến định lượng
	Số phôi rối loạn 1 NST	Biến định lượng
	Số phôi rối loạn 2 NST	Biến định lượng
	Số phôi rối loạn ≥ 3 NST	Biến định lượng
	Số phôi thể khảm	Biến định lượng
Đánh giá kết quả tối ưu quy trình giải trình tự gen	Số lần đọc	Biến nhị giá (Đạt/Không đạt)

Mục tiêu	Biến số	Loại biến
giải trình tự gen chạy với mẫu nhỏ bằng các bộ kit:	Số lần đọc sau lọc	Biến nhị giá (Đạt/Không đạt)
+ Miseq Reagent kit v2 Nano (4 mẫu)	% Tổng số lần đọc sau lọc	Biến nhị giá (Đạt/Không đạt)
+ Miseq Reagent kit v2 Micro (8 mẫu)	Điểm chất lượng trung bình	Biến nhị giá (Đạt/Không đạt)
+ Miseq Reagent kit v2 Standard (16 mẫu)	Điểm ghép cặp trung bình	Biến nhị giá (Đạt/Không đạt)
+ Miseq Reagent kit V3 (24 mẫu)	Chỉ số nhiễu của mẫu	Biến nhị giá (Đạt/Không đạt)
	Độ tin cậy vùng	Biến nhị giá (Đạt/Không đạt)

2.4.4.2. Đánh giá độ chính xác của kỹ thuật sàng lọc rối loạn 24 nhiễm sắc thể bằng NGS so với kỹ thuật aCGH trên tế bào phôi

Bảng 2.3. Các biến số của mục tiêu 2

Kết quả NGS	Kết quả aCGH	Loại biến
Kết luận kết quả	Kết luận kết quả	Biến nhị giá (Kết luận/ Không kết luận)
Số phôi không rối loạn NST	Số phôi không rối loạn NST	Biến định lượng
Số phôi rối loạn 1 NST	Số phôi rối loạn 1 NST	Biến định lượng
Số phôi rối loạn 2 NST	Số phôi rối loạn 2 NST	Biến định lượng
Số phôi rối loạn ≥ 3 NST	Số phôi rối loạn ≥ 3 NST	Biến định lượng
Số phôi thừa NST	Số phôi thừa NST	Biến định lượng
Số phôi thiếu NST	Số phôi thiếu NST	Biến định lượng

2.4.4.3. Bước đầu đánh giá kết quả sàng lọc rối loạn 24 nhiễm sắc thể bằng NGS trên tế bào phôi trước làm tổ

Bảng 2.4. Các biến số của mục tiêu 3

Mục tiêu	Biến số	Loại biến
Đánh giá mức độ rối loạn NST của phôi	Số phôi không rối loạn NST	Biến định lượng
	Số phôi rối loạn 1 NST	Biến định lượng
	Số phôi rối loạn 2 NST	Biến định lượng
	Số phôi rối loạn ≥ 3 NST	Biến định lượng
	Số phôi thừa NST	Biến định lượng
	Số phôi thiếu NST	Biến định lượng
	Số phôi thể khảm	Biến định lượng
	Số phôi rối loạn cấu trúc	Biến định lượng
Đánh giá tần suất bất thường của 24 NST của phôi	NST 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X, Y	Biến định lượng

2.4.5. Các thiết bị và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

Các thiết bị và hóa chất phục vụ cho nghiên cứu được sử dụng tại phòng xét nghiệm DNA thuộc Bộ môn giải phẫu của Học viện Quân Y.

Kinh phí mua hóa chất được Bộ khoa học và Công nghệ hỗ trợ một phần, theo dự toán của đề tài cấp Quốc gia “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trong sàng lọc rối loạn NST trước chuyên phôi”;

thuộc Chương trình nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ tiên tiến phục vụ bảo vệ và chăm sóc sức khỏe cộng đồng; Mã số: KC.10/16-20.

Bảng 2.5. Thiết bị 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: micropipette, giá từ, giá đỡ eppendorf,...	

Bảng 2.6. Hóa chất 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	Miseq Reagent kit v2 Nano (300 cycles)	Illumina
6	Miseq Reagent kit v2 Micro (300 cycles)	Illumina
7	Miseq Reagent kit v2 standard (50 cycles)	Illumina
8	Miseq Reagent kit V3 (150 cycle)	Illumina

STT	Hóa chất	Nhà sản xuất
9	Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
10	Phosphate buffer solution	Cell Signalling
11	Sodium hypochlorite	Sigma
12	PCR grade water	1st Base
13	Female/Male human genomic DNA	Promega
14	TBE buffer 10X	Serva
15	Agarose gel loading dye 6x	Intron
16	50bp DNA ladder	Norgen
17	RedSafe Nucleic Acid staining solution	Intron
18	Ethanol	Merck
19	Sodium hydroxide solution 1N	Scharlau

2.4.6. Quy trình nghiên cứu

2.4.6.1. Hoàn thiện quy trình sàng lọc rối loạn 24 nhiễm sắc thể bằng kỹ thuật NGS trên tế bào phôi

❖ Chọn đối tượng nghiên cứu

- Lựa chọn được 24 phôi nang (của 4 bệnh nhân IVF) theo tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ.
- Nghiên cứu viên trực tiếp cung cấp thông tin nghiên cứu cho 4 cặp vợ chồng bệnh nhân IVF đủ tiêu chuẩn và cho cặp vợ chồng bệnh nhân kí đơn tình nguyện tham gia nghiên cứu nếu đồng ý hiến phôi.
- Phỏng vấn 4 cặp vợ chồng bệnh nhân IVF đồng ý tham gia hiến phôi để thu thập, ghi chép các biến số nghiên cứu vào phiếu thu thập số liệu: tuổi, tình trạng vô sinh, loại vô sinh, thời gian vô sinh, nguyên nhân vô sinh, tiền sử sản khoa, tiền sử thất bại IVF.

❖ Thực hiện nghiên cứu

– Bước 1: Nhận 24 phôi nang được hiến

Ghi đầy đủ thông tin của phôi: số thứ tự, mã số phôi (ID), mã số chu kỳ IVF.

– Bước 2: Thực hiện quy trình sinh thiết phôi và rửa tế bào phôi

* Sinh thiết phôi

- + Dùng kim giữ hút nhẹ và cố định phôi ở vị trí thích hợp.
- + Đưa kim sinh thiết áp nhẹ vào phần phôi đã thoát màng và hút từ từ ra 5-10 tế bào phôi (TE). Dùng laser cắt đứt cụm phôi bào vừa hút được khỏi phôi (chỉ hút nguyên bào lá nuôi phôi, không hút vào nguyên bào phôi). Nhả tế bào phôi vừa hút vào môi trường.
- + Nói lỏng lực hút của kim giữ để giải phóng phôi, chuyển phôi sang đĩa nuôi phôi.

* Rửa tế bào phôi sau sinh thiết

- + Dùng micropipettee lấy ra các tế bào phôi vừa sinh thiết chuyển sang đĩa chuẩn bị trước, trong đó có 6 giọt chia theo 2 hàng: 3 giọt môi trường G-gamete, 3 giọt chứa PBS-PVP (15-30 μ L/giọt). Rửa tế bào ở 3 vị trí: Hút tế bào phôi từ giọt rửa 1 sang giọt rửa 2. Lặp lại các bước trên ở giọt 3-4; 5-6.
- + Từ giọt rửa 6: hút 2,5 μ L dung dịch PBS-PVP chứa tế bào phôi cho vào ống PCR1 đã đánh dấu, hút ra 2,5 μ L dung dịch PBS-PVP chuyển vào ống PCR2 chứng âm tương ứng.

Nghiên cứu viên ghi ngày, giờ sinh thiết, tên kỹ thuật viên sinh thiết và rửa tế bào vào phiếu thu thập số liệu.

Chuyển 24 ống PCR1 (chứa tế bào phôi) và 24 ống PCR2 (chứa dung dịch rửa) về phòng xét nghiệm DNA thuộc Bộ môn giải phẫu của Học viện Quân Y và ghi ngày, giờ chuyển mẫu vào phiếu thu thập số liệu.

– **Bước 3: Thực hiện quy trình khuếch đại hệ gen (WGA)**

24 mẫu phôi bào và 24 mẫu dung dịch rửa sau khi được sinh thiết, rửa phôi được thực hiện bước khuếch đại toàn bộ hệ gen bằng bộ kit SurePlex DNA Amplification System của hãng Illumina theo quy trình khuếch đại hệ gen (Phụ lục 1.3). Tiến hành thao tác WGA trong phòng sạch, áp lực dương với đầy đủ trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất, và dòng lưu thông theo 1 chiều tại phòng xét nghiệm DNA thuộc Bộ môn giải phẫu của Học viện Quân Y.

+ Thực hiện quy trình điện di: Tiến hành điện di sản phẩm sau khuếch đại (24 mẫu phôi bào và 24 mẫu dung dịch rửa) và mẫu chứng âm, mẫu chứng dương. 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 đánh giá kết quả theo tiêu chí sau:

Bảng 2.7. Tiêu chí đánh giá kết quả điện di

<i>Mẫu WGA</i>	<i>Mẫu phôi bào</i>	<i>Mẫu dung dịch rửa</i>
<i>Kết quả điện di</i>		
Xuất hiện băng sản phẩm rõ như mẫu đối chứng dương	Sinh thiết thành công (thu được tế bào phôi có nhân); Rửa tế bào thành công (không mất tế bào); WGA thành công.	Nhiễm DNA ngoại lai
Không xuất hiện băng sản phẩm	Sinh thiết không thành công (thu được tế bào phôi không nhân); Hoặc rửa tế bào làm mất tế bào phôi; Hoặc WGA không thành công.	Không nhiễm DNA ngoại lai

+ Đo nồng độ DNA bằng Qubit: Nồng độ DNA của sản phẩm WGA được tính bằng cách đo nồng độ của mẫu sản phẩm pha loãng sau đó nhân hệ số để có nồng độ gốc (vì các sản phẩm WGA được pha loãng trước khi tiến

hành đo với tỷ lệ 1:10). Ghi lại nồng độ DNA của 24 mẫu phôi bào và 24 mẫu dung dịch rửa, đánh giá kết quả theo các tiêu chí sau:

Bảng 2.8. Tiêu chí đánh giá kết quả nồng độ DNA

<i>Mẫu WGA</i>	<i>Mẫu phôi bào</i>	<i>Mẫu dung dịch rửa</i>
<i>Nồng độ DNA</i>		
<10 ng/ μ L	WGA không thành công	Không nhiễm DNA ngoại lai
>25 ng/ μ L	WGA thành công	Nhiễm DNA ngoại lai

– **Bước 4: Thực hiện giải trình tự gen**

Sản phẩm WGA của 24 mẫu phôi bào được tiến hành giải trình tự gen bằng kỹ thuật NGS theo quy trình của hãng bằng bộ kit chạy máy MiSeq Reagent Kit - PGS (24 mẫu/1 lần chạy, bộ kit cung cấp đủ hóa chất cho 4 lần chạy (lên tới 96 mẫu/mẻ)) gồm các bước sau:

* **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 DNA nồng độ 0,2ng/ μ L (trong 1ng DNA tổng số) vào các giếng tương ứng trên đĩa VTA; hút nhả micropipette 5 lần để trộn đều hoặc đập nắp rồi lắc. Ly tâm ở 280gr 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 micropipette hút nhả 5 lần để trộn đều hoặc sử dụng máy vortex sau đó ly tâm nhanh ở 280gr 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 micropipette 5 lần để trộn đều hoặc dùng máy vortex nhanh. Ly tâm đĩa ở tốc độ 280gr 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; 95°C trong 10 giây trong 12 chu kỳ, 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 1800rpm trong 2 phút sau đó ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ly tâm nhanh ở 280gr trong 1 phút và đặt lên giá từ trong vòng 2 phút. Dùng micropipette loại bỏ dịch trong các giếng rồi thêm 200 μ L cồn 80% vào các giếng. Để ủ 30 giây sau đó dùng micropipette loại bỏ cồn 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 1800rpm trong 2 phút rồi ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ly tâm nhanh đĩa mẫu ở 280gr 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 1,1ml 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 1800rpm 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 1800rpm trong 5 phút. Sau đó ly tâm nhanh ở 280gr. 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 0,1N vào các giếng rồi đóng nắp giá và lắc ở 1800rpm trong 5 phút. Sau đó ly tâm nhanh ở 280gr 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 280gr trong 1 phút.

* ***Giải trình tự***

- + Chuyển 5 μ L từng mẫu ở các giếng vào 1 ống eppendorf 1.5ml mới kí hiệu POOL. Chuyển 15 μ L thư viện DNA từ ống POOL sang một ống PCR mới. Thêm 85 μ L HT1 vào ống PCR đã chứa 15 μ L thư viện DNA, trộn đều sau đó ly tâm nhanh. Chuyển ống DNA/HT1 trên vào ủ trên máy PCR ở 96 $^{\circ}$ C trong 3 phút, 4 $^{\circ}$ C trong 5 phút và giữ ở 4 $^{\circ}$ C.
- + Thêm 600 μ L HT1 vào một ống Eppendorf 1.5ml mới và bảo quản trên đá. Bổ sung 100 μ L thư viện đã ủ vào ống eppendorf chứa 600 μ L HT1 đã chuẩn bị. Sau đó chuyển toàn bộ 700 μ L 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.

*** Phân tích dữ liệu và kết luận kết quả**

Sử dụng phần mềm BlueFuse Multi phiên bản 4.4 (Illumina, Inc) phân tích kết quả tự động. Đồng thời sử dụng một cơ sở dữ liệu chứa thông tin về hệ gen của con người mới nhất để tham chiếu là BG-Annotation-Ens71-20160909.db sau đó nhóm nghiên cứu mới đưa ra kết luận cho từng kết quả.

Đánh giá chất lượng dữ liệu sau phân tích thông qua các chỉ số của từng mẫu. Các chỉ số này đều phải đạt tiêu chuẩn độ chính xác 99,999% (Q30).

Bảng 2.9. Các tiêu chí đánh giá chất lượng sản phẩm giải trình tự gen theo yêu cầu của hãng

Chỉ số	Tiêu chí	Giá trị tối ưu	Giá trị chấp nhận
Số lần đọc (Number of total reads)		1.000.000	700.000
Số lần đọc sau lọc (Number of reads after filtering)		500.000	250.000
% Tổng số lần đọc sau lọc (% of total reads after filtering)		>50	>35
Điểm chất lượng trung bình (Average quality score- Qscore)		>35	>30
Điểm ghép cặp trung bình (Average alignment score)		>35	>30
Chỉ số nhiễu của mẫu (Overall noise - DLR)		0,2	<0,4
Độ tin cậy vùng (Confidence)		1,0	>0,7

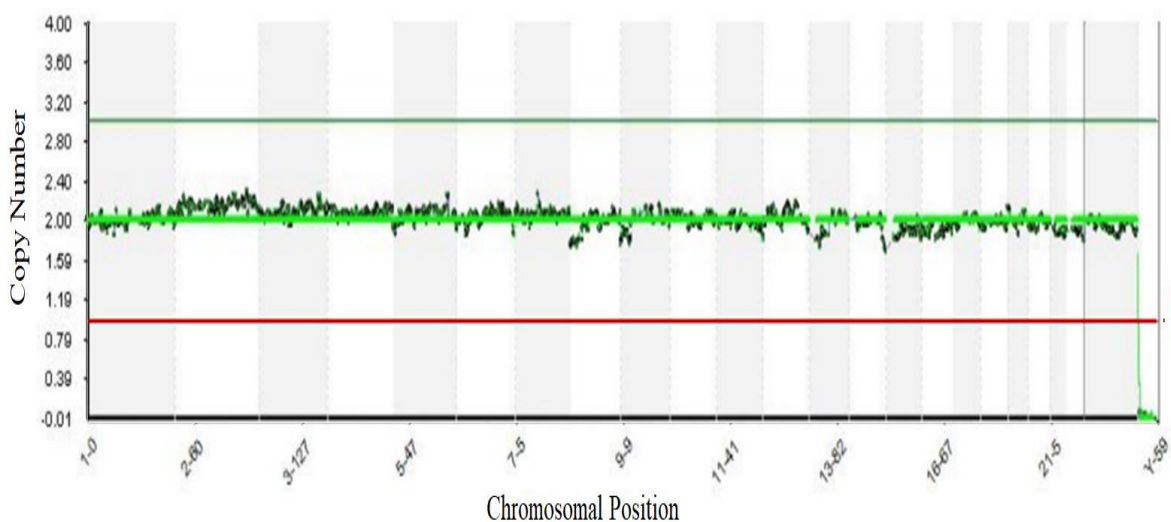
Phân tích và kết luận kết quả giải trình tự gen bằng cách sử dụng phân phối Gauss (số lượng bản sao từ 0-4 và độ lệch chuẩn là 0,33) và giá trị ngưỡng. Mỗi biểu đồ biến thể số lượng bản sao (Copy number variation-

CNV) của NGS biểu thị các phép gán số lượng bản sao (0, 1, 2, 3 hoặc 4) trên trục Y và số lượng NST trên trục X. Thừa và thiếu NST được xem là sự dịch chuyển của các dấu chấm ở trên và dưới trạng thái 2 bản sao (đường ngang màu xanh lá cây tương ứng 2 bản sao).

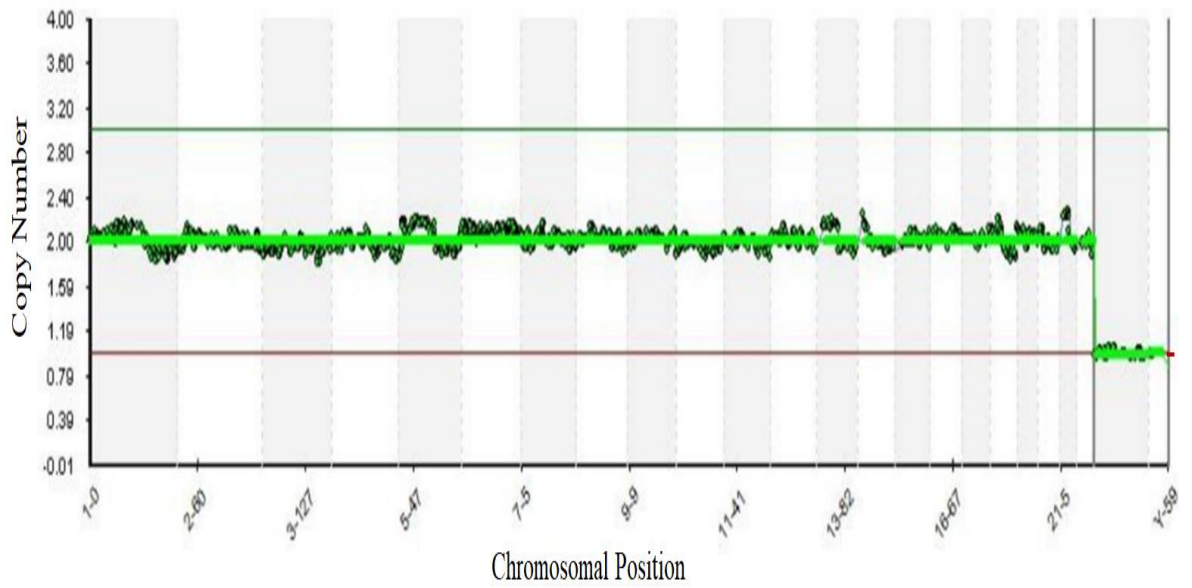
*** Các tiêu chí kết luận kết quả giải trình tự gen bằng kỹ thuật NGS**

- + Bình thường kết luận kết (1,8-2,2).
- + Thêm nhiễm sắc thể: số bản sao >2,8.
- + Mất nhiễm sắc thể: số bản sao <1,2.
- + Theo khuyến cáo của hãng Illumina, cần quan sát cẩn thận biến thể số lượng bản sao để phát hiện rối loạn cấu trúc (những thay đổi >50% kích thước NST sẽ được kết luận tự động, những thay đổi nhỏ cần phân tích thủ công theo khuyến cáo); phát hiện thể khảm (số lượng bản sao nằm trong khoảng 1,2-1,8 hoặc/và 2,2-2,8); hoặc những thay đổi nhỏ bản sao NST X / Y trong biểu đồ CNV để phát hiện thể đa bội [146].

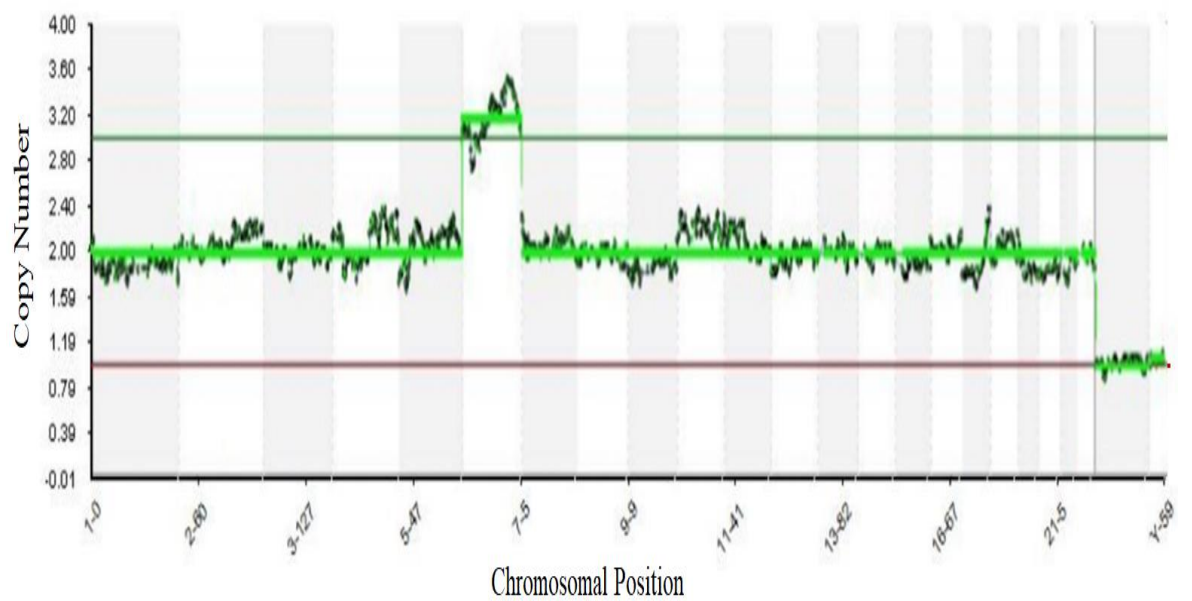
*** Một số biểu đồ minh họa kết quả giải trình tự gen bằng kỹ thuật NGS**



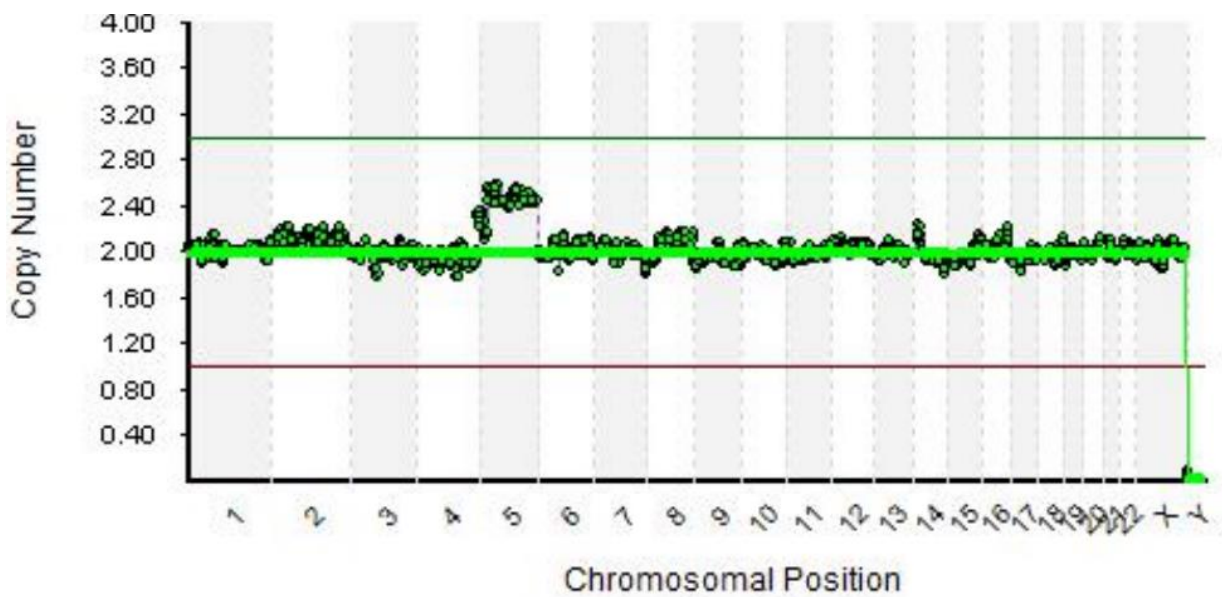
Biểu đồ 2.1. Biểu đồ CNV của mẫu có bộ NST bình thường 46,XX



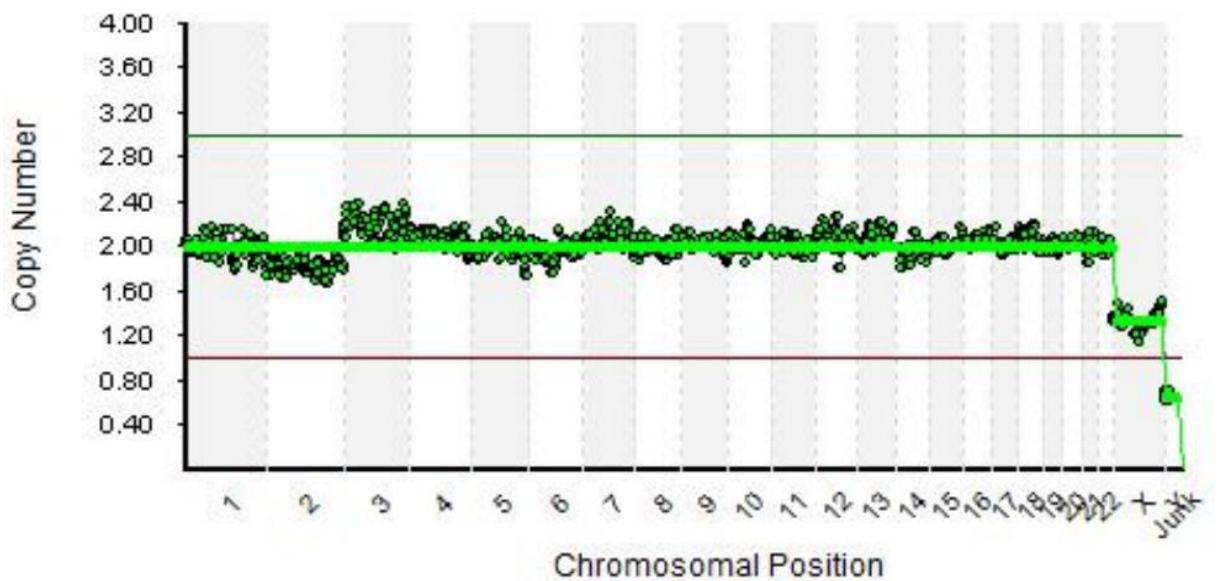
Biểu đồ 2.2. Biểu đồ CNV của mẫu có bộ NST bình thường 46,XY



Biểu đồ 2.3. Biểu đồ CNV của mẫu có bộ NST bất thường (47,XY,+6)



Biểu đồ 2.4. Biểu đồ CNV của mẫu có thể khảm (46,XX/47,XX,+5)



Biểu đồ 2.5. Biểu đồ CNV của mẫu tam bội (69,XXY)

– Bước 5: Thực hiện tối ưu quy trình giải trình tự gen

Sử dụng thư viện DNA còn lại của 24 mẫu phôi bào chạy bằng bộ kit chạy máy khác nhau (bảng 2.10) để có thể thực hiện quy trình giải trình tự gen với số lượng mẫu nhỏ hơn nhằm hạ giá thành xét nghiệm mà vẫn đảm bảo độ chính xác.

Bảng 2.10. Các bộ kit chạy máy để tối ưu quy trình giải trình tự gen

TT	Bộ kit chạy máy sử dụng	Số lượng mẫu
1	Miseq Reagent kit v2 Nano (300 cycles)	4 mẫu
2	Miseq Reagent kit v2 Micro (300 cycles)	8 mẫu
3	Miseq Reagent kit v2 Standard (50 cycles)	16 mẫu
4	Miseq Reagent kit V3 (150 cycle)	24 mẫu

Đánh giá chất lượng các kết quả khi chạy 4 mẫu/1lần, 8 mẫu/1lần, 16 mẫu/1lần, 24 mẫu/1lần thông qua các tiêu chí chất lượng được khuyến cáo (bảng 2.9).

– **Bước 6: Hoàn thiện quy trình giải trình tự gen**

2.4.6.2. Đánh giá độ chính xác của kỹ thuật NGS

❖ **Chọn đối tượng nghiên cứu**

- Lựa chọn được 52 phôi nang (của 13 bệnh nhân IVF) theo tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ.
- Nghiên cứu viên trực tiếp cung cấp thông tin nghiên cứu cho 13 cặp vợ chồng bệnh nhân IVF đủ tiêu chuẩn và cho cặp vợ chồng bệnh nhân kí đơn tình nguyện tham gia nghiên cứu nếu đồng ý hiến phôi.
- Phỏng vấn 13 cặp vợ chồng bệnh nhân IVF đồng ý tham gia hiến phôi để thu thập, ghi chép các biến số nghiên cứu vào phiếu thu thập số liệu: tuổi, tình trạng vô sinh, loại vô sinh, thời gian vô sinh, nguyên nhân vô sinh, tiền sử sản khoa, tiền sử thất bại IVF.

❖ **Thực hiện nghiên cứu**

– **Bước 1: Nhận 52 phôi nang được hiến**

Ghi đầy đủ thông tin của phôi: số thứ tự, mã số phôi (ID), mã số chu kỳ IVF.

– **Bước 2: Thực hiện sinh thiết phôi và rửa tế bào**

Nghiên cứu viên ghi ngày, giờ sinh thiết, tên kỹ thuật viên sinh thiết và rửa tế bào vào phiếu thu thập số liệu.

Sau sinh thiết và rửa tế bào, thu được 52 ống PCR1 (chứa tế bào phôi) và 52 ống PCR2 (chứa dung dịch rửa); chuyển về phòng xét nghiệm DNA thuộc Bộ môn giải phẫu của Học viện Quân Y. Ghi ngày, giờ chuyển mẫu vào phiếu thu thập số liệu.

– **Bước 3: Thực hiện quy trình WGA**

52 mẫu phôi bào và 52 mẫu dung dịch rửa sau khi được sinh thiết, rửa phôi được khuếch đại toàn bộ hệ gen bằng bộ kit SurePlex DNA Amplification System của hãng Illumina tại phòng xét nghiệm DNA thuộc Bộ môn giải phẫu của Học viện Quân Y.

Đánh giá sản phẩm WGA bằng phương pháp đo nồng độ DNA bằng Qubit. Ghi lại nồng độ DNA của 52 mẫu phôi bào và 52 mẫu dung dịch rửa vào phiếu thu thập số liệu.

– **Bước 4: Chuẩn bị thư viện**

Sau khi WGA thành công, tạo 52 thư viện DNA để thực hiện sàng lọc rối loạn di truyền cho phôi bằng kỹ thuật NGS (thực hiện tại Học viện Quân Y Việt Nam) và 52 thư viện DNA để thực hiện sàng lọc rối loạn di truyền cho phôi bằng kỹ thuật aCGH (thực hiện ở Đại học Quốc gia Singapore).

– **Bước 5: Thực hiện giải trình tự gen bằng kỹ thuật NGS**

- + Sản phẩm WGA của 52 mẫu phôi bào được tiến hành giải trình tự gen bằng kỹ thuật NGS (Next Generation Sequencing) theo quy trình đã hoàn thiện.
- + Đánh giá các kết quả của kỹ thuật NGS.

– **Bước 6: Thực hiện xét nghiệm sàng lọc rối loạn di truyền bằng kỹ thuật aCGH**

Sau khi tạo được 52 thư viện DNA, nhóm nghiên cứu gửi mẫu sang Singapore. Quy trình kỹ thuật aCGH được thực hiện tại trung tâm PGT Đại học Quốc gia Singapore theo các bước sau:

* ***Đánh dấu DNA mẫu phôi bào***

DNA của tế bào phôi sau sinh thiết được WGA đánh dấu huỳnh quang màu xanh lá cây, sau đó được trộn lẫn (1:1) với DNA bình thường tham chiếu được dán nhãn màu đỏ.

* ***Lai với các DNA dò đặc hiệu***

DNA đã được đánh dấu cho tiếp xúc với chip DNA. Các đoạn DNA này sẽ lai với các đoạn dò tương ứng trên con chip (24Sure-BlueGnome) và được ủ qua đêm trong phòng ảm.

* ***Rửa sau lai***

Sau khi lai, chip DNA được rửa theo thứ tự các bước sau: 10 phút ở dung dịch 2x SSC/0,05% Tween-20 ở nhiệt độ khoảng 25⁰C, 10 phút ở dung dịch 1x SSC ở nhiệt độ 25⁰C, 5 phút trong dung dịch 0,1x SSC ở nhiệt độ 59⁰C, 1 phút trong dung dịch 0,1x SSC ở nhiệt độ 25⁰C.

* ***Quét hình ảnh***

Sau khi rửa, chip DNA được làm khô trong 3 phút và được đưa vào máy quét microarray (microarray scanner) để đo lượng huỳnh quang màu đỏ và xanh lá cây ứng với mỗi vị trí trên con chip

* ***Phân tích dữ liệu và đọc kết quả***

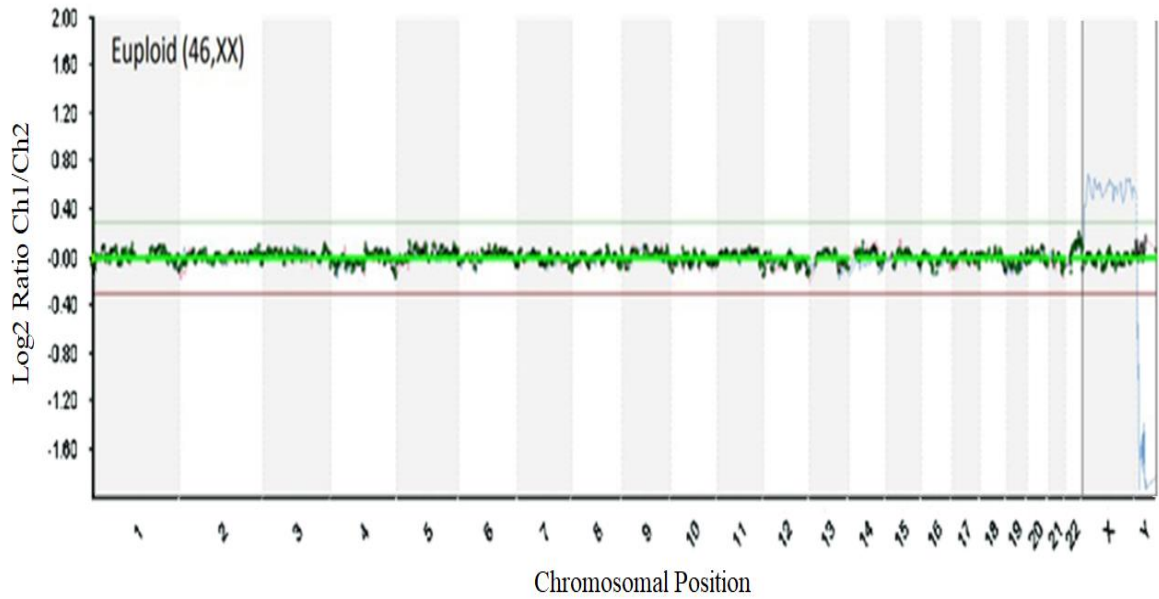
Hình ảnh thu được sẽ được phân tích bằng phần mềm chuyên dụng Bluefuse (BlueGnome, UK) cho aCGH.

Mỗi biểu đồ của aCGH biểu thị các phép gán tỉ số \log_2 của cường độ bắt màu huỳnh quang giữa mẫu phôi bào/ mẫu đối chứng trên trục Y (-2; -0,4; 0; 0,4; 2) và số lượng NST trên trục X. \log_2 giữ vai trò trung tâm, với giá trị bằng 0. Nếu cường độ của huỳnh quang bằng nhau trên một đầu dò ($\log_2 = 0$) thì mẫu phôi bào có số lượng DNA bằng mẫu đối chứng, kết luận kết quả bình thường; Nếu có tỷ lệ màu xanh: màu đỏ bị thay đổi, điều này cho thấy sự mất hoặc tăng DNA của mẫu phôi bào tại vùng genom cụ thể đó.

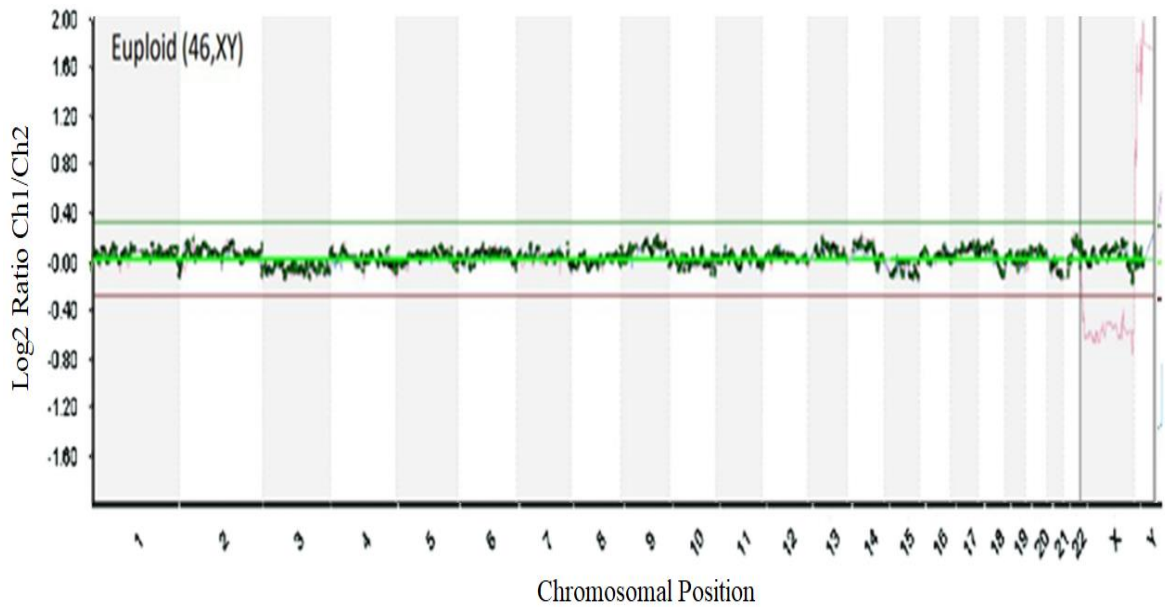
* ***Tiêu chí kết luận kết quả của aCGH***

- + Bình thường: $\log_2(\text{phôi bào/chứng}) = 0,0$;
 - + Thêm nhiễm sắc thể: $\log_2(\text{phôi bào/chứng})$ số bản sao $> 0,3$;
 - + Mất nhiễm sắc thể: $\log_2(\text{phôi bào/chứng})$ số bản sao $< -0,3$;
 - + Trường hợp mất đoạn bán hợp tử (hemizygote deletion): $\log_2(\text{phôi bào/chứng}) = \log_2(1/2) = -1$;
 - + Trường hợp nhân đoạn (duplication): $\log_2(\text{phôi bào/chứng}) = \log_2(3/2) = 0,59$;
 - + Trường hợp nhân đoạn đồng hợp tử (homozygous duplication): $\log_2(\text{phôi bào/chứng}) = \log_2(4/2) = 1$;
 - + Không kết luận kết quả: $\log_2(\text{phôi bào/chứng}) < 3 \times SD$ hoặc/và tỷ lệ đọc $\pm 0,3 \log_2$.
- **Bước 7: Trung tâm Xét nghiệm di truyền trước làm tổ, Đại học quốc gia Singapore kết luận kết quả và gửi về Việt Nam.**

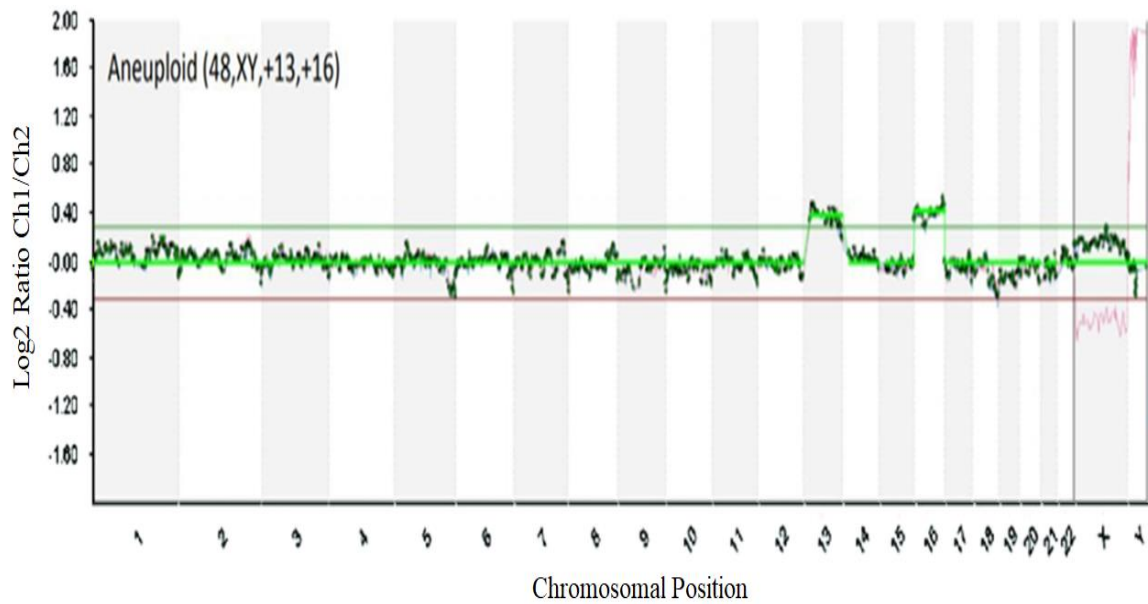
*** Biểu đồ minh họa kết quả của kỹ thuật aCGH**



Biểu đồ 2.6. Biểu đồ tỉ số \log_2 của mẫu có bộ NST bình thường 46,XX.



Biểu đồ 2.7. Biểu đồ tỉ số \log_2 của mẫu có bộ NST bình thường 46,XY



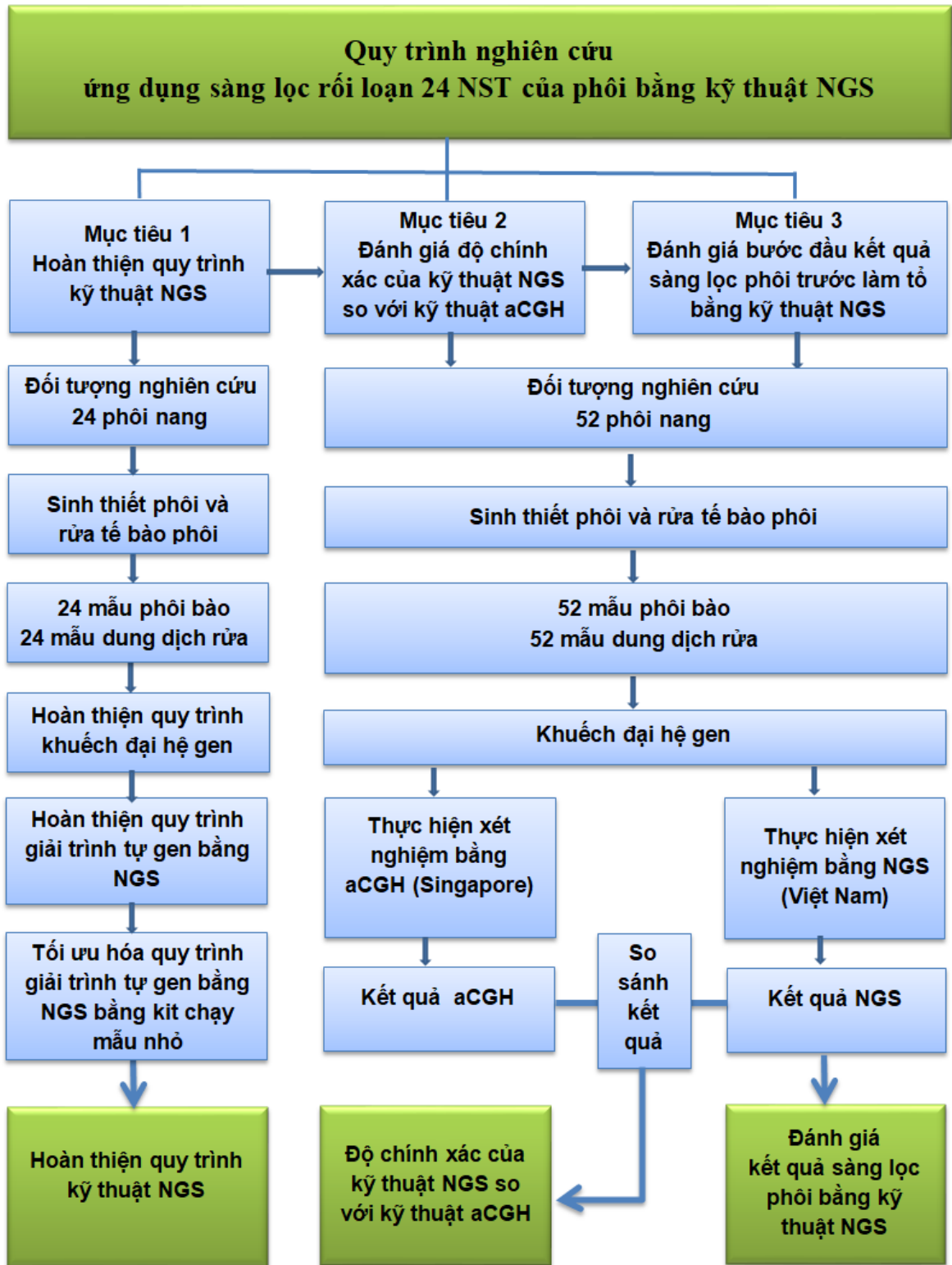
Biểu đồ 2.8. Biểu đồ tỉ số \log_2 của mẫu có có bộ NST bất thường $48,XY,+13,+16$.

- **Bước 8: So sánh kết quả NGS với kết quả aCGH**
 - + Dựa vào độ đồng thuận để tiến hành tính toán độ nhạy và độ đặc hiệu kỹ thuật NGS.
 - + Kết luận độ chính xác của kỹ thuật NGS

2.4.6.3. Đánh giá kết quả sàng lọc phôi trước làm tổ bằng kỹ thuật NGS

- Tiến hành phân tích kết quả của 52 phôi đã được giải trình tự gen bằng kỹ thuật NGS:
 - + Tỷ lệ phôi bất thường.
 - + Tần suất rối loạn các NST.
 - + Mức độ rối loạn các NST.
 - + Mối liên quan tuổi mẹ và tỷ lệ phôi bình thường.
 - + Mối liên quan tuổi mẹ và tỷ lệ phôi bất thường.
- Kết luận khả năng ứng dụng của NGS trong sàng lọc rối loạn NST của phôi IVF.

2.4.7. Sơ đồ nghiên cứu



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ quy trình nghiên cứu

2.5. Phương pháp xử lí số liệu

- ❖ 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.
- ❖ Số liệu được phân tích bằng phần mềm STATA 12.0.
- ❖ Các biểu đồ của nghiên cứu được vẽ trên chương trình Excel 2010.
- ❖ Đề tài sử dụng các thuật toán về phân tích thống kê mô tả, thống kê suy luận, đánh giá độ chính xác và phân tích tương quan (các thuật toán có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$). Trong đó:
 - 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 lượng.
 - Test kiểm định: sử dụng Chi-square test (χ^2) để so sánh hai hay nhiều tỷ lệ. Fisher test đối với số liệu có tần số mong đợi < 5 .
 - Đánh giá độ chính xác của phương pháp xét nghiệm bằng các thông số: Độ nhạy (Sensitivity - Se), độ đặc hiệu (Specificity - Sp), Giá trị chẩn đoán dương (Positive Predictive Value - PPV) và giá trị chẩn đoán âm tính (Negative Predictive Value - NPV) với các tính như sau:

Bảng 2.11. Cách tính Se, Sp, PPV, NPV

Kết quả aCGH / Kết quả NGS	Bất thường	Bình thường	Tổng số
Bất thường	a	b	a + b
Bình thường	c	d	c + d
Tổng số	a + c	b + d	a + b + c + d

- + $Se = a/a+c$ (số phôi bất thường của NGS trong nhóm phôi bất thường của aCGH).
 - + $Sp = d/b+d$ (số phôi bình thường của NGS trong nhóm phôi bình thường của aCGH).
 - + $PPV = a/a+b$ (số phôi bất thường của aCGH trong nhóm phôi bất thường của NGS).
 - + $NPV = d/c+d$ (số phôi bình thường của aCGH trong nhóm phôi bình thường của NGS).
- 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

2.6. Sai số và không chế sai số

- Tất cả các thông tin cần thiết cho nghiên cứu đều được thu thập và ghi chép trong một biểu mẫu nghiên cứu, nghiên cứu viên chịu trách nhiệm cập nhật thông tin từ lúc bắt đầu đến khi kết thúc nghiên cứu.
- Nghiên cứu viên trực tiếp hỏi bệnh nhân, trực tiếp tham gia thực hiện kỹ thuật trong phòng lab, thu thập, quản lý, xử lý số liệu.

2.7. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu này chỉ nhằm mục đích nâng cao chất lượng của điều trị IVF mà không nhằm bất cứ một mục đích nào khác.

- Trước khi tiến hành nghiên cứu, các đối tượng nghiên cứu được nghe thông báo 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 trước 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, bản thảo thuận tham gia nghiên cứu, phiếu đồng ý tham gia.
- Nghiên cứu này thuộc đề tài Quốc gia “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trong sàng lọc rối loạn NST trước chuyển phôi”; thuộc chương trình nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ tiên tiến phục vụ bảo vệ và chăm sóc sức khỏe cộng đồng; Mã số: KC.10/16-20. Khi thực hiện đề tài này, chúng tôi đã được sự đồng ý của Hội đồng y đức trong nghiên cứu y sinh học và cam kết thực hiện đúng các nguyên tắc của cơ sở nghiên cứu.

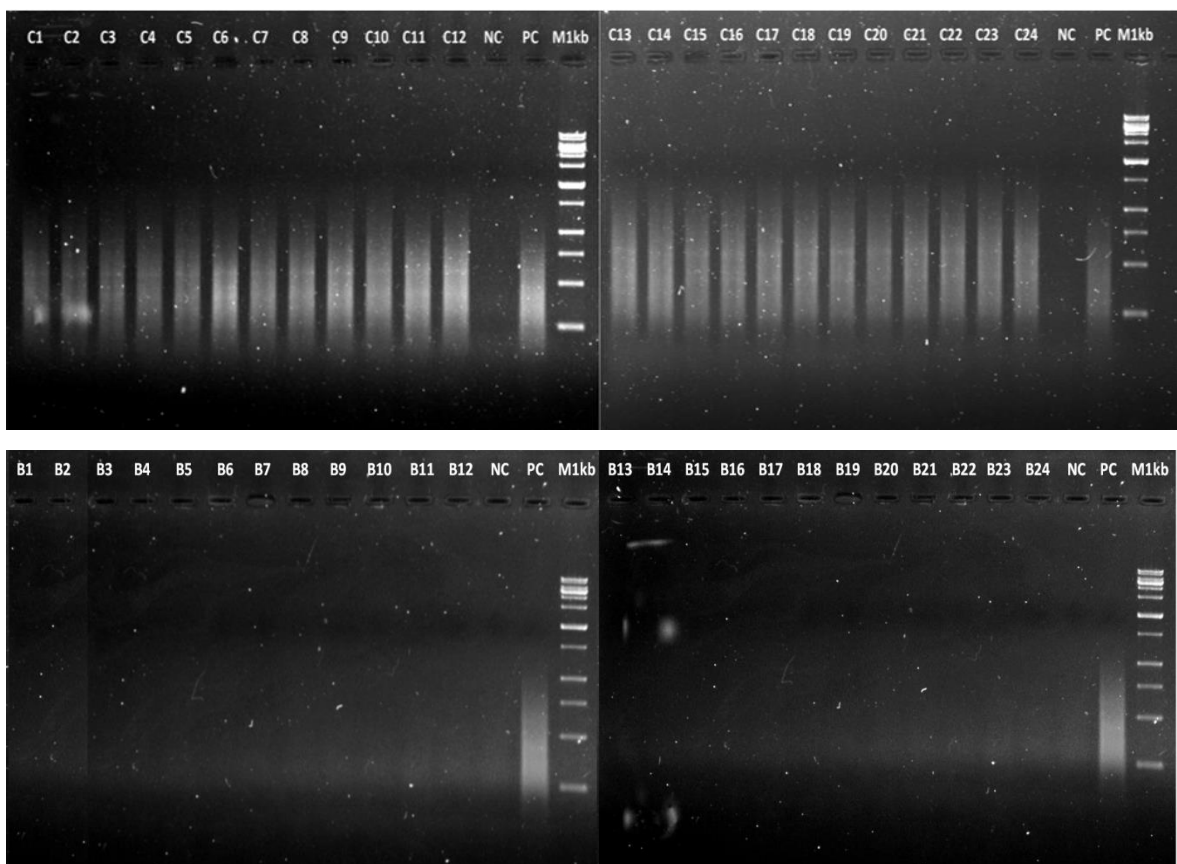
CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Hoàn thiện quy trình sàng lọc rối loạn 24 NST bằng kỹ thuật NGS trên tế bào phôi IVF

3.1.1. Kết quả quy trình khuếch đại hệ gen từ tế bào phôi

3.1.1.1. Đánh giá kết quả khuếch đại hệ gen bằng điện di



Hình 3.1. Kết quả điện di

C (mẫu phôi bào); *R* (mẫu dung dịch rửa); *NC* (Mẫu đối chứng âm: không có băng sản phẩm); *PC* (Mẫu đối chứng dương: băng sản phẩm rõ); *M1kb* (Thang chuẩn DNA 1kb)

Nhận xét: Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy cả 24 mẫu tế bào phôi từ C1 - C24 sau khi WGA đều xuất hiện băng sản phẩm, cả 24 mẫu dung dịch (R1 - R24) rửa đều không xuất hiện băng sản phẩm.

Bảng 3.1. Đánh giá kết quả điện di

Kết quả điện di Mẫu điện di	Xuất hiện băng sản phẩm		Không xuất hiện băng sản phẩm	
	n	%	n	%
Mẫu tế bào phôi	24	100	0	0,0
Mẫu dung dịch rửa	0	0,0	24	100

Nhận xét: Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy 100% các mẫu tế bào phôi sau khi WGA đều xuất hiện băng sản phẩm, 100% mẫu dung dịch rửa đều không xuất hiện băng sản phẩm.

3.1.1.2. Đánh giá kết quả khuếch đại hệ gen qua nồng độ DNA

Bảng 3.2. Nồng độ DNA đo bằng Qubit

Nồng độ DNA (ng/ μ L) Mẫu WGA	$\bar{X} \pm SD$	MIN-MAX
Mẫu tế bào phôi	48,6 \pm 19,0	27,3-87,4
Mẫu dung dịch rửa	0,4 \pm 0,2	0,1-0,7

Nhận xét: Nồng độ DNA trung bình sau khi WGA của 24 mẫu tế bào phôi là 48,6 \pm 19,0 ng/ μ L, mẫu tế bào phôi có nồng độ DNA thấp nhất là 27,3 ng/ μ L, mẫu có nồng độ DNA cao nhất là 87,4 ng/ μ L.

Nồng độ DNA trung bình của 24 mẫu dung dịch rửa là 0,4 \pm 0,2 ng/ μ L, trong đó mẫu có nồng độ DNA thấp nhất là 0,1 ng/ μ L và mẫu có nồng độ DNA cao nhất là 0,7 ng/ μ L.

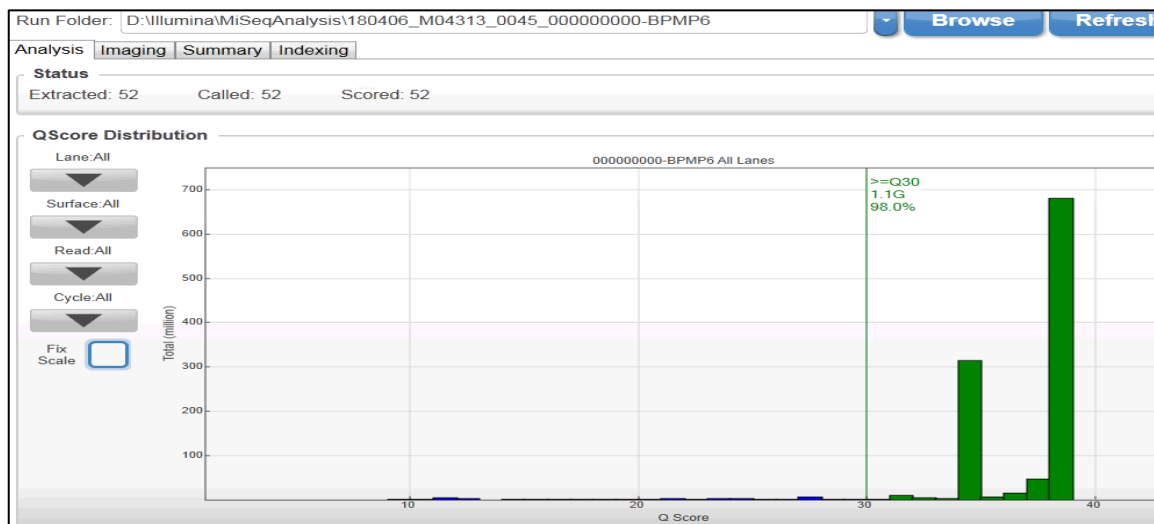
Bảng 3.3. Đánh giá chất lượng nồng độ DNA sau WGA 24 mẫu

Mẫu WGA Nồng độ DNA (ng/μL)	Mẫu tế bào phôi		Mẫu dung dịch rửa	
	n	%	n	%
<10	0	0,0	24	100
>25	24	100	0	0,0
Tổng	24	100	24	100

Nhận xét: 100% các mẫu tế bào phôi sau WGA đều đạt nồng độ DNA lớn hơn 25 ng/μL và 100% các mẫu dung dịch rửa có nồng độ DNA nhỏ hơn 10 ng/μL.

3.1.2. Kết quả quy trình giải trình tự gen bằng NGS

3.1.2.1. Đánh giá kết quả giải trình tự theo các thông số kỹ thuật yêu cầu



Hình 3.2. Chất lượng dữ liệu giải trình tự trên máy Miseq
(ngày 06/04/2018)

Nhận xét: Khi thực hiện quy trình giải trình tự gen thế hệ mới, kết quả đạt 1,1 Gb đầu ra với độ chính xác 99,999% (>Q30).

Bảng 3.4. Đánh giá chất lượng kết quả giải trình tự gen

Các tiêu chí	Đạt		Không đạt	
	n	%	n	%
Số lần đọc (700.000 - 1.000.000)	24	100%	0	0%
Số lần đọc sau lọc (250.000/mẫu)	24	100%	0	0%
% Tổng số lần đọc sau lọc (>35)	24	100%	0	0%
Điểm chất lượng trung bình (>30)	24	100%	0	0%
Điểm ghép cặp trung bình (>30)	24	100%	0	0%
Chỉ số nhiễu của mẫu (<0,4)	24	100%	0	0%
Độ tin cậy vùng (>0,7).	24	100%	0	0%

Nhận xét: Khi thực hiện giải trình tự gen 24 mẫu phôi bào theo bộ kit MiSeq Reagent Kit – PGS, kết quả là cả 100% mẫu đều đạt tổng số lần đọc là >700.000, tổng số lần đọc tối thiểu sau khi lọc là 250.000/mẫu, điểm chất lượng trung bình là >30, điểm ghép cặp trung bình >30, điểm về độ nhiễu của mẫu không vượt quá 0,4 và độ tin cậy của vùng khuếch đại của mỗi NST đạt > 0,7.

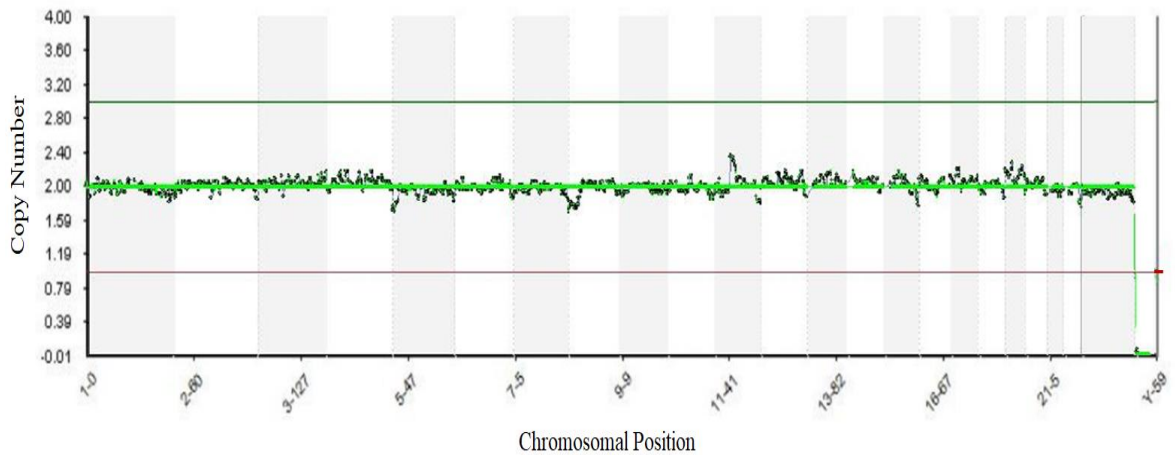
3.1.2.2. Kết quả giải trình tự gen

Bảng 3.5. Kết quả giải trình tự gen cho 24 mẫu

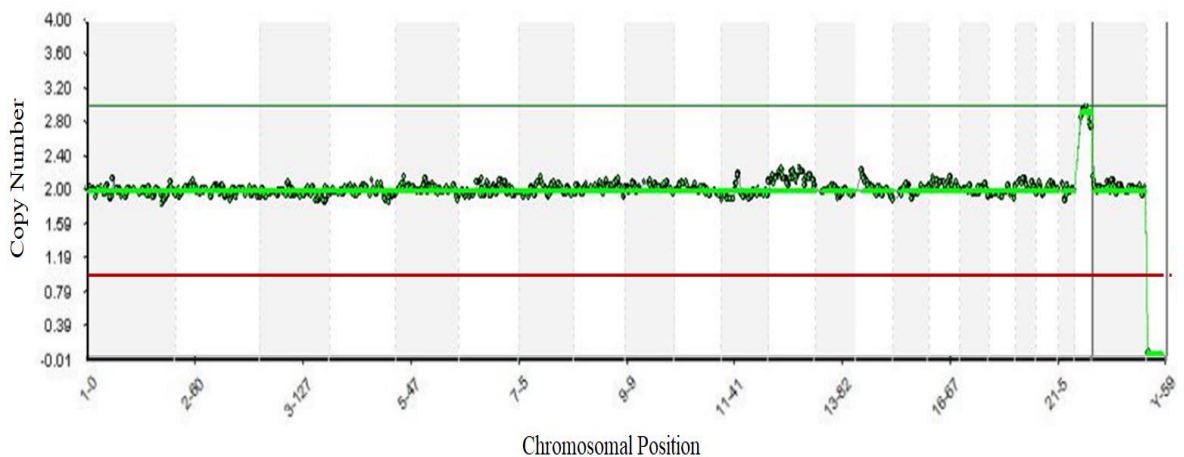
Đặc điểm phôi		Số lượng	Tỷ lệ (%)	
Phôi bình thường (n=11)	Số phôi không rối loạn NST	11	45,8	45,8
Phôi bất thường (n= 13)	Số phôi rối loạn 1 NST	3	12,5	54,2
	Số phôi rối loạn 2 NST	6	25	
	Số phôi rối loạn ≥ 3 NST	3	12,5	
	Số phôi thể khảm	1	4,2	
Tổng		24	100	

Nhận xét: Trong 24 phôi thực hiện giải trình tự gen có 11 phôi bình thường (chiếm 45,8%) và 13 phôi bất thường chiếm (54,2%), trong đó chủ yếu là bất thường về số lượng NST, và rối loạn 2 NST gặp nhiều nhất (chiếm 25%), thể khảm gặp ít nhất (chiếm 4,2%).

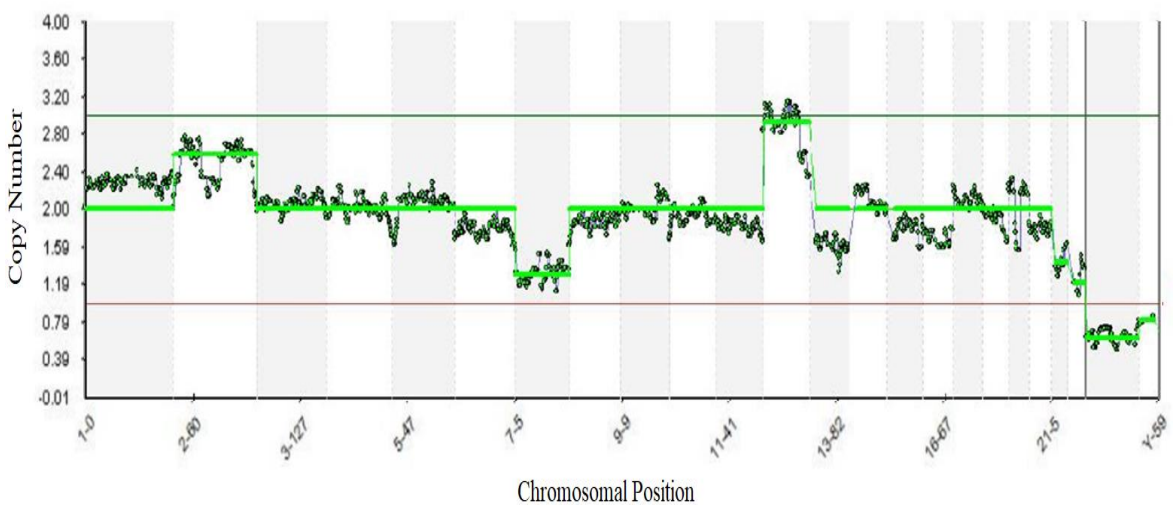
Một số kết quả giải trình tự gen của 24 phôi nang được minh họa dưới đây, trong đó phôi có 24 NST bình thường (biểu đồ 3.1), phôi bất thường số lượng NST số 22 (biểu đồ 3.2) và thể khảm (biểu đồ 3.3).



Biểu đồ 3.1. Biểu đồ CNV của phôi số 3. Không có rối loạn NST
(Karyotyp: 46,XX)



Biểu đồ 3.2. Biểu đồ CNV của phôi số 8. Lệch bội NST số 22
(Karyotyp: 47,XX,+22)



Biểu đồ 3.3. Biểu đồ CNV của phôi số 19. Thể khảm
(Karyotyp: 47,XY,+12/45,XY,-7,-21,-22,+2,+12)

3.1.3. Kết quả quá trình tối ưu quy trình giải trình tự gen bằng các kit chạy mẫu nhỏ

Sau khi chuẩn hóa quy trình theo bộ kit MiSeq Reagent Kit – PGS (tối đa 96 mẫu), chúng tôi tiếp tục thực hiện tối ưu hóa quy trình giải trình tự nhằm chạy trên bộ Flowcell nhỏ hơn, số lượng mẫu ít hơn trên 1 lần chạy. Điều này sẽ giúp có thể trả kết quả sàng lọc phôi nhanh nhất và tiết kiệm nhất, khắc phục tình trạng trả kết quả chậm do gom mẫu cho đủ một mẻ chạy.

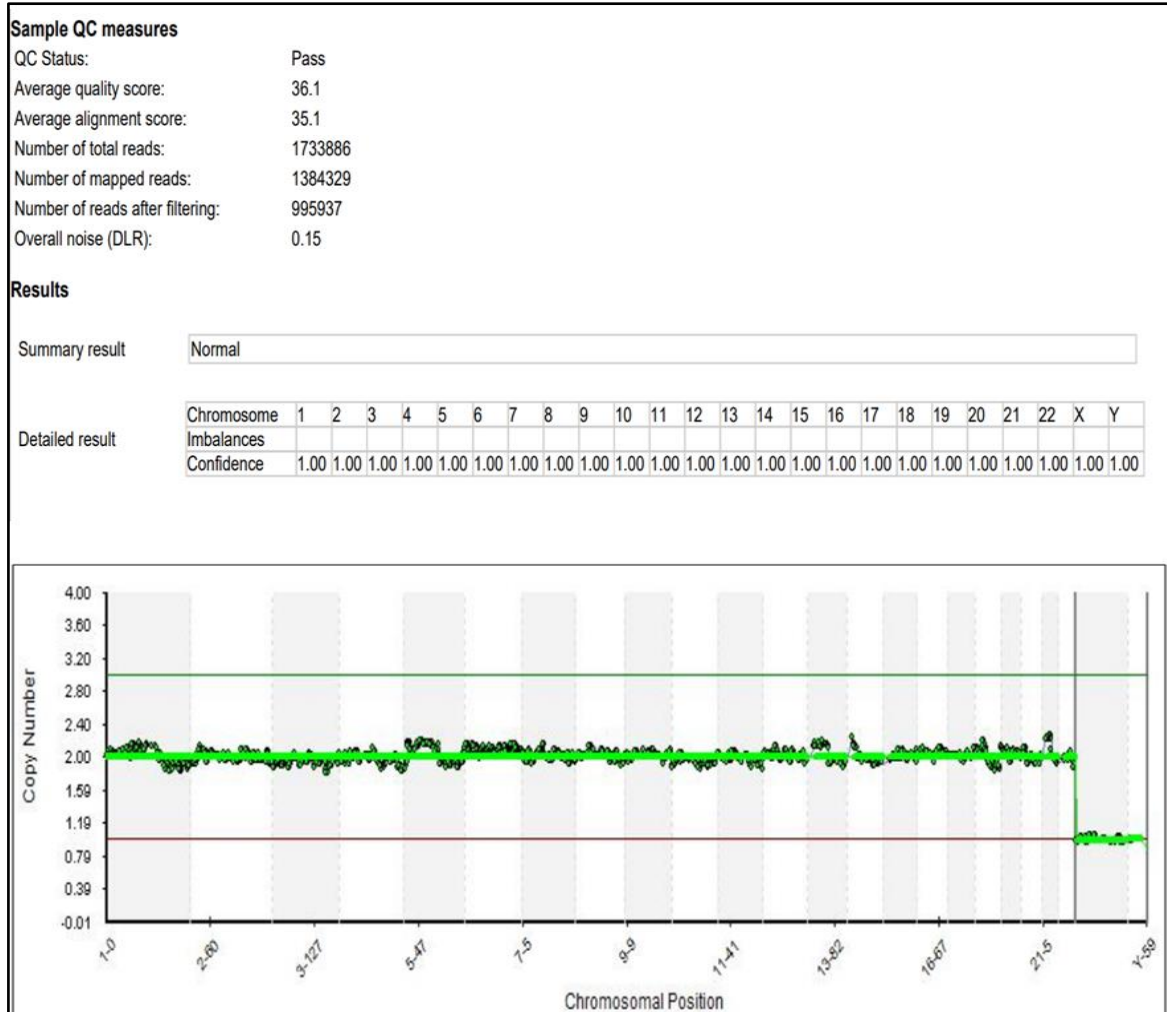
3.1.3.1. Kết quả chạy trên bộ kit Miseq Reagent kit v2 Nano (4 mẫu/ 1 lần chạy)

Bảng 3.6. Đánh giá chất lượng kết quả giải trình tự gen bằng bộ kit Miseq Reagent kit v2 Nano

Chỉ số	Tiêu chí	Giá trị sau giải trình tự gen	Đạt		Không đạt	
			n	%	n	%
Số lần đọc (Number of total reads)		>700.000	n	%	n	%
Số lần đọc sau lọc (Number of reads after filtering)		>250.000	4	100%	0	0,0%
% Tổng số lần đọc sau lọc (% of total reads after filtering)		>35	4	100%	0	0,0%
Điểm chất lượng trung bình (Average quality score- Qscore)		>30	4	100%	0	0,0%
Điểm ghép cặp trung bình (Average alignment score)		>30	4	100%	0	0,0%
Chỉ số nhiễu của mẫu (Overall noise - DLR)		<0,4	4	100%	0	0,0%
Độ tin cậy vùng (Confidence)		>0,7	4	100%	0	0,0%

Nhận xét: Khi thực hiện giải trình tự gen 4 mẫu phôi bào bằng bộ kit Miseq Reagent kit v2 Nano, kết quả là 100% mẫu đều đạt tổng số lần đọc là >700.000,

tổng số lần đọc tối thiểu sau khi lọc là 250.000/mẫu, điểm chất lượng trung bình là >30, điểm ghép cặp trung bình >30, điểm về độ nhiễu của mẫu không vượt quá 0,4 và độ tin cậy của vùng khuếch đại của mỗi NST đạt > 0,7.



Hình 3.3. Hình ảnh minh họa các thông số chạy và biểu đồ CNV của mẫu đạt yêu cầu khi giải trình tự gen bằng kit Miseq Reagent kit v2 Nano

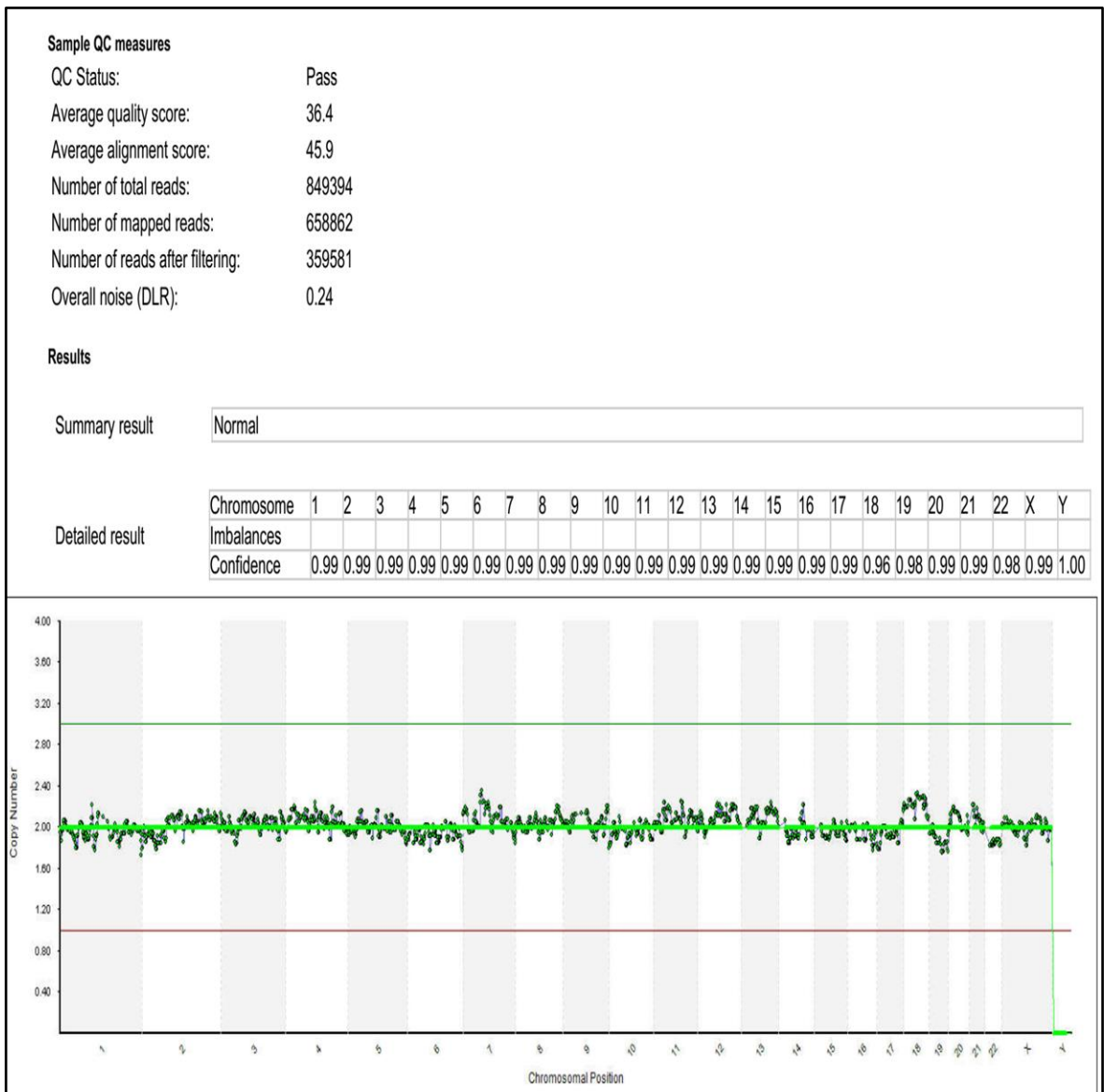
Số lần đọc (Number of total reads) 1.733.886 (>700.000); Số lần đọc sau lọc (Number of reads after filtering) 995.937 (>250.000); % Tổng số lần đọc sau lọc (% of total reads after filtering) $995.937/1.733.886 = 57,44\%$ (>35%); Điểm chất lượng trung bình (Average quality score- Qscore) 36,1 (>30); Điểm ghép cặp trung bình (Average alignment score) 35,1 (>30); Chỉ số nhiễu của mẫu (Overall noise - DLR) 0,15 (<0,4). Karyotyp: 46,XY

3.1.3.2. Kết quả chạy trên bộ kit Miseq Reagent kit v2 Micro (8 mẫu/1 lần chạy)

Bảng 3.7. Đánh giá chất lượng kết quả giải trình tự gen bằng bộ kit Miseq Reagent kit v2 Micro

Chỉ số	Tiêu chí	Giá trị sau giải trình tự gen	Đạt		Không đạt	
			n	%	n	%
Số lần đọc (Number of total reads)		>700.000	n	%	n	%
Số lần đọc sau lọc (Number of reads after filtering)		>250.000	8	100%	0	0,0%
% Tổng số lần đọc sau lọc (% of total reads after filtering)		>35	8	100%	0	0,0%
Điểm chất lượng trung bình (Average quality score- Qscore)		>30	8	100%	0	0,0%
Điểm ghép cặp trung bình (Average alignment score)		>30	8	100%	0	0,0%
Chỉ số nhiễu của mẫu (Overall noise - DLR)		<0,4	8	100%	0	0,0%
Độ tin cậy vùng (Confidence)		>0,7	8	100%	0	0,0%

Nhận xét: Khi thực hiện giải trình tự gen 8 mẫu phôi bào bằng bộ kit Miseq Reagent kit v2 Micro, kết quả là 100% mẫu đều đạt tổng số lần đọc là >700.000, tổng số lần đọc tối thiểu sau khi lọc là 250.000/mẫu, điểm chất lượng trung bình là >30, điểm ghép cặp trung bình >30, điểm về độ nhiễu của mẫu không vượt quá 0,4 và độ tin cậy của vùng khuếch đại của mỗi NST đạt > 0,7.



Hình 3.4. Hình ảnh minh họa các thông số chạy và biểu đồ CNV của mẫu đạt yêu cầu khi giải trình tự gen bằng kit Miseq Reagent kit v2 Micro.

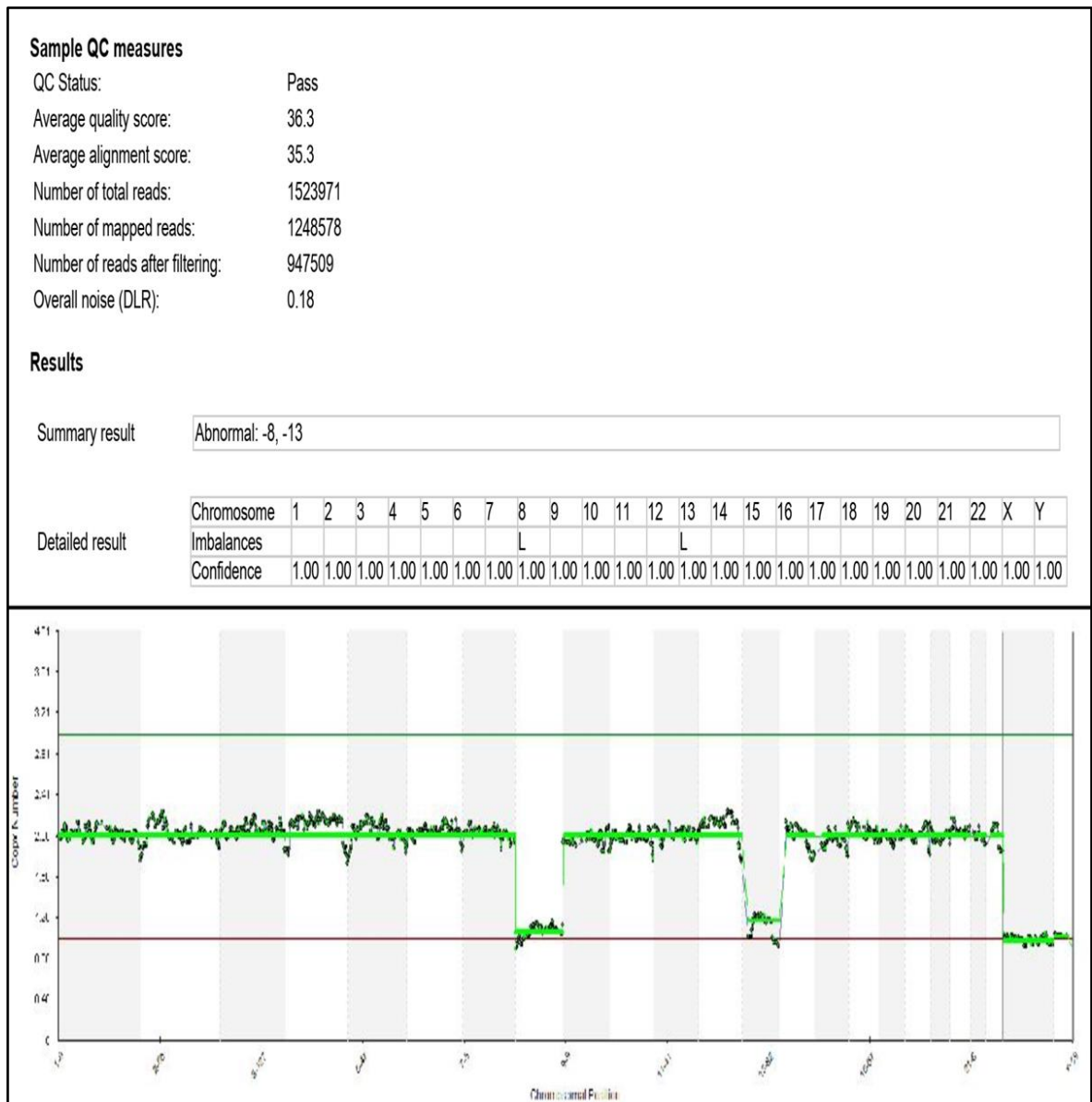
Số lần đọc (Number of total reads) 849.394 (>700.000); Số lần đọc sau lọc (Number of reads after filtering) 359.581 (>250.000); % Tổng số lần đọc sau lọc (% of total reads after filtering) $359.581/849.394 = 42,33\%$ (>35%); Điểm chất lượng trung bình (Average quality score- Qscore) 36,4 (>30); Điểm ghép cặp trung bình (Average alignment score) 45,9 (>30); Chỉ số nhiễu của mẫu (Overall noise - DLR) 0,24 (<0,4). Karyotyp: 46,XX.

3.1.3.3. Kết quả chạy trên bộ kit Miseq Reagent kit V2 Standard (16 mẫu/1 lần chạy)

Bảng 3.8. Đánh giá chất lượng kết quả giải trình tự gen bằng bộ kit Miseq Reagent kit v2 Standard

Chỉ số	Tiêu chí	Giá trị sau giải trình tự gen	Đạt		Không đạt	
			n	%	n	%
Số lần đọc (Number of total reads)		>700.000	n	%	n	%
Số lần đọc sau lọc (Number of reads after filtering)		>250.000	16	100%	0	0,0%
% Tổng số lần đọc sau lọc (% of total reads after filtering)		>35	16	100%	0	0,0%
Điểm chất lượng trung bình (Average quality score- Qscore)		>30	16	100%	0	0,0%
Điểm ghép cặp trung bình (Average alignment score)		>30	16	100%	0	0,0%
Chỉ số nhiễu của mẫu (Overall noise - DLR)		<0,4	16	100%	0	0,0%
Độ tin cậy vùng (Confidence)		>0,7	16	100%	0	0,0%

Nhận xét: Khi thực hiện giải trình tự gen 16 mẫu phôi bào bằng bộ kit Miseq Reagent kit v2 Standard, kết quả là 100% mẫu đều đạt tổng số lần đọc là >700.000, tổng số lần đọc tối thiểu sau khi lọc là 250.000/mẫu, điểm chất lượng trung bình là >30, điểm ghép cặp trung bình >30, điểm về độ nhiễu của mẫu không vượt quá 0,4 và độ tin cậy của vùng khuếch đại của mỗi NST đạt > 0,7.



Hình 3.5. Hình ảnh minh họa các thông số chạy và biểu đồ CNV của mẫu đạt yêu cầu khi giải trình tự gen bằng kit Miseq Reagent kit v2 Standard.

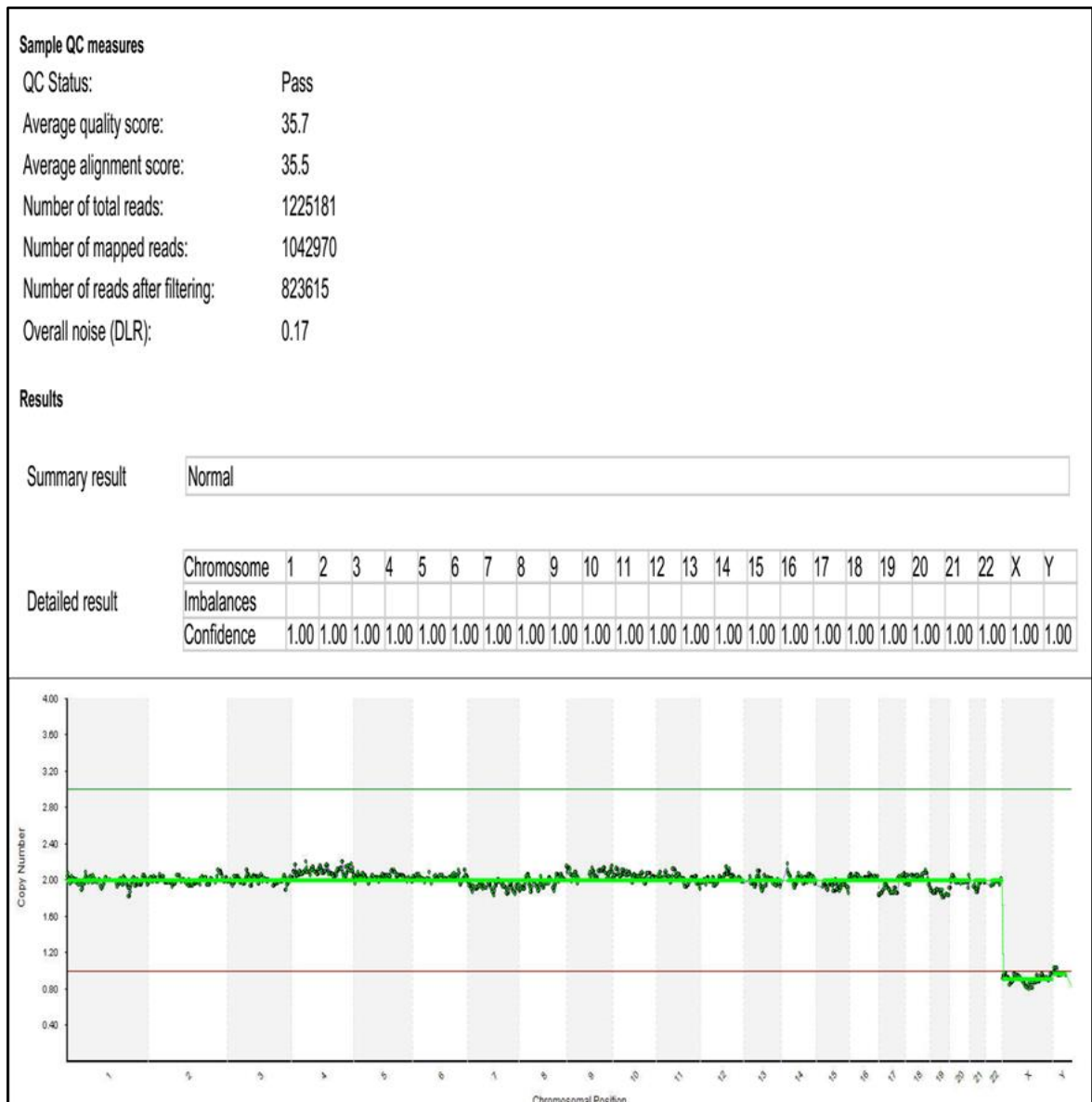
Số lần đọc (Number of total reads) 1.523.971 (>700.000); Số lần đọc sau lọc (Number of reads after filtering) 947.509 (>250.000); % Tổng số lần đọc sau lọc (% of total reads after filtering) $947.509/1.523.971 = 62,17\%$ (>35%); Điểm chất lượng trung bình (Average quality score- Qscore) 36,3 (>30); Điểm ghép cặp trung bình (Average alignment score) 35,3 (>30); Chỉ số nhiễu của mẫu (Overall noise - DLR) 0,18 (<0,4). Karyotyp: 44, XY, -8, -13.

3.1.3.4. Kết quả chạy trên bộ kit Miseq Reagent kit V3 (24 mẫu/1 lần chạy)

Bảng 3.9. Đánh giá chất lượng kết quả giải trình tự gen bằng bộ kit Miseq Reagent kit V3

Chỉ số	Tiêu chí	Giá trị sau giải trình tự gen	Đạt		Không đạt	
			n	%	n	%
Số lần đọc (Number of total reads)		>700.000	n	%	n	%
Số lần đọc sau lọc (Number of reads after filtering)		>250.000	24	100%	0	0,0%
% Tổng số lần đọc sau lọc (% of total reads after filtering)		>35	24	100%	0	0,0%
Điểm chất lượng trung bình (Average quality score-Qscore)		>30	24	100%	0	0,0%
Điểm ghép cặp trung bình (Average alignment score)		>30	24	100%	0	0,0%
Chỉ số nhiễu của mẫu (Overall noise - DLR)		<0,4	24	100%	0	0,0%
Độ tin cậy vùng (Confidence)		>0,7	24	100%	0	0,0%

Nhận xét: Khi thực hiện giải trình tự gen 24 mẫu phôi bào bằng bộ kit Miseq Reagent kit V3, kết quả là 100% mẫu đều đạt tổng số lần đọc là >700.000, tổng số lần đọc tối thiểu sau khi lọc là 250.000/mẫu, điểm chất lượng trung bình là >30, điểm ghép cặp trung bình >30, điểm về độ nhiễu của mẫu không vượt quá 0,4 và độ tin cậy của vùng khuếch đại của mỗi NST đạt > 0,7.



Hình 3.6. Hình ảnh minh họa các thông số chạy và biểu đồ CNV của mẫu đạt yêu cầu khi giải trình tự gen bằng kit Miseq Reagent kit V3.

Số lần đọc (Number of total reads) 1.225.181 (>700.000); Số lần đọc sau lọc (Number of reads after filtering) 823.615 (>250.000); % Tổng số lần đọc sau lọc (% of total reads after filtering) $823.615/1.225.181 = 67,22\%$ (>35%); Điểm chất lượng trung bình (Average quality score- Qscore) 35,7 (>30); Điểm ghép cặp trung bình (Average alignment score) 35,5 (>30); Chỉ số nhiễu của mẫu (Overall noise - DLR) 0,17 (<0,4). Karyotyp: 46,XY.

3.2. Đánh giá độ chính xác của kỹ thuật NGS so với kỹ thuật aCGH trong sàng lọc rối loạn 24 nhiễm sắc thể trên tế bào phôi

Nghiên cứu thực hiện trên 52 mẫu phôi bào.

3.2.1. Kết quả định lượng DNA

Bảng 3.10. Nồng độ DNA đo bằng Qubit

Nồng độ DNA (ng/μL)	$\bar{X} \pm SD$	MIN-MAX
Mẫu WGA		
Mẫu tế bào phôi	70,25 \pm 21,15	36,8-102
Mẫu dung dịch rửa	0,43 \pm 0,18	0,1-0,8

Nhận xét: Nồng độ DNA trung bình sau khi WGA của 52 mẫu tế bào phôi là $70,25 \pm 21,15$ ng/ μ L, mẫu tế bào phôi có nồng độ DNA thấp nhất 36,8 ng/ μ L, mẫu có nồng độ DNA cao nhất là 102 ng/ μ L.

Nồng độ DNA trung bình của 52 mẫu dung dịch rửa là $0,43 \pm 0,18$ ng/ μ L, trong đó mẫu có nồng độ DNA thấp nhất là 0,1 ng/ μ L và mẫu có nồng độ DNA cao nhất là 0,8 ng/ μ L.

Bảng 3.11. Đánh giá chất lượng nồng độ DNA sau WGA 52 mẫu

Nồng độ DNA (ng/μL)	Mẫu WGA		Mẫu dung dịch rửa	
	n	%	n	%
<10	0	0,0	52	100
>25	52	100	0	0,0
Tổng	52	100	52	100

Nhận xét: Cả 52 mẫu tế bào phôi sau WGA đều đạt nồng độ DNA lớn hơn 25 ng/ μ L và 100% các mẫu dung dịch rửa có nồng độ DNA nhỏ hơn 10 ng/ μ L.

3.2.2. Kết quả xét nghiệm của kỹ thuật NGS và kỹ thuật aCGH

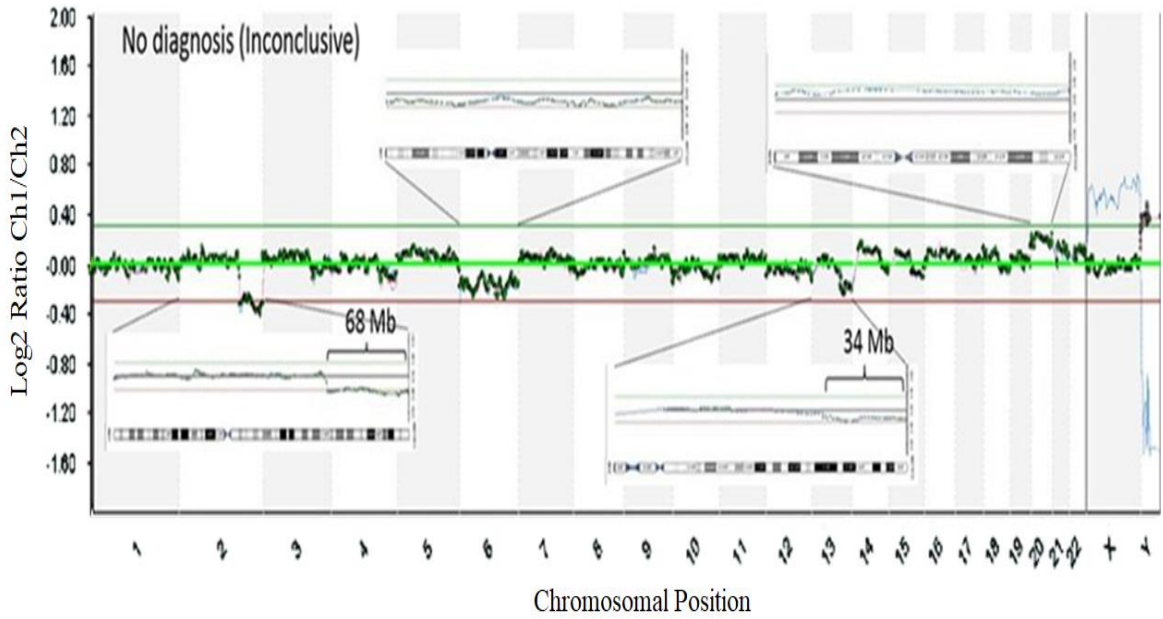
Sau khi WGA thành công, tạo được 52 thư viện DNA để thực hiện giải trình tự gen bằng kỹ thuật NGS tại Học viện Quân Y và 52 thư viện DNA gửi sang Singapore để thực hiện bằng aCGH. Số mẫu được kết luận kết quả bằng 2 kỹ thuật NGS và aCGH được thể hiện ở bảng 3.9.

Bảng 3.12. Kết luận kết quả bằng NGS và aCGH

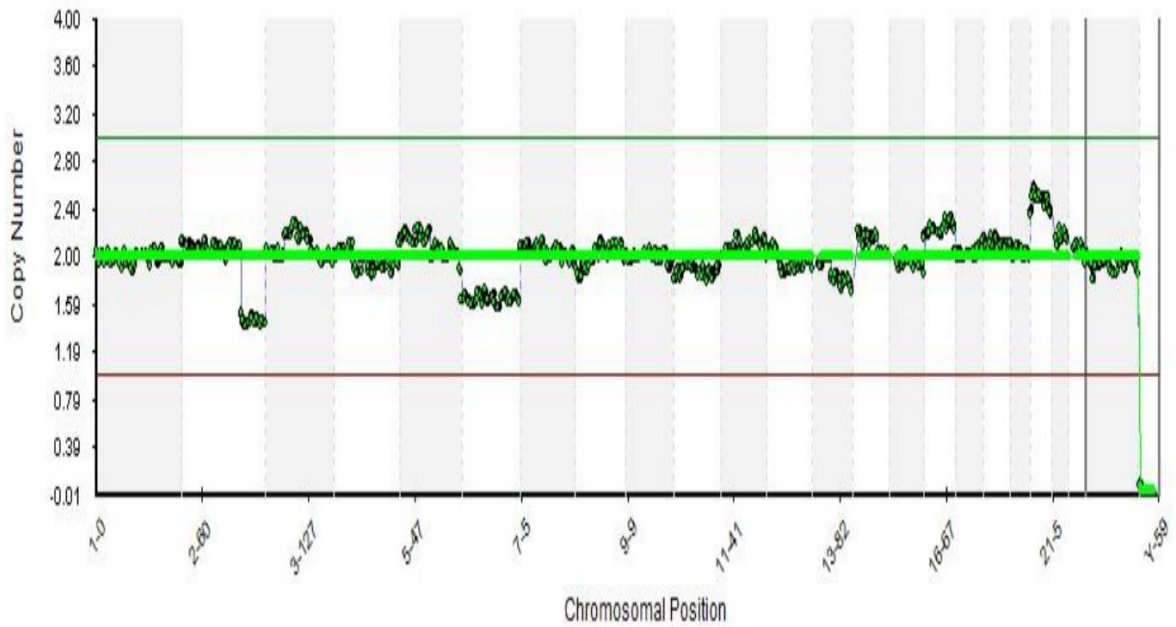
Tiêu chí	NGS		aCGH	
	n	%	n	%
Tổng số mẫu	52	100	52	100
Kết luận kết quả	52	100	48	92,3
Không kết luận kết quả	0	0	4	7,7

Nhận xét: Với NGS, cả 52 mẫu đều có kết luận kết quả trong khi đó với aCGH chỉ có 48 kết luận kết quả, còn 4 mẫu phôi không kết luận được là phôi bình thường hay bất thường, chiếm 7,7%.

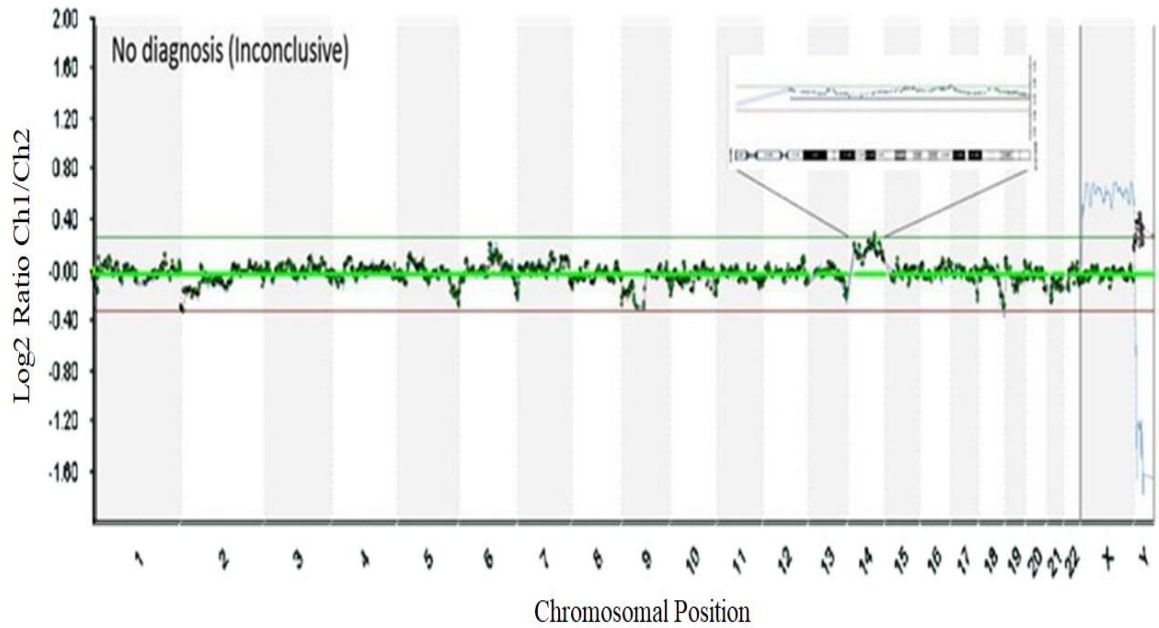
Dưới đây là 4 biểu đồ tỉ số \log_2 của aCGH của 4 phôi không được kết luận kết quả, tương ứng với 4 biểu đồ CNV của NGS có kết luận kết quả: phôi số 1 (biểu đồ 3.4 - 3.5), phôi số 14 (biểu đồ 3.6 - 3.7), phôi số 21 (biểu đồ 3.8 - 3.9) và phôi số 50 (biểu đồ 3.10 - 3.11).



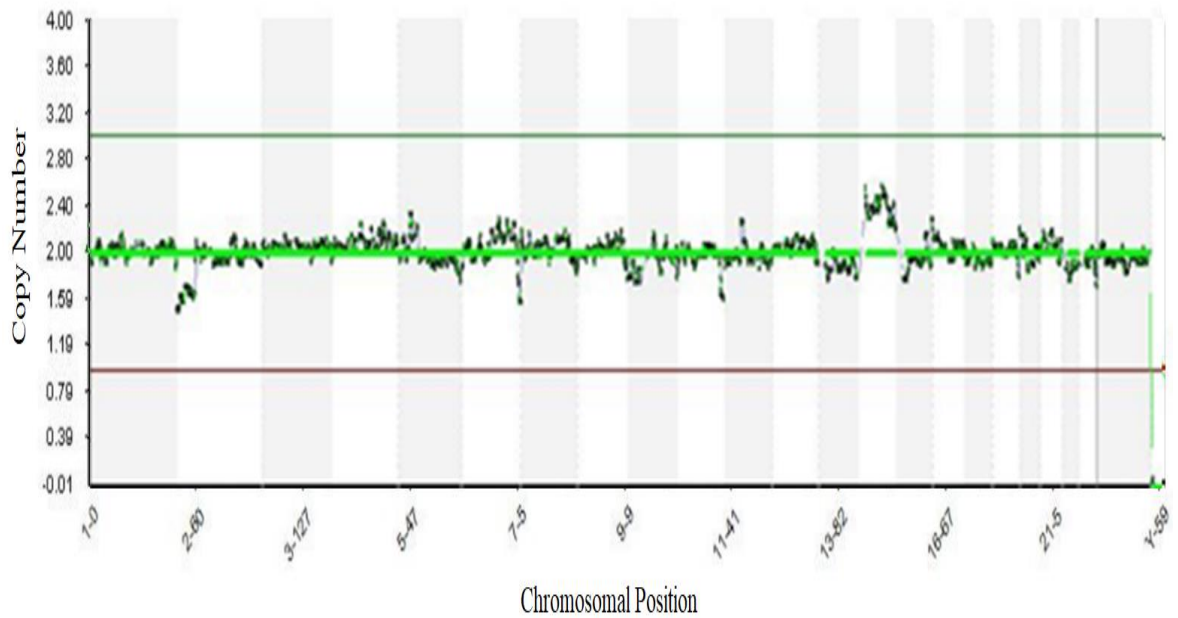
**Biểu đồ 3.4. Biểu đồ tỉ số \log_2 của phôi số 1
aCGH không kết luận kết quả**



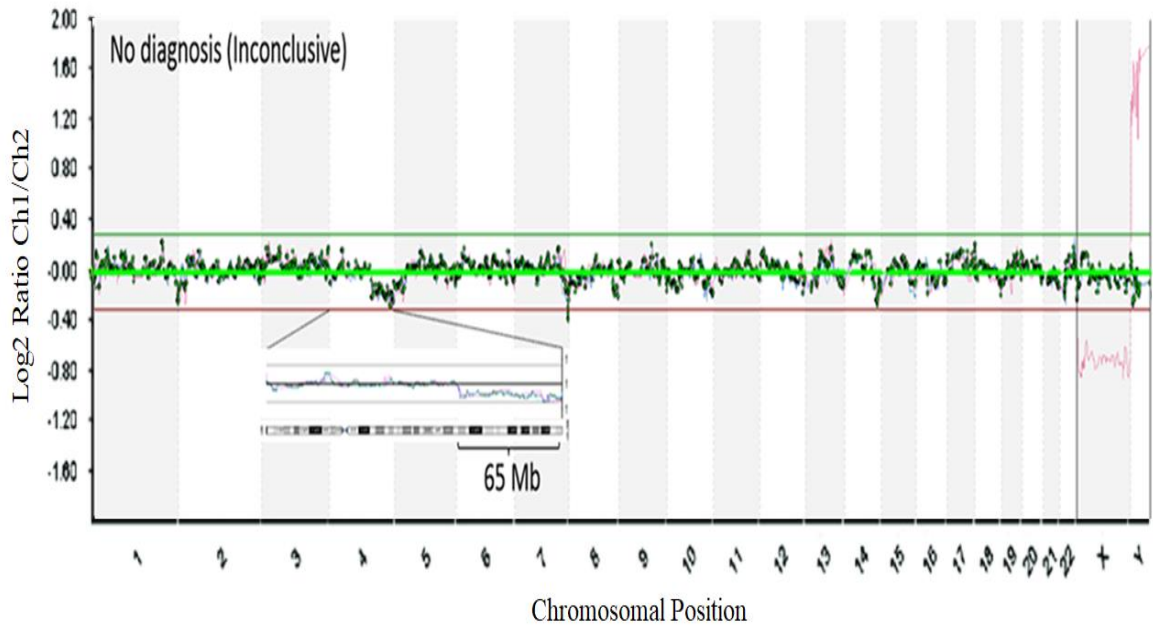
**Biểu đồ 3.5. Biểu đồ CNV của phôi số 1.
NGS kết luận Karyotyp: 46,XX/46,XX,-2q,-6,+20**



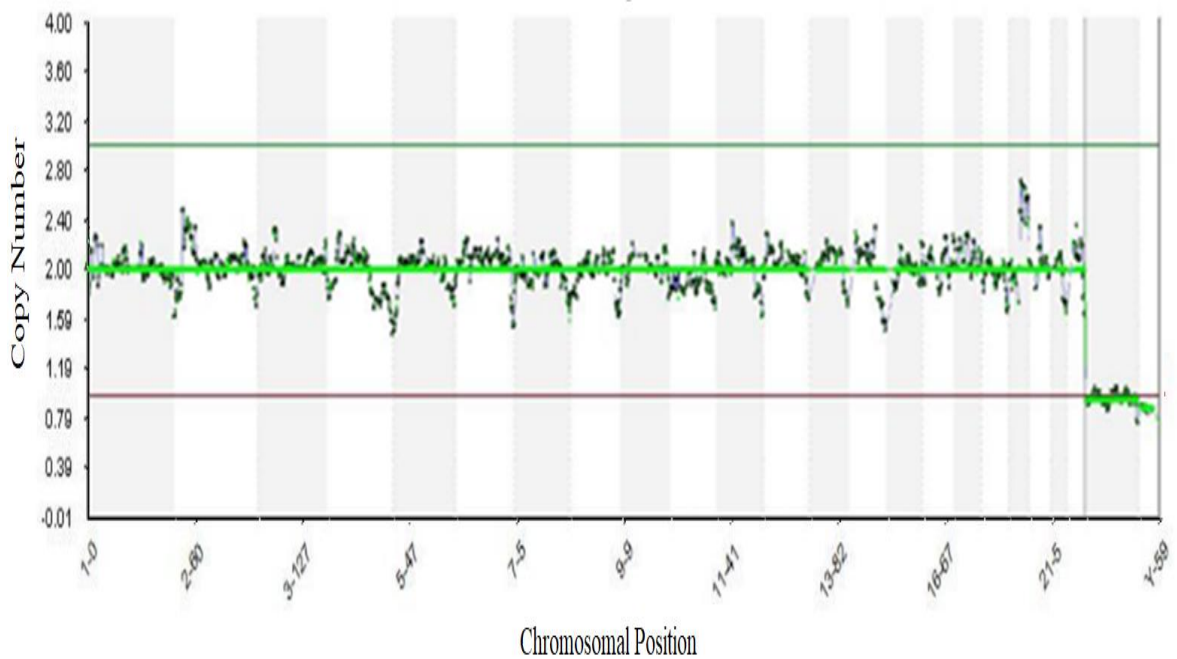
***Biểu đồ 3.6. Biểu đồ tỉ số \log_2 của phôi số 14
aCGH không kết luận kết quả.***



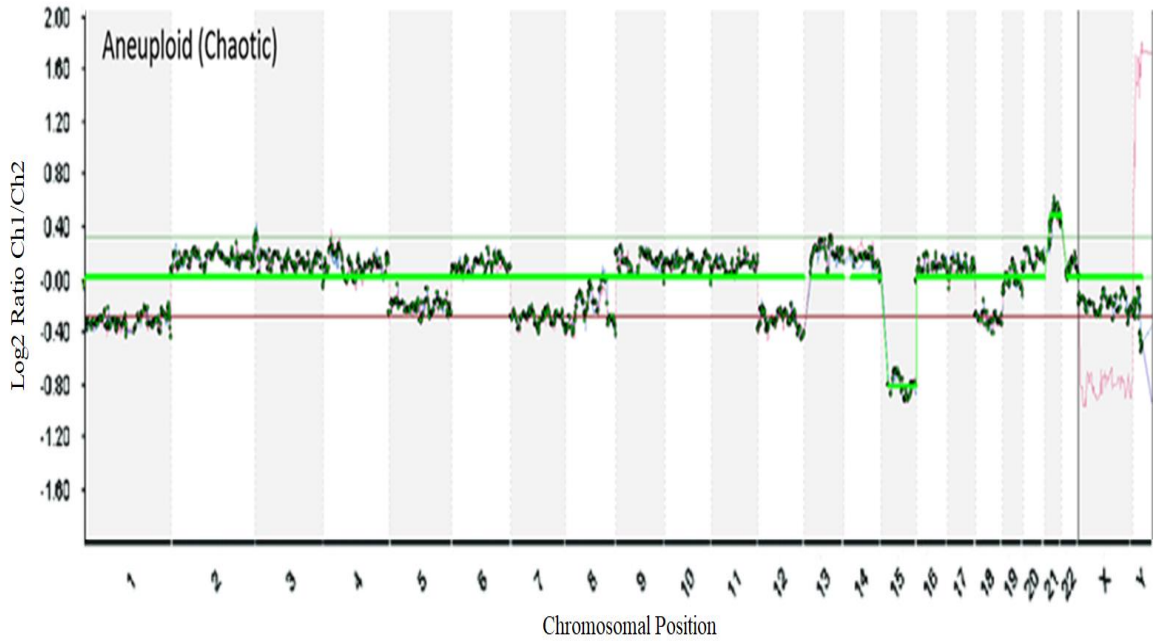
***Biểu đồ 3.7. Biểu đồ CNV của phôi số 14
NGS kết luận Karyotyp: 46,XX/46,XX,+14s(q14.2-24.3) 59Mb***



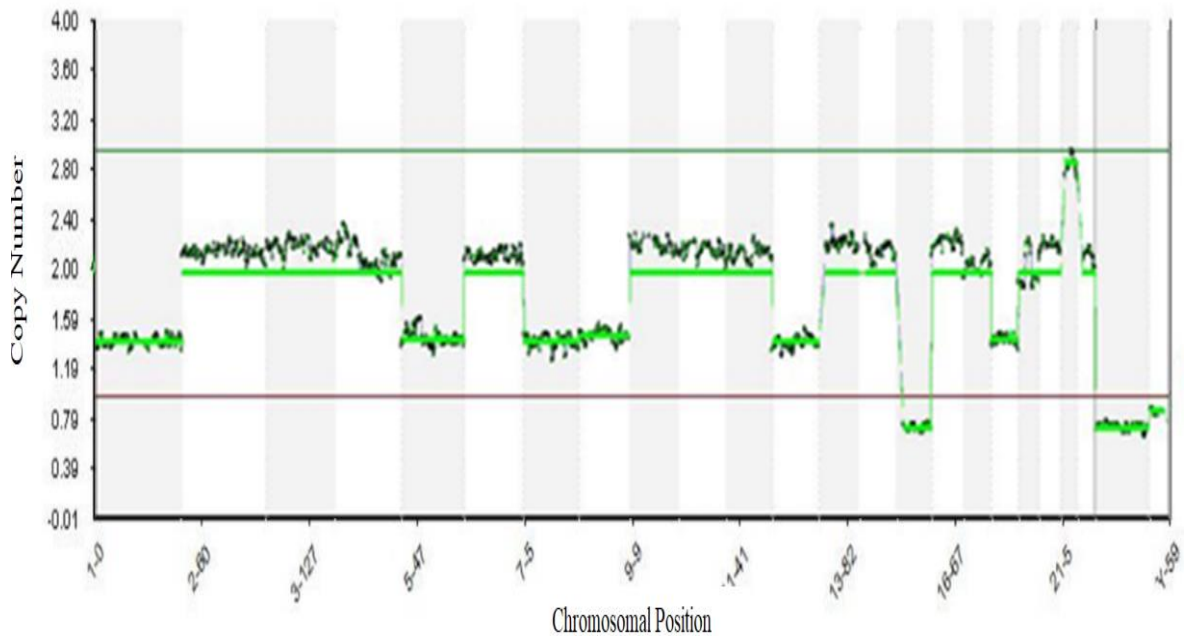
Biểu đồ 3.8. Biểu đồ tỉ số \log_2 của phôi số 21
(aCGH không kết luận kết quả)



Biểu đồ 3.9. Biểu đồ CNV của phôi số 21
NGS kết luận Karyotyp: 46,XY/46,XY,+19s(q13,123,q13.142) 22,4Mb



Biểu đồ 3.10. Biểu đồ tỉ số \log_2 của phôi số 50
(aCGH không kết luận kết quả)



Biểu đồ 3.11. Biểu đồ CNV của phôi số 50
NGS kết luận Karyotyp: 46,XY,-15,+21/40,XY,-1,-5,-7,-8,-12,-15,-18,+21

3.2.3. Đánh giá độ chính xác của NGS

Sau khi giải trình tự gen bằng kỹ thuật NGS và aCGH, vì aCGH không kết luận *kết quả cho 4 phôi nên chúng tôi* chỉ sử dụng 48 kết quả mà cả 2 kỹ thuật cùng kết luận để so sánh.

Bảng 3.13a. So sánh sự tương đồng về kết luận kết quả của kỹ thuật NGS và kỹ thuật aCGH ở 48 phôi

Kết luận kết quả	NGS		aCGH	
	n	%	n	%
0 cặp NST bất thường	31	64,6%	31	64,6%
1 cặp NST bất thường	12	25,0%	12	25,0%
2 cặp NST bất thường	4	8,3%	4	8,3%
≥3 cặp NST bất thường	1	2,1%	1	2,1%
Tổng	48	100	48	100
Thiếu NST	10	58,8%	10	58,8%
Thừa NST	7	41,2%	7	41,2%
Tổng	17	100	17	100

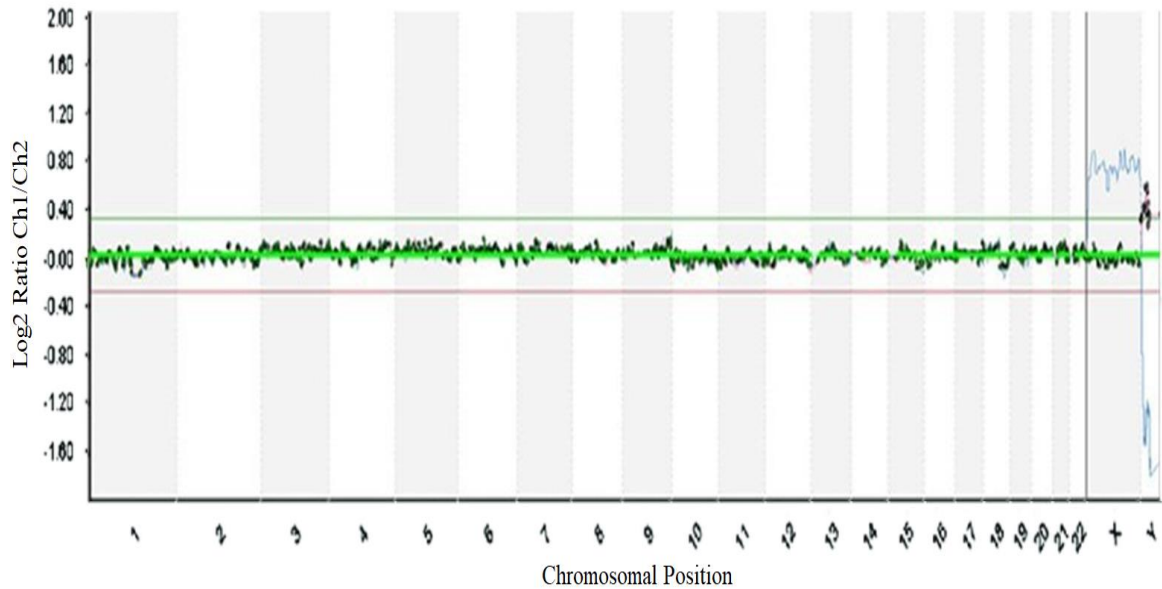
Nhận xét: Trong 48 kết quả thu được từ cả 2 kỹ thuật, sự kết luận về bất thường số cặp NST, kết luận thừa thiếu NST là giống nhau.

Bảng 3.13b. Đánh giá độ chính xác của kỹ thuật NGS

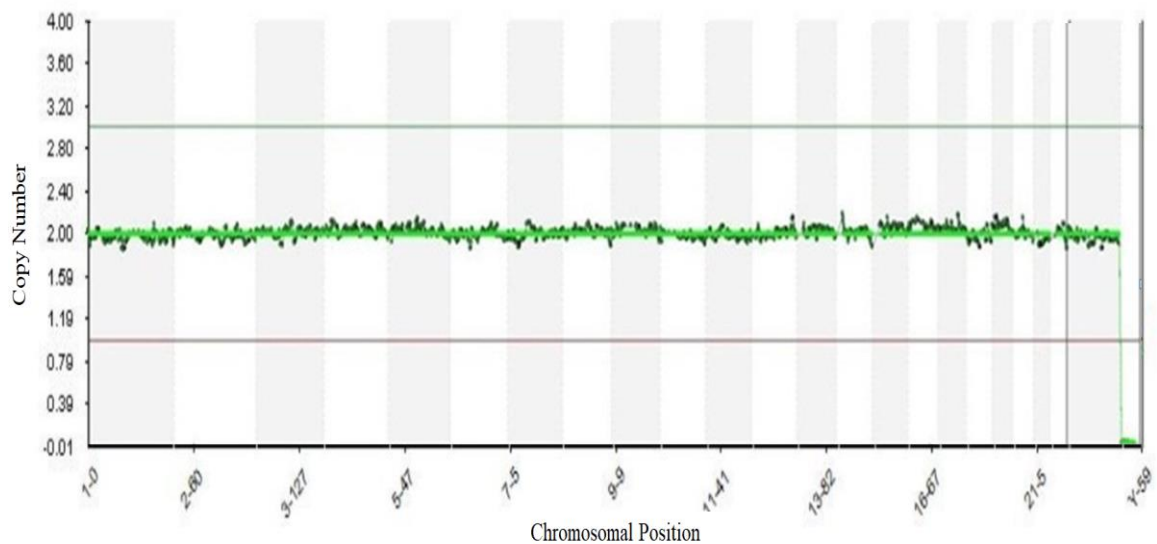
Các thông số	Kết quả NGS	Kết quả aCGH
Tổng số phôi sàng lọc	48	48
Số phôi bình thường (âm tính thật)	31	31
Số phôi lệch bội (dương tính thật)	17	17
Số phôi bất thường nhưng được kết luận bình thường (âm tính giả)	0	0
Số phôi bình thường nhưng kết luận bất thường (dương tính giả)	0	0
Độ nhạy	100%	
Độ đặc hiệu	100%	
Giá trị tiên đoán dương	100%	
Giá trị tiên đoán âm	100%	

Nhận xét: trong 48 kết quả phôi phân tích bằng kỹ thuật NGS, có 31 phôi có kết luận bình thường, 17 phôi có kết luận lệch bội NST. Tỷ lệ âm tính giả và dương tính giả của NGS đều bằng 0. Như vậy, độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán âm, giá trị tiên đoán dương của kỹ thuật NGS là 100%.

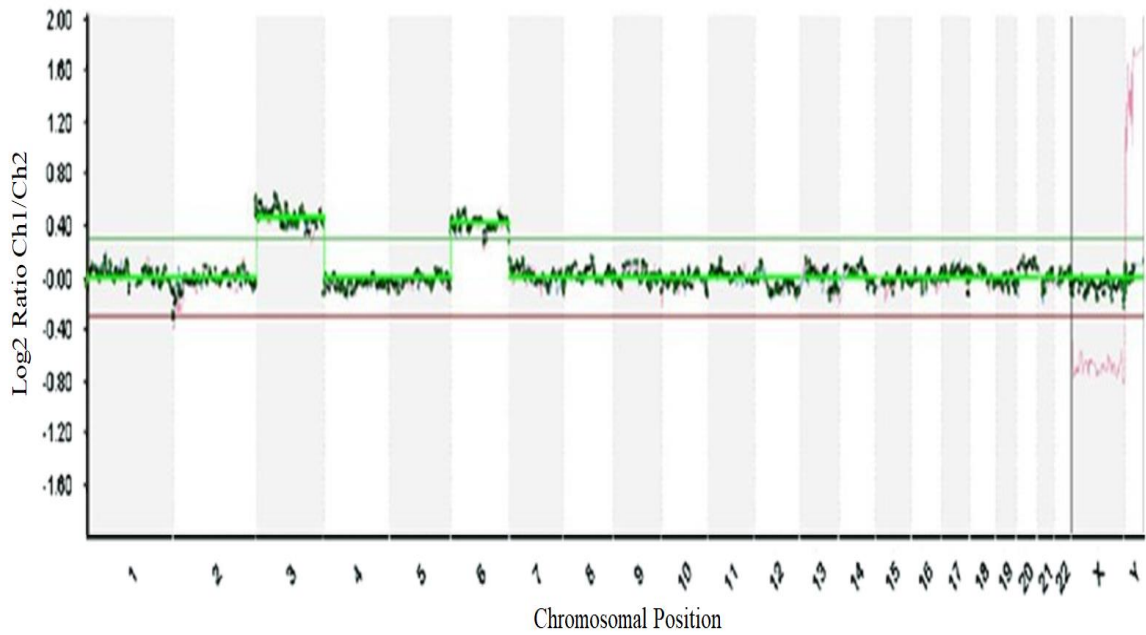
* Một số hình ảnh so sánh sự tương đồng kết quả của 2 kỹ thuật aCGH và NGS



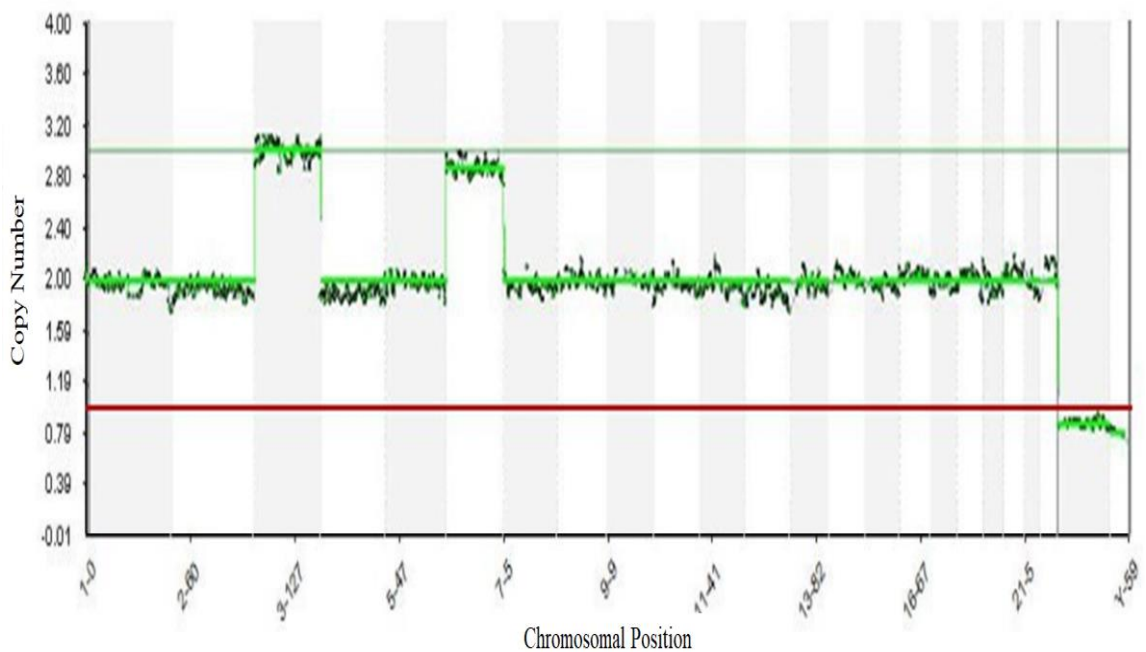
**Biểu đồ 3.12. Biểu đồ tỉ số \log_2 của phôi số 11
aCGH kết luận Karyotyp: 46,XX**



**Biểu đồ 3.13. Biểu đồ CNV của phôi số 11
NGS kết luận Karyotyp: 46,XX**



Biểu đồ 3.14. Biểu đồ tỉ số \log_2 của phôi số 20
aCGH kết luận Karyotyp: 48,XY,+3,+6



Biểu đồ 3.15. Biểu đồ CNV của phôi số 20
NGS kết luận Karyotyp: 48,XY,+3,+6

3.3. Đánh giá kết quả sàng lọc phôi trước làm tổ bằng kỹ thuật NGS

3.3.1. Đặc điểm bệnh nhân hiến phôi

Bảng 3.14. Đặc điểm bệnh nhân

Đặc điểm bệnh nhân	$\bar{X} \pm SD$	MIN-MAX
Độ tuổi trung bình	35,08 ± 5,17	24-44
Số chu kỳ IVF đã thực hiện	1,2 ± 0,8	1-3

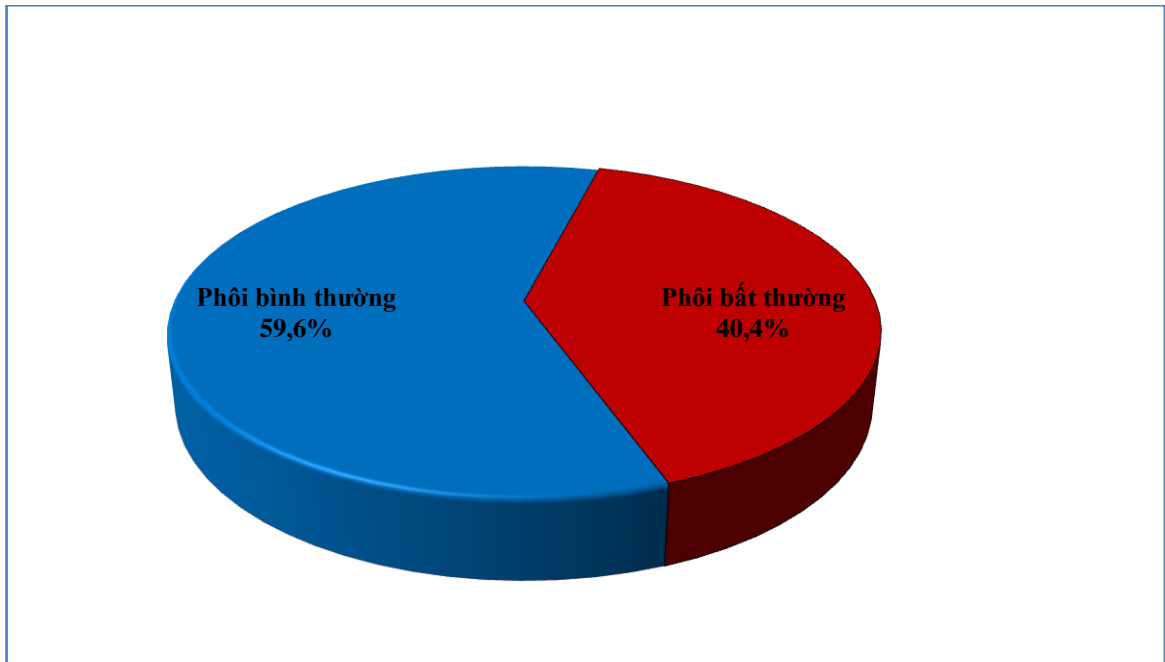
Nhận xét: Tuổi trung bình của bệnh nhân tham gia hiến phôi là 35,08 ± 5,17, bệnh nhân trẻ nhất 24 tuổi, bệnh nhân nhiều tuổi nhất là 44 tuổi. Số chu kỳ IVF đã thực hiện trung bình của nhóm bệnh nhân này là 1,2 ± 0,8, người thực hiện nhiều nhất là 3 chu kỳ.

Bảng 3.15. Đặc điểm vô sinh của bệnh nhân

Đặc điểm vô sinh		n	%	Tổng
Loại vô sinh	VSI	5	38,5	13
	VSII	8	61,5	
Các nguyên nhân gây vô sinh	Do vợ	6	46,1	13
	Do chồng	5	38,5	
	Không rõ nguyên nhân	2	15,4	
Tiền sử IVF thất bại	Không	0	0,0	13
	Có	13	100	

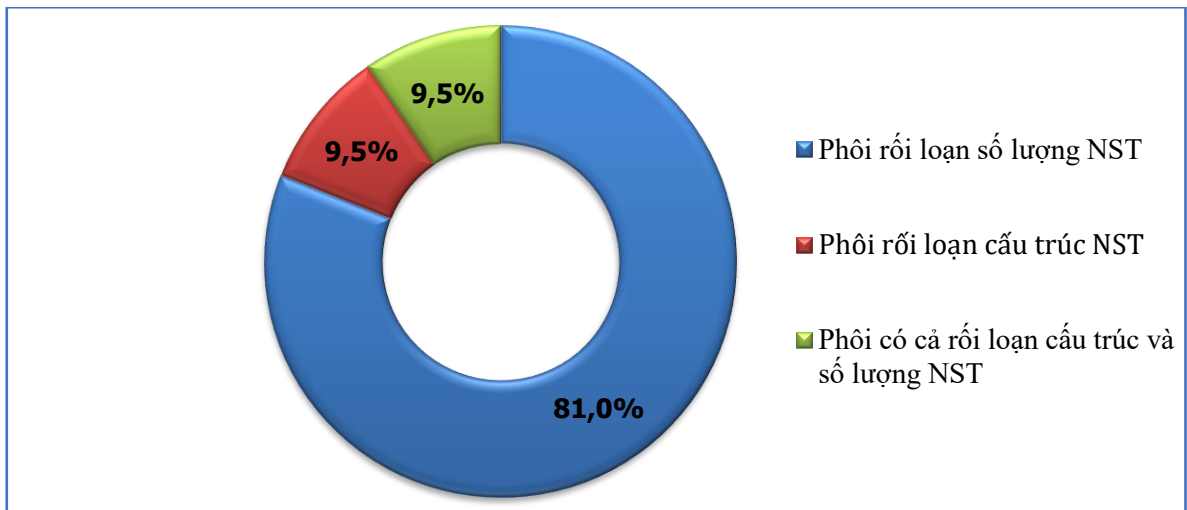
Nhận xét: Có 13 bệnh nhân tham gia nghiên cứu, trong đó có 61,5% là vô sinh II, nguyên nhân vô sinh do vợ là cao nhất chiếm 46,1%. Cả 13 trường hợp đều đã thất bại trong các chu kỳ IVF trước đó.

3.3.2. Đặc điểm bất thường NST của phôi



Biểu đồ 3.16. Tỷ lệ bất thường NST

Nhận xét: Trong 52 phôi có 31 phôi bình thường chiếm 59,6% và 21 phôi có rối loạn NST chiếm 40,4%.



Biểu đồ 3.17. Các loại bất thường NST ở phôi

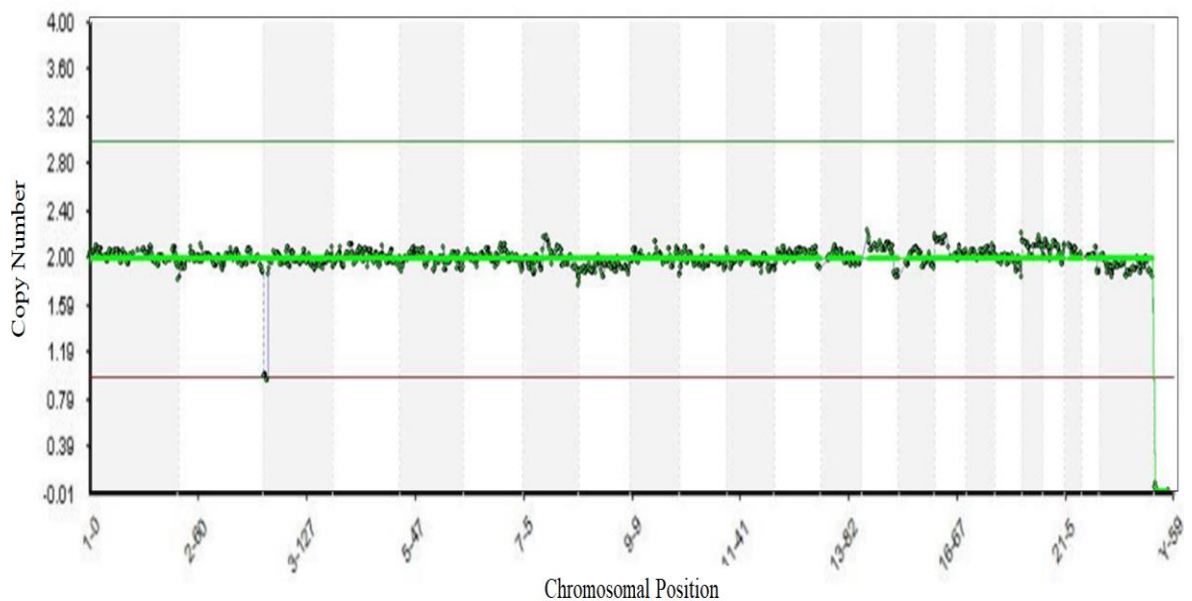
Nhận xét: Trong 21 phôi bất thường, có 17/21 phôi bị rối loạn số lượng NST, 2/21 phôi bị rối loạn cấu trúc và 2/21 phôi vừa rối loạn số lượng vừa rối loạn cấu trúc NST.

Bảng 3.16. Số lượng NST bị bất thường ở phôi

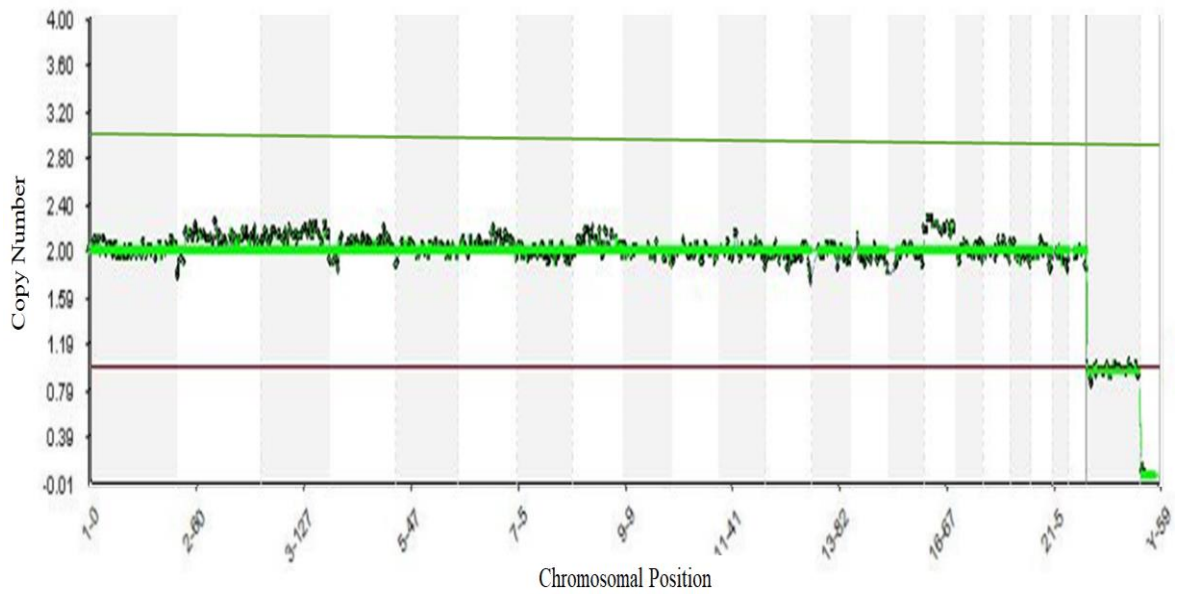
Phôi rối loạn NST	n	%
Bất thường 1 NST	10	47,6
Bất thường 2 NST	5	23,8
Bất thường ≥ 3 NST	1	4,8
Thể khảm	5	23,8
Tổng	21	100

Nhận xét: Trong số 21 phôi bất thường hay gặp nhất là rối loạn ở 1 cặp NST chiếm 47,6%, chỉ có 1 phôi có rối loạn ≥ 3 NST chiếm 4,8%, thể khảm gặp 5 trường hợp chiếm 23,8%.

Dưới đây là biểu đồ CNV của một số phôi rối loạn NST: Phôi số 4 (biểu đồ 3.18), phôi số 17 (biểu đồ 3.19), phôi số 42 (biểu đồ 3.20)

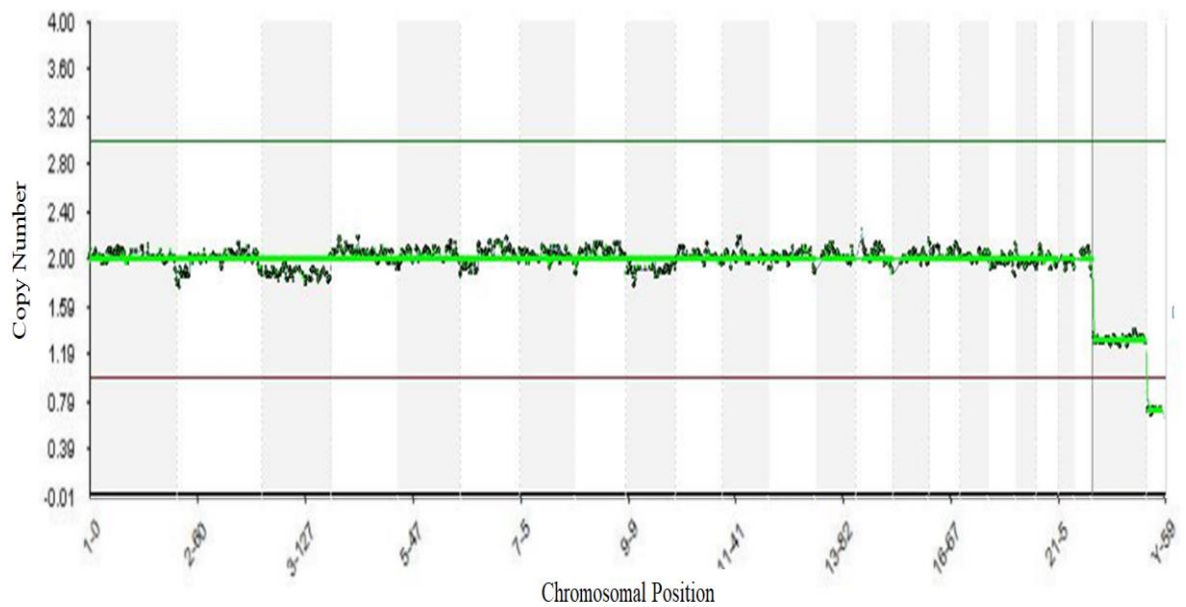
**Biểu đồ 3.18. Biểu đồ CNV phôi số 4. Rối loạn cấu trúc NST số 3**

Karyotyp: 46,XX,rec(3)del(3p)inv(3)(p24q29)
(Mất đoạn nhỏ KT 12,89 Mb nhánh ngắn NST số 3)
(đã làm Karyotyp bố: 46,XY,inv(3)(p24q29);
Karyotyp mẹ: 46,XX, tiền sử thai lưu 2 lần)



Biểu đồ 3.19. Biểu đồ CNV phôi số 17. Hội chứng Turner

Karyotyp: 45,X



Biểu đồ 3.20. Biểu đồ CNV phôi số 42. Đa bội

Karyotyp: 69,XXY

Bảng 3.17. Tần suất bất thường của 24 NST

STT	NST số	Bất thường		Bình thường		Tổng	
		n	%	n	%	n	%
1	1	2	9,3	19	90,7	21	100
2	2	3	14,3	18	85,7	21	100
3	3	3	14,3	18	85,7	21	100
4	4	2	9,3	19	90,7	21	100
5	5	2	9,3	19	90,7	21	100
6	6	3	14,3	18	85,7	21	100
7	7	2	9,3	19	90,7	21	100
8	8	2	9,3	19	90,7	21	100
9	9	1	4,8	20	95,2	21	100
10	10	2	9,3	19	90,7	21	100
11	11	1	4,8	20	95,2	21	100
12	12	3	14,3	18	85,7	21	100
13	13	3	14,3	18	85,7	21	100
14	14	3	14,3	18	85,7	21	100
15	15	3	14,3	18	85,7	21	100
16	16	4	19,0	17	81,0	21	100
17	17	1	4,8	20	95,2	21	100
18	18	3	14,3	18	85,7	21	100
19	19	1	4,8	20	95,2	21	100
20	20	3	14,3	18	85,7	21	100
21	21	5	23,8	16	76,2	21	100
22	22	4	19,0	17	81,0	21	100
23	X	2	9,3	19	90,7	21	100
24	Y	0	0,0	20	100	21	100

Nhận xét: Trong tổng số 21 phôi bị bất thường, rối loạn NST chỉ xảy ra ở 23 NST, gặp nhiều nhất là ở NST số 21 (23,8%), ít gặp hơn ở NST 9, 11, 17, 19. Không thấy bất thường NST Y.

3.3.3. Mối liên quan giữa tuổi mẹ và tình trạng phôi

Bảng 3.18. Đặc điểm phân bố tuổi và mối liên quan với số phôi

Tuổi mẹ	Số bệnh nhân	Tỷ lệ %	Số phôi	Tỷ lệ %
<35	5	38,5	21	40,4
≥35	8	61,5	31	59,6
Tổng	13	100	52	100

Nhận xét: Trong 13 bệnh nhân tham gia hiến phôi, có 8 bệnh nhân ≥35 tuổi chiếm 61,5%, và 5 bệnh nhân <35 tuổi chiếm 38,5%. Số phôi thu được để thực hiện sàng lọc của nhóm bệnh nhân ≥35 tuổi là 31/52 phôi, cao hơn của nhóm bệnh nhân <35 tuổi (21/52 phôi).

Bảng 3.19. Mối liên quan giữa tuổi và đặc điểm phôi

Tuổi	<35		≥35		p
	n	%	n	%	
Đặc điểm phôi					
Bình thường	15	71,4	16	51,6	>0,05
Bất thường	6	28,6	15	48,4	
Tổng phôi phân tích	21	100	31	100	

Nhận xét: Nhóm bệnh nhân <35 tuổi có tỷ lệ phôi bình thường là 71,4%), nhóm ≥35 tuổi có tỷ lệ phôi bình thường thấp hơn (chiếm 51,6%). Ngược lại, nhóm <35 tuổi có tỷ lệ phôi bất thường (28,6%) thấp hơn nhóm ≥35 tuổi (48,4%). Tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3.20. Mối liên quan giữa tuổi và các loại bất thường phôi

Tuổi	Số phôi		Bình thường (n=31)		Bất thường (n=21)						p
					Lệch bội		Lệch bội và khảm		Khảm		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
<35	21	40,4	15	48,4	5	31,2	0	0,0	1	25,0	>0,05
≥35	31	59,6	16	51,6	11	68,8	1	100,0	3	75,0	
Tổng	52	100	31	100	16	100	1	100	4	100	

Nhận xét: Tỷ lệ lệch bội, lệch bội và khảm, thể khảm ở nhóm ≥35 tuổi lần lượt là 68,8%; 100%; 75% đều cao hơn ở nhóm <35 tuổi, tương ứng là 31,2%; 0% và 25%. Tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3.21. Mối liên quan giữa tuổi và mức độ rối loạn NST

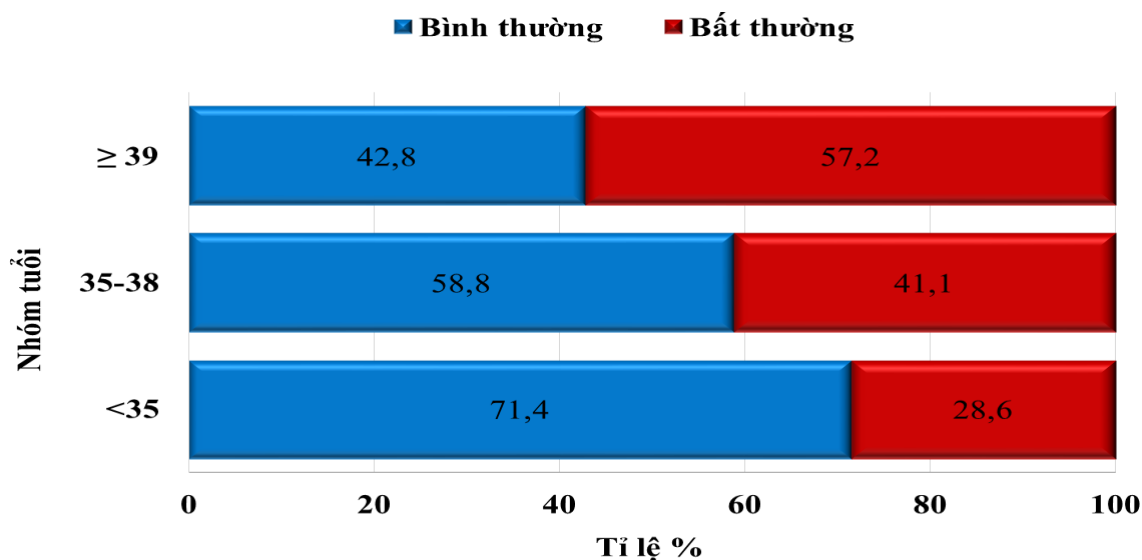
Phôi rối loạn \ Tuổi	<35		≥35		Tổng		p
	n	%	n	%	n	%	
1 NST	4	40,0	6	60,0	10	100	>0,05
2 NST	0	0,0	5	100,0	5	100	
≥3NST	1	100,0	0	0,0	1	100	
Khảm	1	20,0	4	80,0	5	100	

Nhận xét: Nhóm bệnh nhân ≥35 tuổi có tỷ lệ rối loạn ở 1 NST, 2NST, khảm lần lượt là 60,0%; 100%; 80% cao hơn tỷ lệ rối loạn ở nhóm <35 tuổi, tương ứng là 40%; 0,0% và 20%. Riêng tỷ lệ rối loạn ≥3NST ở nhóm <35 tuổi là 100%, nhóm ≥35 tuổi là 0%. Tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3.22. Liên quan giữa tuổi và tỷ lệ bất thường NST 13, 18, 21, và NST giới tính

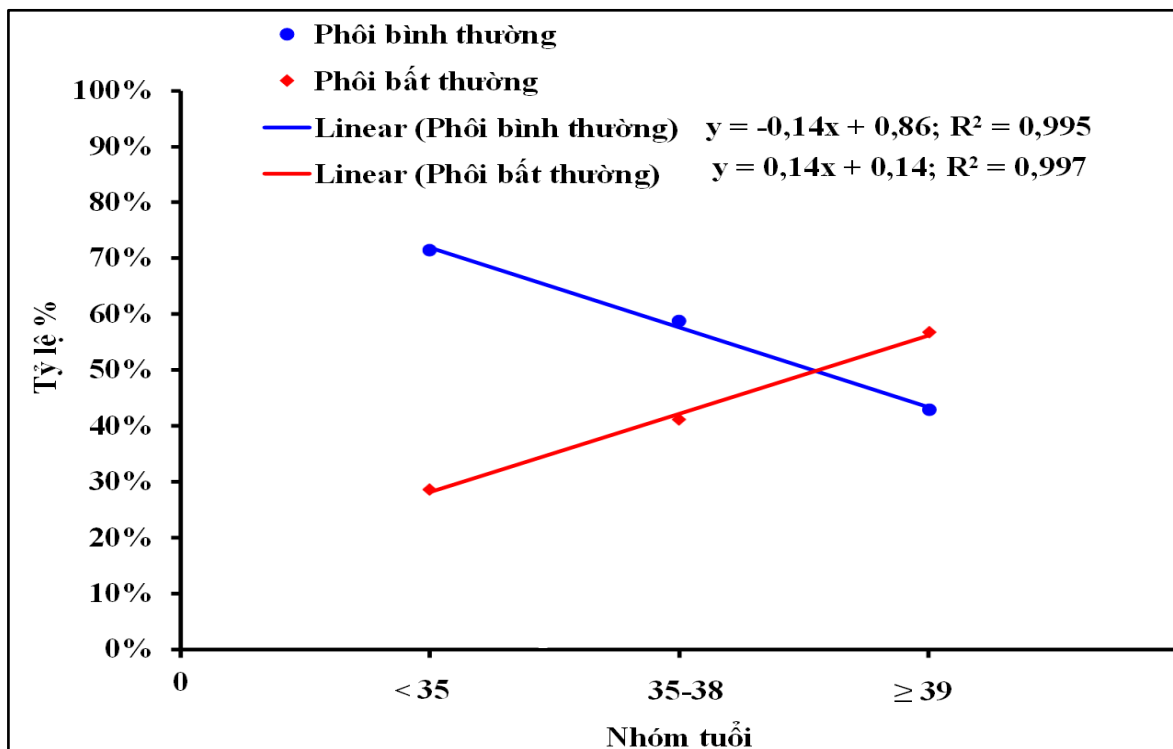
NST bất thường \ Tuổi	<35		≥35		Tổng	
	n	%	n	%	n	%
13	2	66,7	1	33,3	3	100
18	1	33,3	2	66,7	3	100
21	1	20,0	4	80,0	5	100
X/Y	0	0,0	2	100	2	100

Nhận xét: Rối loạn NST số 13 gặp nhiều ở nhóm bệnh nhân <35 tuổi (66,7%). Rối loạn NST 18 thì ngược lại, gặp nhiều ở nhóm ≥35 tuổi (66,7%). Đặc biệt là rối loạn NST 21 ở nhóm ≥35 tuổi cao gấp 4 lần nhóm <35 tuổi. Tỷ lệ rối loạn NST giới tính ở nhóm ≥35 là 100%, không gặp ở nhóm <35 tuổi. Tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với $p>0,05$.



Biểu đồ 3.21. Liên quan giữa nhóm tuổi mẹ và tỷ lệ phôi bình thường, bất thường

Nhận xét: Nhóm tuổi <35 có tỷ lệ phôi bình thường là cao nhất 71,4%, tỷ lệ phôi bất thường là thấp nhất 28,6%. Càng tuổi cao số phôi bình thường càng giảm, số phôi bất thường càng tăng. Nhóm tuổi 35-38 có tỷ lệ phôi bình thường thấp hơn nhóm <35, tỷ lệ phôi bất thường cao hơn nhóm <35 tuổi. Đặc biệt nhóm từ 39 tuổi trở lên có tỷ lệ phôi bình thường thấp nhất 42,8% và tỷ lệ phôi bất thường cao nhất 57,2%. Tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.



Biểu đồ 3.22. Đường hồi quy tuyến tính thể hiện mối tương quan giữa nhóm tuổi mẹ và tỷ lệ phôi bình thường, phôi bất thường NST

Nhận xét: Tỷ lệ phần trăm phôi bình thường (y) tương quan ngược chiều với tuổi mẹ (x) theo phương trình tương quan $y = -0,14x + 0,86$, hệ số tương quan $r = 0,997$, ($p > 0,05$). Tỷ lệ phần trăm phôi bất thường (y) tương quan cùng chiều với tuổi mẹ (x) theo phương trình tương quan $y = 0,14x + 0,14$, hệ số tương quan $r = 0,998$ ($p > 0,05$).

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

Mặc dù, sàng lọc rối loạn 24 NST cho phôi không giúp tạo ra một phôi khỏe mạnh hoặc cải thiện sức khỏe của phôi. Nhưng dựa vào kết quả sàng lọc rối loạn NST của phôi để lựa chọn được phôi có số lượng NST bình thường để chuyển vào buồng tử cung sẽ giúp bệnh nhân điều trị IVF có cơ hội sinh con khỏe mạnh trong thời gian sớm nhất. Đồng thời tăng cơ hội được làm cha mẹ khi tuổi cao, rút ngắn được thời gian điều trị vô sinh vì không bị trải qua nhiều lần IVF thất bại, do tránh được nguy cơ đa thai, sảy thai, thai lưu hoặc sinh một đứa trẻ bị dị tật nghiêm trọng do bất thường số lượng NST gây ra [147],[148],[149].

Nhờ sự tiến bộ của di truyền học hiện đại, nhiều kỹ thuật di truyền tế bào và phân tử được ứng dụng thành công trong xét nghiệm di truyền trước làm tổ như FISH, CGH, KL-BoBs, aCGH... hoặc gần đây hơn là giải trình tự thế hệ mới NGS. Năm 2014, Fiorentino và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu xác nhận tiềm năng ứng dụng lâm sàng của NGS. Nghiên cứu đã chứng minh rằng NGS là một phương pháp mạnh mẽ có tiềm năng ứng dụng lâm sàng rộng rãi trong sàng lọc rối loạn 24 NST của phôi. Các nghiên cứu sau đó còn chỉ ra rằng, kỹ thuật NGS có thể giúp giảm đáng kể chi phí PGT-A trong khi vẫn giữ được mức độ phát hiện chính xác cao so với các kỹ thuật hiện có [22]. Do đó NGS có xu hướng áp dụng ngày càng rộng rãi. Tuy nhiên vẫn còn rất nhiều nghiên cứu trên thế giới đang được thực hiện để khẳng định tính ứng dụng của kỹ thuật này.

Hiện nay, ở Việt Nam vẫn chưa có nghiên cứu nào về ứng dụng kỹ thuật NGS trong sàng lọc 24 NST trước làm tổ. Nên nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu đầu tiên được thực hiện tại Việt Nam nhằm hoàn thiện quy

trình kỹ thuật NGS, đánh giá độ chính xác của NGS so với kỹ thuật aCGH ra đời trước đó, sau đó đánh giá tính ứng dụng của NGS trong sàng lọc rối loạn 24 NST của phôi IVF.

4.1. Hoàn thiện quy trình sàng lọc rối loạn 24 NST bằng kỹ thuật NGS trên tế bào phôi

Nghiên cứu của chúng tôi lựa chọn phôi nang ngày 5-6, chứ không lựa chọn phôi ngày 3, vừa ít gây tổn thương phôi, vừa giúp làm giảm nguy cơ phân loại sai do phôi thể khảm [150]. Vì phôi ngày 3 có tỷ lệ lệch bội NST và phôi ở thể khảm khá cao 50% [76] nhưng đến giai đoạn phôi nang tỷ lệ này giảm đáng kể còn 3-5% [77],[78],[79]. Hơn nữa, một số phôi lệch bội NST ngày 3 có thể tự sửa chữa thành phôi bình thường khi phát triển thành phôi nang. Như vậy PGT vào ngày thứ 3 của sự phát triển phôi không phải lúc nào cũng đại diện về tình trạng rối loạn NST của phôi. Như vậy, theo logic sinh thiết phôi ở giai đoạn phôi nang, nơi có tỉ lệ khảm thấp hơn, sẽ có kết quả sàng lọc rối loạn NST chính xác hơn.

Chúng tôi tiến hành sinh thiết 5-10 phôi bào của nguyên bào lá nuôi (TE) để thực hiện nghiên cứu này. Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu về vị trí sinh thiết phôi nhưng sinh thiết nguyên bào lá nuôi của phôi nang vẫn được xem là kỹ thuật giúp 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 đoán.

Một số tác giả tiến hành nghiên cứu vị trí sinh thiết mới để so sánh với sinh thiết nguyên bào lá nuôi nhưng chưa cho kết quả như mong đợi. Magli và cộng sự (2016) còn tiến hành hút dịch trong nang (blastocoelic fluid/BF) của phôi ngày 5, nhằm sử dụng DNA trong khoang dịch của phôi nang để khuếch đại hệ gen (WGA) và tiến hành xét nghiệm di truyền cho phôi IVF và so sánh với kết quả xét nghiệm từ nguyên bào lá nuôi của phôi. Tuy nhiên

tỷ lệ WGA chỉ thành công 82%. Độ phù hợp của phôi bình thường là 97,1% (67/69), với độ phù hợp trên mỗi nhiễm sắc thể là 98,4%. Do đó sinh thiết nguyên bào lá nuôi vẫn có nhiều ưu điểm nhất [80].

Đặc biệt, theo nghiên cứu gần đây của Victor và cộng sự (2019) sử dụng 88 phôi nang đã bị kết luận lệch bội (sinh thiết TE), thực hiện sinh thiết lại nhưng lấy phôi bào từ nguyên bào phôi (ICM) để thực hiện PGT-A. Kết quả cho thấy có 86 kết quả lệch bội, như vậy sự giống nhau về kết luận là 97,7% [151]. Điều này chứng minh tế bào TE là tế bào có tính đại diện cao cho phôi nang. Sinh thiết phôi nang, chỉ lấy nguyên bào lá nuôi còn nguyên bào phôi bào vẫn được bảo tồn nên sự phát triển tiếp theo của phôi không bị ảnh hưởng.

He và cộng sự (2019) đã so sánh: tuổi thai, cân nặng khi sinh và tỷ lệ sinh non, tình trạng nhẹ cân cũng như tình trạng thai nhi quá to (macrosomia) của 1.721 trẻ sơ sinh giữa nhóm có sinh thiết phôi nang (lấy tế bào TE) và nhóm không sinh thiết phôi (nhóm chứng) để điều tra xem liệu sinh thiết phôi nang trong xét nghiệm di truyền trước làm tổ có làm tăng nguy cơ bất lợi ở trẻ sơ sinh hay không. Kết quả cho thấy sinh thiết phôi nang không làm tăng rủi ro bất lợi cho sơ sinh khi so sánh với nhóm đối chứng [82].

Như vậy sinh thiết phôi nang (lấy TE) giúp giảm mức độ tổn thương phôi và mang lại kết quả di truyền chính xác nhất hiện nay.

Sau khi lấy sinh thiết phôi, các tế bào phôi được rửa trong dung dịch đệm phosphate (PBS+PVP) vô trùng. Chúng tôi đã thu được 24 ống PCR1 (chứa tế bào phôi) và 24 ống PCR2 (chứa dung dịch rửa). Các mẫu này được chuyển về phòng xét nghiệm DNA thuộc Bộ môn giải phẫu của Học viện Quân Y để thực hiện khuếch đại hệ gen.

4.1.1. Quy trình khuếch đại hệ gen (WGA)

❖ Lựa chọn kit WGA

Nhờ sự kết hợp của toán học, hóa học và sinh học, Cavalier - Smith (1985) đã tìm ra công thức tính trọng lượng phân tử của 1 hạt nhân tế bào người từ số lượng cặp nucleotide (DNA content (pg) = genome size (bp)/(0,978x10⁹)), ước tính chỉ khoảng 6,5 picogram (pg) DNA [152]. Nhưng để thực hiện được xét nghiệm di truyền giải trình tự gen, quy trình khuyến nghị yêu cầu số lượng DNA ở mức nanogram (ng) để thực hiện. Điều này đòi hỏi phải WGA hơn 1000 lần để đủ tạo thư viện đưa vào giải trình tự.

Hơn nữa, vì các công nghệ này thường được áp dụng để đánh giá định lượng các biến thể bản sao của NST, nên yêu cầu quy trình WGA phải nhân được đủ về số lượng DNA trên toàn bộ bộ gen nhưng vẫn đảm bảo độ trung thực của kiểu gen. Vì sản phẩm WGA mà không chính xác sẽ làm thay đổi số lượng bản sao trong bộ gen có thể dẫn đến kết quả giải trình tự sai lệch. Do đó, WGA để tạo đủ DNA cho việc xây dựng thư viện chính xác là 1 một bước quan trọng, quyết định sự thành công của quy trình giải trình tự gen.

Vì vậy, cần phải lựa chọn bộ kit WGA tốt nhất, đảm bảo hiệu quả WGA và độ chính xác cao nhất để thực hiện nghiên cứu. Chúng tôi đã cân nhắc kỹ trước khi quyết định dựa vào một số công bố trên thế giới đánh giá các bộ kit WGA khác nhau.

Treff và cộng sự (2011) đã nghiên cứu các kỹ thuật WGA khác nhau trên các mẫu tế bào đơn. đã sử dụng ba bộ kit WGA có bán trên thị trường; GenomePlex (WGA4; Sigma-Aldrich, USA), REPLI-g (Single Cell Kit; Qiagen, USA) và GenomiPhi (GE Healthcare, USA) để so sánh chúng về độ tin cậy khuếch đại, độ trung thực và độ chính xác bằng phân tích microarray

SNP. Kết quả cho thấy: GenomiPhi đã có thể khuếch đại 88% các tế bào đơn lẻ mang lại >250ng DNA. REPLI-g và GenomePlex >250ng DNA trong 100% tế bào đơn. REPLI-g cung cấp độ phủ cho 88% thông tin của bộ gen và GenomiPhi và GenomePlex cung cấp 74% và 78% tương ứng. Độ chính xác của số bản sao SNP là 99% cho GenomePlex, 95% cho REPLI-g và 62% cho GenomiPhi. Độ chính xác của NST là 99% đối với GenomePlex, 97% đối với REPLI-g và 75% đối với GenomiPhi. Độ chính xác chẩn đoán karyotyping là 100% cho GenomePlex, 83% cho REPLI-g và 0% cho GenomiPhi. Thời gian khuếch đại cũng rất quan trọng khi xem xét ứng dụng công nghệ WGA đơn bào vào PGT. GenomePlex thực hiện WGA nhanh nhất chỉ trong 4 giờ, ngược lại GenomiPhi và REPLI-g cần tới 16 giờ). Điều này cho thấy GenomePlex là bộ kit phù hợp cho việc phân tích rối loạn NST hơn cả [153].

Tuy nhiên, Chen D và cộng sự (2018) đã so sánh độ chính xác của GenomePlex (WGA4; Sigma-Aldrich, USA) và SurePlex (BlueGnome, UK). Kết quả cho thấy bộ kit SurePlex cho khả năng khuếch đại cao hơn, tần số lỗi trình tự thấp hơn [154].

Đặc biệt, Deleye và cộng sự (2015) cũng so sánh kit WGA SurePlex (BlueGnome, UK) và MALBAC (Yikon genomics, China). Kết quả cho thấy WGA bằng kit SurePlex dẫn đến sự đồng đều hơn trên bộ gen, cho phép phát hiện số bản sao tốt hơn với ít dương tính giả hơn so với các mẫu được WGA bằng MALBAC. Kit SurePlex đã khẳng định giá trị vượt trội khi thực hiện WGA từ các tế bào đơn, với mục đích phục vụ PGT [155].

Như vậy, kết quả của 3 nghiên cứu trên đã khẳng định bộ kit SurePlex là bộ kit WGA hiệu quả nhất, phù hợp WGA từ các tế bào đơn. Do đó,

chúng tôi đã chọn lựa bộ kit SurePlex để hoàn thiện quá trình nhân trong nghiên cứu này.

❖ **Đánh giá sản phẩm WGA**

Đối với mỗi phôi IVF, sau khi thực hiện sinh thiết phôi và rửa mẫu phôi bào, chúng tôi thu được 1 ống PCR thấy rõ tế bào và 1 ống PCR đựng dung dịch rửa để tiến hành WGA bằng bộ kit SurePlex.

Chúng tôi tiến hành đánh giá sản phẩm WGA bằng điện di trên gel agarose. Kết quả cho thấy cả 24 mẫu tế bào phôi đều xuất hiện băng sản phẩm, các băng của sản phẩm WGA khá đồng đều (bảng 3.1). Dải băng sản phẩm phù hợp với dải băng sản phẩm khuyến cáo của nhà sản xuất. Và toàn bộ mẫu dung dịch rửa, mẫu chứng âm đều không xuất hiện băng sản phẩm. Kết quả này cho thấy không có hiện tượng nhiễm DNA ngoại lai ở hai giai đoạn sinh thiết và rửa tế bào. Hơn nữa, độ sáng của cả 24 băng sản phẩm cũng cho thấy cả 24 mẫu phôi bào đều sinh thiết thành công (lấy được nhân tế bào) và nồng độ DNA sau WGA đảm bảo đủ để phục vụ chuẩn bị thư viện cho bước tiếp theo là giải trình tự gen (hình 3.1).

Kết quả WGA còn được đánh giá bằng định lượng nồng độ DNA bằng Qubit. Kết quả này giúp đánh giá sinh thiết, rửa tế bào có thành công hay không mà còn định lượng chính xác nồng độ DNA sản phẩm WGA xem có đủ cho giải trình tự ở giai đoạn sau một cách chính xác hay không. Theo khuyến cáo của hãng, lượng DNA của các mẫu có tế bào phải trên 25 ng/ μ L. Đối với mẫu chứng âm phải dưới 10 ng/ μ L. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, kết quả cho thấy cả 24 mẫu đều có lượng DNA đạt về số lượng trên 25 ng/ μ L, các mẫu dung dịch rửa đều nhỏ hơn 10ng/ μ L (bảng 3.3). Điều này cũng cho thấy việc sinh thiết và rửa tế bào đã thành công, việc WGA

thành công, đảm bảo không nhiễm DNA ngoại lai đồng thời có nồng độ DNA đảm bảo cho thư viện phục vụ cho bước giải trình tự gen tiếp theo.

Như vậy, chúng tôi đã chọn lựa bộ kit SurePlex để hoàn thiện quá trình WGA, đảm bảo có được thư viện DNA chính xác và nhanh nhất, chỉ cần 2,5 giờ, đáp ứng được nhu cầu chuyên phôi tươi trong vòng 24 giờ của bác sỹ lâm sàng chỉ định PGT.

4.1.2. Quy trình giải trình tự gen

Sau khi đã WGA thành công, quy trình thực hiện tiếp theo của quá trình giải trình tự gồm: phân mảnh sợi DNA, gắn index và Adapter, khuếch đại, tinh sạch, chuẩn hóa, tổ hợp thư viện sau chuẩn hóa và giải trình tự gen và phân tích dữ liệu xác định tình trạng rối loạn NST.

Kết quả chuẩn hóa quy trình của chúng tôi đều đạt các tiêu chí bảo đúng yêu cầu của hãng, 100% mẫu đều đạt tổng số lần đọc là 700.000-1.000.000 lần/mẫu, tổng số lần đọc tối thiểu sau khi lọc là 250.000/mẫu, điểm chất lượng trung bình là trên 30, điểm về độ nhiễu của mẫu không vượt quá 0,4 và độ tin cậy của vùng khuếch đại của mỗi NST phải đạt trên 0,7 (bảng 3.4).

Chúng tôi đã thực hiện thành công chuẩn hóa quy trình giải trình tự gen thế hệ mới với dữ liệu đạt 1,1 Gb đầu ra với độ chính xác 99,999% ($>Q30$) (hình 3.2), đạt các tiêu chí đảm bảo đúng yêu cầu kỹ thuật, giúp các mẫu thực hiện phân tích có đầy đủ dữ liệu để kết luận kết quả.

❖ Kết quả quy trình giải trình tự gen

Chúng tôi đã thực hiện giải trình tự gen bằng kỹ thuật NGS cho 24 mẫu phôi bào, thu được 24 kết quả. Trong đó có 11 phôi bình thường chiếm 45,8%, 13 phôi bất thường chiếm 54,2% (bảng 3.5).

Trong số 13 phôi bất thường, có 12 phôi bất thường số lượng (bảng 3.5 và biểu đồ 3.2), và phát hiện 1 phôi số 19 rối loạn nhiều NST kèm thể khảm (biểu đồ 3.3). Trong đó hay gặp nhất phôi có bất thường 2 NST (chiếm 25%) (bảng 3.5).

Điều này cho thấy tỷ lệ bất thường của phôi IVF là rất cao, lý giải một phần nguyên nhân thất bại của IVF trước đây còn cao vì mới chỉ đánh giá, chọn lựa phôi chuyên dựa vào hình thái của phôi.

❖ **Tối ưu hóa quy trình giải trình tự gen**

Sau khi chuẩn hóa quy trình, chúng tôi tiếp tục thực hiện tối ưu hóa quy trình để vừa đảm bảo đạt các tiêu chí yêu cầu của hãng, vừa có thể trả kết quả sàng lọc phôi nhanh nhất và tiết kiệm nhất, khắc phục tình trạng gom mẫu cho đủ một mẻ chạy nên trả kết quả chậm.

Theo khuyến cáo của hãng, chỉ cần 1ng DNA cho một lần phân tích và mỗi lần phân tích được 96 mẫu để đáp ứng nhu cầu của các trung tâm IVF lớn trên thế giới, giúp giảm giá thành của xét nghiệm so với các kỹ thuật ra đời trước đó, chi phí cho xét nghiệm 1 phôi là thấp nhất. Tuy nhiên, nếu 1 lần chạy không có đủ 96 phôi thì vẫn phải dùng 1 bộ kit với hóa chất cho đủ 96 phôi, nên chi phí xét nghiệm cho 1 phôi lại cao hoặc phải gom đủ 96 mẫu chạy thì kết quả trả lời sẽ rất chậm.

Vì vậy, căn cứ trên những tiêu chí phải đạt trên, chúng tôi đã tối ưu quy trình giải trình tự nhiều lần, trên các bộ chạy máy khác nhau để đảm bảo chạy số lượng mẫu khác nhau như 4 mẫu/lần chạy, 8 mẫu/lần chạy, 16 mẫu/lần chạy và 24 mẫu/lần chạy. Kết quả của sau nhiều lần giải trình tự và điều chỉnh đã giúp thu được các tín hiệu đảm bảo theo yêu cầu về tiêu chí tín hiệu của từng mẫu, từng NST khi thực hiện trên các bộ kit chạy máy khác nhau.

Chúng tôi đã thực hiện giải trình tự gen 4 mẫu phôi bào/1 lần chạy bằng bộ kit Miseq Reagent kit v2 Nano, kết quả là 100% mẫu đạt yêu cầu (bảng 3.6 và hình 3.3). 100% mẫu đều đạt tổng số lần đọc là >700.000 , tổng số lần đọc tối thiểu sau khi lọc là $250.000/\text{mẫu}$, điểm chất lượng trung bình là >30 , điểm ghép cặp trung bình >30 , điểm về độ nhiễu của mẫu không vượt quá $0,4$ và độ tin cậy của vùng khuếch đại của mỗi NST đạt $> 0,7$.

Khi thực hiện giải trình tự gen 8 mẫu phôi bào/1 lần chạy bằng bộ kit Miseq Reagent kit v2 Micro, kết quả là 100% mẫu đạt yêu cầu (bảng 3.7 và hình 3.4). 100% mẫu đều đạt tổng số lần đọc là >700.000 , tổng số lần đọc tối thiểu sau khi lọc là $250.000/\text{mẫu}$, điểm chất lượng trung bình là >30 , điểm ghép cặp trung bình >30 , điểm về độ nhiễu của mẫu không vượt quá $0,4$ và độ tin cậy của vùng khuếch đại của mỗi NST đạt $> 0,7$.

Khi thực hiện giải trình tự gen 16 mẫu phôi bào/1 lần chạy bằng bộ kit Miseq Reagent kit v2 Standard, kết quả là 100% mẫu đạt yêu cầu (bảng 3.8 và hình 3.5). 100% mẫu đều đạt tổng số lần đọc là >700.000 , tổng số lần đọc tối thiểu sau khi lọc là $250.000/\text{mẫu}$, điểm chất lượng trung bình là >30 , điểm ghép cặp trung bình >30 , điểm về độ nhiễu của mẫu không vượt quá $0,4$ và độ tin cậy của vùng khuếch đại của mỗi NST đạt $> 0,7$.

Tương tự, chúng tôi thực hiện giải trình tự gen 24 mẫu phôi bào/1 lần chạy bằng bộ kit Miseq Reagent kit V3, kết quả cũng thu được 100% mẫu đều đạt yêu cầu (bảng 3.9 và hình 3.6). 100% mẫu đều đạt tổng số lần đọc là >700.000 , tổng số lần đọc tối thiểu sau khi lọc là $250.000/\text{mẫu}$, điểm chất lượng trung bình là >30 , điểm ghép cặp trung bình >30 , điểm về độ nhiễu của mẫu không vượt quá $0,4$ và độ tin cậy của vùng khuếch đại của mỗi NST đạt $> 0,7$.

Nhờ việc tối ưu hóa thành công quy trình chạy để xây dựng quy trình chạy trên số lượng mẫu nhỏ bằng bộ chạy máy có dung lượng tốt hơn, với số lượng mẫu linh hoạt từ 4 mẫu đến 24 mẫu/lần chạy, chúng tôi đã giúp giảm giá thành của dịch vụ và đảm bảo thời gian trả kết quả theo yêu cầu của trung tâm IVF. Điều này rất có ý nghĩa và phù hợp với điều kiện kinh tế của bệnh nhân Việt Nam.

Như vậy, chúng tôi đã hoàn thiện quy trình kỹ thuật NGS phục vụ sàng lọc trước làm tổ, đồng thời tối ưu hóa thành công quy trình chạy trên số lượng mẫu nhỏ, với số lượng mẫu linh hoạt từ 4 mẫu đến 24 mẫu/lần chạy. Toàn bộ quy trình được hoàn thành <24 giờ mà vẫn tiết kiệm đáng kể chi phí liên quan. Điều này rất có ý nghĩa và phù hợp với điều kiện kinh tế của bệnh nhân Việt Nam.

4.2. Đánh giá độ chính xác của kỹ thuật NGS so với kỹ thuật aCGH trong sàng lọc rối loạn 24 nhiễm sắc thể trên tế bào phôi

Chúng tôi đã thực hiện sàng lọc rối loạn di truyền cho 52 phôi nang. Cả 52 phôi đều được sinh thiết và rửa thành công, quá trình WGA đều đạt nồng độ DNA lớn hơn 25 ng/ μ L (bảng 3.11) đảm bảo đủ thư viện để đồng thời thực xét nghiệm bằng kỹ thuật NGS tại Học viện Quân Y và xét nghiệm bằng kỹ thuật aCGH tại Singapore.

Thực hiện giải trình tự gen bằng NGS cho 52 mẫu phôi bào thu được 52 kết quả. Thực hiện xét nghiệm bằng kỹ thuật aCGH cho 52 mẫu phôi bào tương ứng, thu được 48 kết quả (bảng 3.12); có 4 mẫu phôi bào: phôi số 1 (biểu đồ 3.4), phôi số 14 (biểu đồ 3.6), phôi số 21 (biểu đồ 3.8), phôi số 50 (biểu đồ 3.10) không được kết luận nên không có kết quả. Nguyên nhân là 4 kết quả này đều có rối loạn liên quan đến thể khảm hoặc rối loạn cấu trúc hoặc rối loạn không nằm trong giới hạn đọc tự động của Phần mềm đa năng

BlueFuse Multi (BMF) của aCGH; và bộ kit phục vụ cho sàng lọc phôi bằng aCGH không thiết kế để đọc rối loạn cấu trúc cũng như thể khảm của phôi với tỷ lệ thấp, kỹ thuật aCGH không kết luận kết quả cho một NST nhất định khi tỷ lệ dưới $3 \times SD$ hoặc / và tỷ lệ đọc $\pm 0,3 \log_2$, do đó có 4 kết quả được phân loại là "không kết luận".

Trong khi đó, chúng tôi sử dụng phần mềm BlueFuse Multi phiên bản 4.4 (Illumina, Inc.) phân tích kết quả tự động cho NGS. Đồng thời sử dụng một cơ sở dữ liệu chứa thông tin về hệ gen của con người mới nhất (GRCh37) để tham chiếu là BG_Annotation_Ens71_20160909.db sau đó nhóm nghiên cứu mới đưa ra kết luận cho từng kết quả.

Dữ liệu tham chiếu 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 1Mb 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, thậm chí thể khảm một theo khuyến cáo của hãng một cách dễ dàng [146].

Với nguyên lí đọc kết quả này đã cho phép kỹ thuật NGS đã đưa ra được kết luận kết quả cho phôi số 4 phôi 1, 14, 21 và 50 mà aCGH đã không kết luận kết quả.

Tuy nhiên sau khi đánh giá thủ công, những phôi aCGH không kết luận kết quả đều được chẩn đoán là lệch bội tương đồng kết quả của NGS.

Như vậy, kỹ thuật NGS đã thể hiện ưu điểm về khả năng phân tích kết quả của mình so với kỹ thuật aCGH. Việc này có ý nghĩa to lớn cho các bác sĩ lâm sàng, hạn chế được tình trạng mất thông tin của phôi sau khi xét nghiệm PGT, giúp các bác sĩ lâm sàng có thể chọn lựa được phôi một cách tốt nhất trước khi chuyển phôi.

Để đánh giá độ chính xác của kỹ thuật NGS, chúng tôi tiến hành so sánh kết quả của 48 phôi được cả 2 kỹ thuật cùng kết luận. Trong số 48 mẫu, kết quả phân tích bằng 2 kỹ thuật đều cho thấy có 31 mẫu lưỡng bội, 17 mẫu lệch bội với tỷ lệ tương ứng là 64,6% và 35,4%.

Sự phù hợp của hai phương pháp được đánh giá thông qua độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật NGS so với kỹ thuật aCGH. Kết quả trên cho thấy, độ nhạy, độ đặc hiệu, tỷ lệ đồng thuận 100% (bảng 3.13 và bảng 3.14). Như vậy, kết quả xét nghiệm sàng lọc rối loạn 24 NST của phôi bằng kỹ thuật NGS phù hợp với kết quả của kỹ thuật aCGH (biểu đồ 3.12 - 3.13, biểu đồ 3.14 - 3.15).

Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi phù hợp với các đánh giá về độ chính xác của kỹ thuật sàng lọc rối loạn 24 NST trước làm tổ dựa trên giải trình tự thế hệ mới. Năm 2014, Fiorentino và cộng sự là nhóm nghiên cứu đầu tiên trên thế giới tiến hành đánh giá độ chính xác của sàng lọc 24 NST bằng kỹ thuật NGS trên các tế bào phôi ngày 3. Nhóm nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật NGS để phân tích 18 tế bào đơn và 190 sản phẩm WGA từ các

phôi ngày 3 được phân tích trước đây bằng kỹ thuật aCGH. Kết quả với mức độ nhất quán cao với độ đặc hiệu NGS là 100% (95% CI 94,59% -100%) với độ nhạy 100% (95% CI 97,39% -100%) [22].

Năm 2015, Allen và cộng sự đã sử dụng kỹ thuật NGS để phân tích 24 NST của 138 phôi từ 35 bệnh nhân và 18 tế bào đơn từ sáu dòng tế bào, đồng thời phân tích bằng aCGH. Đối với các mẫu có thể phân tích được, tỷ lệ phù hợp 100% đối với phôi bình thường (44/44) và 100% đối với phôi lệch bội (108/108). Kết quả trên mỗi phôi, độ nhạy NGS là 100% (không có âm tính giả) và độ đặc hiệu 100% (không có dương tính giả) [156].

Năm 2015, Yang và cộng sự đã tiến hành sàng lọc di truyền cho 164 phôi nang được phân tích bằng NGS so sánh với aCGH. Kết quả: Độ đặc hiệu của NGS đối với lệch bội (24 NST) là 100% (95 % CI: 95.32 %–100 %) với độ nhạy 100% (95 % CI: 98.16 %–100 %). Giá trị dự đoán dương tính và âm tính của sàng lọc NGS đều là 100%. So sánh chi tiết các thể dị bội một phần được phát hiện bằng sàng lọc NGS và aCGH của cùng một sản phẩm WGA cho thấy NGS đã phát hiện sự tăng và giảm một phần nhiễm sắc thể chính xác hơn, cho thấy rằng NGS có thể phát hiện thể lệch bội và mất đoạn trên cùng một NST. So sánh sâu hơn về hiện tượng khảm được phát hiện bằng sàng lọc NGS và aCGH của cùng một sản phẩm WGA cho thấy NGS có khả năng phát hiện chính xác hơn về khảm của tế bào TE từ sinh thiết phôi nang [113].

Năm 2016, Aleksandrova và cộng sự đã sử dụng 2 kỹ thuật aCGH và NGS để sàng lọc rối loạn di truyền cho 38 phôi nang. Kết quả cho thấy có 36 mẫu kết quả aCGH giống kết quả NGS (phù hợp 94,8%), có 2 mẫu (5,2%) kết luận khác nhau (aCGH kết luận bất thường (karyotype 47, XXY) trong khi đó NGS kết luận bình thường). Theo tác giả, sự khác nhau này được giải

thích là khi thực hiện kỹ thuật aCGH cho 2 mẫu này có tín hiệu huỳnh quang bị nhiễu nên kết quả sai lệch. Do đó, sự khác biệt trong kết quả đã cho thấy kỹ thuật NGS có độ phân giải cao hơn [157].

Chow và cộng sự (2018) phân tích hồi cứu của 287 mẫu phôi bào ngày 3 (blastomere) và 55 mẫu phôi bào ngày 5 (trophectoderm/TE) cũng cho thấy tỷ lệ phù hợp trong chẩn đoán tổng thể giữa aCGH và NGS trên các mẫu bất thường là 100% (266/266), không phân biệt loại sinh thiết [24].

Đặc biệt, năm 2016, Maxwell và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu bệnh chứng về 38 bệnh nhân sảy thai tự nhiên sau khi chuyển phôi được kết luận bình thường sau sàng lọc di truyền bằng kỹ thuật aCGH với phân tích lại hồi cứu các mẫu sinh thiết TE bằng kỹ thuật NGS từ tháng 1 năm 2013 đến tháng 5 năm 2015 tại Trung tâm Sinh sản Đại học New York. 38 mẫu DNA khuếch đại đã lưu từ sinh thiết phôi nang trước đây được chẩn đoán là bình thường bởi aCGH đã được phân tích lại bằng NGS. Khác với các kết quả nghiên cứu cho thấy rằng tất cả các phôi lệch bội và đa bội được phát hiện bằng kỹ thuật NGS là phù hợp 100% với kết quả của kỹ thuật aCGH, kết quả nghiên cứu này cho thấy trong 38 phôi được aCGH kết luận bình thường này có tới 31,6% (12/38) thể khảm, 5,2% phôi đa bội (2/38) được NGS phát hiện. Các bất thường về nhiễm sắc thể không được phát hiện có thể góp phần gây sảy thai sớm. Tác giả kết luận rằng sàng lọc di truyền trước làm tổ bằng kỹ thuật NGS có thể xác định nhiều trường hợp thể khảm và thể đa bội hơn aCGH [158].

Như vậy, kỹ thuật NGS có độ chính xác tương tự aCGH trong sàng lọc rối loạn 24 NST của phôi. Với lợi thế thông lượng cao, độ đọc dài, độ chính xác cao nên NGS phát hiện thể khảm tốt hơn, thời gian trả kết quả nhanh và giá thành thấp hơn aCGH.

4.3. Đánh giá kết quả sàng lọc phôi trước làm tổ bằng kỹ thuật NGS

4.3.1. Đặc điểm rối loạn của phôi

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tuổi trung bình của bệnh nhân tham gia nghiên cứu là $35,08 \pm 5,17$, bệnh nhân nhiều tuổi nhất là 44 tuổi, bệnh nhân trẻ nhất 24 tuổi (bảng 3.14).

Chúng tôi lựa chọn bệnh nhân trẻ tuổi vào nghiên cứu này vì bệnh nhân 24 tuổi nhưng đã có tiền sử thai lưu 2 lần; nguyên nhân thai lưu nghĩ đến nhiều nhất là do rối loạn di truyền của phôi vì người chồng có karyotyp đảo đoạn quanh tâm NST số 3 (46,XY,inv(3)(p24q29)). Quả đúng vậy, kết quả xét nghiệm phôi của bệnh nhân 24 tuổi có mất đoạn nhỏ kích thước 12,89 Mb nhánh ngắn NST số 3 (46,XX,rec(3)del(3p)inv(3)(p24q29)) do tái sắp xếp lại không cân bằng; hậu quả do bố bị đảo đoạn NST 3 (biểu đồ 3.18). Như vậy, nguyên nhân chính gây thai lưu của bệnh nhân trẻ tuổi này là rối loạn di truyền của phôi.

Cả 13 trường hợp đều đã thất bại trong các chu kỳ IVF trước đó, trong đó có 61,5% là vô sinh II. Nguyên nhân vô sinh do vợ là cao nhất chiếm 46,1% (bảng 3.15), tương tự kết quả nghiên cứu của Ashok (2015) [30].

Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy vô sinh có thể gặp ở người phụ nữ còn trẻ tuổi và nguyên nhân vô sinh do vợ nhiều hơn do chồng.

4.3.2. Tính ứng dụng của kỹ thuật NGS

❖ Phát hiện rối loạn số lượng 24 NST của phôi nang

Tất cả 52 sản phẩm WGA đủ điều kiện thực hiện các bước tiếp theo là chuẩn bị thư viện và giải trình tự gen bằng kỹ thuật NGS. Chúng tôi đã có đầy đủ 52 kết quả của 52 phôi, phát hiện có 31 mẫu phôi không phát hiện rối

loạn NST (chiếm 59,6%) và 21 mẫu phôi phát hiện rối loạn NST. Như vậy, tỷ lệ rối loạn NST trong mẫu nghiên cứu là 40,4% (biểu đồ 3.16).

Chúng tôi nhận thấy tỷ lệ rối loạn trong nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với kết luận về tỷ lệ phần trăm rối loạn NST ở phôi nang trong nghiên cứu của Rubio năm 2003. Nhóm nghiên cứu của Rubio 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 NST.

Fragouli và cộng sự (2010) cũng sử dụng phương pháp CGH ở nhóm bệnh nhân tuổi trung bình 39,8 thấy tỷ lệ lệch bội NST ở phôi nang là 45,2% [129].

Tỷ lệ phôi bất thường trong nghiên cứu chúng tôi cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Việt Tiên và cộng sự (2014), sử dụng kỹ thuật FISH phân tích cho 37 phôi ngày 3, cho thấy tỷ lệ lệch bội NST là 45,9% [126].

Minasi và cộng sự (2017) đã tiến hành sàng lọc di truyền cho 1122 phôi nang bằng kỹ thuật aCGH thấy phôi bình thường chiếm 50,6%, tỷ lệ bất thường 49,4%. Tỷ lệ phôi bất thường trong nghiên cứu của Minasi cao hơn trong nghiên cứu của chúng tôi, điều này có thể do tác giả đồng thời sàng lọc lệch bội NST (PGTA) và bệnh di truyền (PGTM) cho phôi, và do tuổi mẹ trung bình là $35,4 \pm 4,2$ tuổi, cao hơn trong nghiên cứu của chúng tôi [159].

Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy các phôi được tạo ra trong ống nghiệm có mang rối loạn NST rất cao, trên 50% [160],[161],[162],[163],[164]. 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 NST [164]. Tuy nhiên, đối tượng trong các nghiên cứu này đều tập trung vào các trường hợp sảy thai liên tiếp [162]

hoặc có tuổi người mẹ cao ($>37,5$ tuổi) [160],[161]; trong khi đối tượng trong nghiên cứu của chúng tôi có độ tuổi thấp hơn (trung bình 35,08 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.

Theo Schoolcraft và cộng sự (2010), sử dụng phương pháp CGH trên 269 phôi nang của 45 bệnh nhân có tuổi trung bình là 37 tuổi thấy tỷ lệ lệch bội NST là 51,3% [128]. Tỷ lệ này cao hơn tỷ lệ lệch bội NST trong nghiên cứu của chúng tôi có thể là do độ tuổi trung bình trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn.

Năm 1991, Zenzes và Casper sinh thiết thể cực của phôi và xét nghiệm bằng kỹ thuật FISH, kết luận rằng tỷ lệ rối loạn NST dao động từ 23%-40% [165], tỷ lệ này thấp hơn tỷ lệ phôi bất thường trong nghiên cứu của chúng tôi, Điều này được lý giải rằng: Trong nghiên cứu của chúng tôi sử dụng kỹ thuật NGS để sàng lọc phôi nang, đây là kỹ thuật hiện đại với độ chính xác cao, có thể phát hiện nhiều hơn các bất thường so với các kỹ thuật FISH, nên tỷ lệ bất thường phát hiện được cũng cao hơn.

Các rối loạn NST 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. Trong đó hay gặp nhất là rối loạn ở 1 cặp NST, chiếm 47,6%, lệch bội 2 NST 23,8%, lệch bội ≥ 3 NST chỉ chiếm 4,8% (bảng 3.16).

Kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi khá tương đồng với kết quả trong nghiên cứu của Traversa và cộng sự năm 2011, khi đánh giá mức độ lệch bội NST thì họ thấy lệch bội ở 1 NST là cao nhất (55%) sau đó là lệch bội 2 NST (41%), lệch bội ở 3 NST trở lên chỉ chiếm 7% [104].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy bất thường lệch bội NST xảy ra ở 23 NST với tỷ lệ khác nhau (bảng 3.15). Gặp nhiều nhất là ở NST

số 21 (23,8%), sau đó là NST 16 và 22 (19%), ít gặp nhất ở NST 9, 11, 17, 19, (4,8%), và không gặp rối loạn NST Y.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với một số các nghiên cứu trước đây. Theo Hoàng Thị Hương và cộng sự (2014), Sử dụng kỹ thuật FISH phân tích cho 37 phôi ngày 3, cho thấy rối loạn NST 21 là hay gặp nhất, thấp nhất ở NST giới tính [127].

Theo nghiên cứu của Munne và cộng sự (2011), sau khi đánh giá 24 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 15 [160].

Một nghiên cứu khác cùng năm 2011 của Fragouli và Wells trên 1.290 phôi ngày 5 bằng kỹ thuật aCGH trên các đối tượng có độ tuổi 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 X [163].

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 NST 13, 21, 18, XY, 15, 17 cho nhóm bệnh nhân bị phôi không làm tổ liên tiếp và 21, 15, 13, 18, 17 và X, Y ở nhóm bệnh nhân lớn tuổi [162]. Trong khi đó Traversa và cộng sự (2011), nghiên cứu trên phôi nang thấy số phôi bị lệch bội NST thấp hơn ở phôi ngày 3 (43%) [104]. Như vậy, sự khác biệt về tỉ lệ cũng như mức độ lệch bội NST giữa phôi ngày 3 và ngày 5 có thể là do phôi lệch bội NST phức tạp thường bị ngừng phát triển trước khi phát triển thành phôi nang. 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.

Brezina và cộng sự (2012) phân tích 1.903 phôi cho kết quả: Lệch bội tương đối đồng đều ở tất cả 24 NST. Trong nghiên cứu của chúng tôi phát hiện lệch bội ở 23 NST, chưa phát hiện thấy rối loạn NST Y, có thể do cỡ mẫu nghiên cứu của chúng tôi nhỏ hơn của Brezina [166].

Như vậy, kết quả cho thấy kỹ thuật NGS cho phép phát hiện rối loạn số lượng 24 NST của phôi nang IVF với độ tin cậy cao.

❖ Phát hiện rối loạn cấu trúc NST của phôi nang IVF

Trong 21 mẫu phôi mang rối loạn NST, có 17 mẫu có bất thường về số lượng (chiếm 81%), 2 mẫu có bất thường về cấu trúc NST, 2 mẫu vừa có bất thường về cấu trúc vừa có bất thường về số lượng NST (biểu đồ 3.17).

Đặc biệt, kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện các bất thường liên quan tới rối loạn cấu trúc NST với kích thước nhỏ ~14 Mb (biểu đồ 3.18). Chứng minh rằng sàng lọc 24 NST bằng NGS có độ phân giải cao và cho phép phát hiện chính xác sự mất cân bằng phân đoạn có kích thước nhỏ.

Tiềm năng xác định các rối loạn cấu trúc nhỏ của NGS cũng đã được Fiorentino và cộng sự (2014) báo cáo trong các nghiên cứu trước đó trên các tế bào đơn và tế bào phôi ở giai đoạn phôi nang [22].

Nghiên cứu của Chow và cộng sự (2018) khẳng định rằng NGS đã phát hiện một chuyển đoạn NST trên một mẫu phôi bào ngày 3 mà trước đây đã được aCGH kết luận là bình thường. Nghiên cứu này đã chứng minh rằng NGS có thể phát hiện các chuyển đoạn/ đảo đoạn không cân bằng một cách hiệu quả [24].

Năm 2018, Cuman và cộng sự cũng chỉ ra rằng NGS có thể phát hiện các chuyển đoạn/ đảo đoạn nhiễm sắc thể không cân bằng nhỏ kích thước ≥ 10 Mb, nhỏ hơn khuyến cáo của nhà sản xuất (≥ 20 Mb) [167].

Do đó, NGS không chỉ ứng dụng để sàng lọc lệch bội 24 NST (PGT-A) mà còn là một kỹ thuật có thể sử dụng phát hiện rối loạn cấu trúc NST (PGT-SR) [24].

❖ Phát hiện thể khảm của phôi nang IVF

Hiện tượng khảm đặc trưng bởi sự hiện diện của hỗn hợp của nhóm tế bào lưỡng bội và tế bào lặn bội. Hiện tượng khảm nhiễm sắc thể thường được quan sát thấy ở phôi ở giai đoạn phân cắt sớm, tỷ lệ thể khảm giảm dần ở giai đoạn phôi nang [168]. Một số phôi IVF thể khảm có thể phát triển thành thai, tỷ lệ tùy thuộc vào mức độ khảm [169]. Thể khảm nhiễm sắc thể trong thai kỳ có thể gây ra các bất thường bẩm sinh, cũng như các vấn đề như tự kỷ và chậm phát triển trí tuệ ở trẻ. Mọi nhiễm sắc thể đều có thể liên kết với một kiểu hình bất thường khi ở dạng khảm, tùy theo mức độ khảm mà thai nhi bình thường hoặc bị ảnh hưởng nghiêm trọng/ gây chết. Nếu tỷ lệ tế bào bình thường đủ cao, những tế bào đó sẽ sớm chiếm ưu thế và khả năng sống của phôi có thể được bảo toàn [170]. Do đó, khi sinh thiết phôi nang để sàng lọc rối loạn 24 NST cho phôi, việc phát hiện, phân tích và giải thích kết quả thể khảm cũng là một vấn đề đang được quan tâm.

Trong nghiên cứu của chúng tôi phát hiện được 23,8% phôi thể khảm (bảng 3.16). Theo các nghiên cứu khác, tỷ lệ phôi thể khảm thay đổi từ 15% [10] lên đến trên 90% [131]. 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. Một nguyên nhân khác là nhiều nghiên cứu về phôi thể khảm được tiến hành trên những phôi thừa, không được sử dụng để chuyển phôi hoặc dự trữ đông lạnh, những phôi này thường có chất lượng kém hơn nên tỷ lệ phôi thể khảm thường rất cao.

Kỹ thuật NGS phân tích rối loạn NST phát hiện ra mức tăng, giảm của số các NST hoặc không điển hình nằm giữa mức bất thường và bình thường (nằm dưới tín hiệu đọc tự động của phần mềm BFM), được khuyến cáo là thể khảm. Kỹ thuật NGS có thể xác định các phôi khảm tỷ lệ <10%.

Năm 2016, Ruttanajit và cộng sự chứng minh rằng kỹ thuật NGS có thể được phát hiện một cách đáng tin cậy và chính xác thể khảm. Tác giả so sánh sự phát hiện thể khảm của 2 kỹ thuật NGS với aCGH, kết quả cho thấy kỹ thuật NGS phát hiện thể khảm tỷ lệ thấp tốt hơn aCGH [171].

Năm 2016, Maxwell và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu bệnh chứng về 38 bệnh nhân sảy thai tự nhiên sau khi chuyển phôi được kết luận bình thường sau sàng lọc di truyền bằng kỹ thuật aCGH với phân tích lại hồi cứu các mẫu sinh thiết TE bằng kỹ thuật NGS. Kết quả nghiên cứu này cho thấy trong 38 phôi được aCGH kết luận bình thường này có tới 31,6% (12/38) thể khảm được phát hiện bằng kỹ thuật NGS phát hiện. Các bất thường về nhiễm sắc thể không được phát hiện có thể góp phần gây sảy thai sớm. Tác giả kết luận rằng sàng lọc di truyền trước làm tổ bằng kỹ thuật NGS có thể xác định nhiều trường hợp thể khảm hơn aCGH [155].

Có nhiều bằng chứng cho thấy, việc lựa chọn phôi thể khảm để chuyển vào buồng tử cung có thể tạo thai sống nhưng phôi thể khảm thường có tỷ lệ thai làm tổ thấp hơn, tỷ lệ sảy thai cao hơn những trường hợp chuyển phôi bình thường (euploid). Theo nghiên cứu của Fragouli và cộng sự (2017) các phôi thể khảm phát hiện bằng kỹ thuật NGS có tỷ lệ làm tổ (30.1%) thấp hơn phôi bình thường (55.8%) ($P = 0.038$); tỷ lệ sảy thai cao hơn (55.6 so với 17.2% ($P = 0.036$)); Tỷ lệ mang thai (ongoing pregnancy) chỉ là 15.4%, thấp hơn rất nhiều tỷ lệ mang thai ở nhóm phôi bình thường (46.2%) ($P = 0.003$).

Theo tác giả, những phôi thể khảm không nhất thiết phải bị loại bỏ, nhưng được ưu tiên chuyển phôi thấp hơn so với những phôi bình thường [172].

Nghiên cứu gần đây nhất của Zhang và cộng sự (2020) cũng cho kết quả về khả năng phát triển bình thường của một số phôi thể khảm được phát hiện bằng kỹ thuật NGS. Đây là một nghiên cứu thuần tập hồi cứu tại 3 trung tâm IVF ở Châu Á (Hồng Kông, Malaysia và Thái Lan) so sánh kết quả lâm sàng sau chuyển phôi của 137 phôi thể khảm, 476 phôi bình thường (euploid) và 835 không sàng lọc di truyền trước làm tổ. Kết quả cho thấy tỷ lệ mang thai lâm sàng của phôi thể khảm thấp nhất so với chuyển phôi bình thường và phôi không sàng lọc, tương ứng (40,1% ; 59,0%; 48,4%), tỷ lệ sinh sống thấp hơn (27,1% so với 47,0% so với 35,1%) và tỷ lệ sảy thai cao hơn (33,3% so với 20,5% so với 27,4%) ($p= 0,04$). Trong số 37 ca sinh sống từ phôi thể khảm có 8 ca đã được thực hiện xét nghiệm di truyền trước sinh với kết quả bình thường. Nhìn chung, kết quả mang thai từ phôi thể khảm thấp hơn về mặt thống kê so với chuyển phôi sàng lọc di truyền bình thường, nhưng nghiên cứu đã chứng minh khả năng tồn tại của phôi khảm [173].

Như vậy kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới NGS đã khắc phục được nhược điểm của kỹ thuật ra đời trước; NGS cho phép phát hiện phôi thể khảm với tỷ lệ thấp. Đây là một trong những thông tin quý báu cho các nhà di truyền và bác sĩ lâm sàng để xác định được thứ tự ưu tiên trong quá trình lựa chọn phôi, để chuyển những phôi tốt nhất [174],[175].

❖ Phát hiện thể tam bội

Tỷ lệ thể tam bội trong các trường hợp mang thai tự nhiên từ 1-3% [175],[176] và có tới 15% tổng số các ca sảy thai bất thường về mặt di truyền tế bào là thể đa bội [177],[178]. Thai tam bội có khả năng sống kém, chúng có

hiều bất thường bẩm sinh và thường không tồn tại sau giai đoạn sơ sinh [176].

Cho đến nay, một số kỹ thuật đã được ứng dụng để phân tích số lượng bản sao nhiễm sắc thể từ sinh thiết TE. Tuy nhiên, đa bội vẫn là một thách thức đối với phần lớn các kỹ thuật vì ước tính số lượng bản sao nhiễm sắc thể được dựa trên số lượng tương đối của DNA có trong mẫu sinh thiết. Những phương pháp này rất hữu ích khi phát hiện sự lệch bội NST, nhưng không xác định được NST đa bội. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật NGS, cho phép phát hiện được 1 thể tam bội (69,XXY) chiếm 1,9% (1/52) (biểu đồ 3.20). Điều này hết sức có ý nghĩa vì giúp tránh được chuyển phôi tam bội, tránh được tình trạng sảy thai, thai lưu, giúp cải thiện kết quả lâm sàng cho bệnh nhân IVF.

❖ Phát hiện rối loạn nhiễm sắc thể giới tính

Nghiên cứu của chúng tôi còn phát hiện các rối loạn ở một số NST có kích thước lớn dạng như NST giới tính X như hội chứng Turner (45,X) chiếm 1,9% (1/52) (biểu đồ 3.19). Hội chứng Turner xảy ra ở khoảng 1 trong số 2.500 bé gái sơ sinh trên toàn thế giới, có tới 99% những trường hợp mang thai 45,X là sảy thai tự nhiên, số còn lại có thể kèm theo dị tật bẩm sinh, ảnh hưởng đến chất lượng cuộc sống của trẻ. Điều này càng khẳng định việc sàng lọc di truyền trước trước làm tổ có ý nghĩa to lớn, giúp chọn lựa được phôi có bộ NST bình thường để chuyển, sẽ tránh được tình trạng mang thai rối loạn NST rồi gây sảy thai, thai lưu.

Như vậy, chúng tôi kết luận rằng cách lựa chọn đối tượng nghiên cứu là phôi nang và kỹ thuật xét nghiệm là NGS để sử dụng trong nghiên cứu này cho phép kết luận về chất lượng di truyền của phôi IVF với mức độ tin cậy cao.

4.3.2. Môi liên quan giữa tuổi mẹ và tình trạng phôi

Trong nghiên cứu này, nhóm bệnh nhân <35 tuổi có tỷ lệ phôi bình thường là (71,4%), nhóm ≥ 35 tuổi có tỷ lệ phôi bình thường thấp hơn (chiếm 51,6%). Ngược lại, nhóm <35 tuổi có tỷ lệ phôi bất thường (28,6%) thấp hơn nhóm ≥ 35 tuổi (48,4%) ($p > 0,05$) (bảng 3.19). Tỷ lệ lệch bội, lệch bội và khảm, thể khảm ở nhóm ≥ 35 tuổi lần lượt là 68,8%; 100%; 75% đều cao hơn ở nhóm <35 tuổi, tương ứng là 31,2%; 0% và 25% ($p > 0,05$) (bảng 3.20). Nhóm bệnh nhân ≥ 35 tuổi có tỷ lệ rối loạn ở 1 NST, 2NST, thể khảm lần lượt là 60,0%; 100%; 80% cao hơn rất nhiều so với nhóm <35 tuổi, tương ứng là 40%; 0,0% và 20%. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của chúng tôi lại thấy tỷ lệ rối loạn ≥ 3 NST chỉ gặp ở nhóm <35, nhóm ≥ 35 tuổi không gặp ca nào rối loạn ≥ 3 NST. Tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ (bảng 3.21). Tỷ lệ rối loạn NST số 13 gặp nhiều ở nhóm bệnh nhân <35 tuổi (66,7%). Rối loạn NST 18 thì ngược lại, gặp nhiều ở nhóm ≥ 35 tuổi (66,7%). Đặc biệt là rối loạn NST 21 ở nhóm ≥ 35 tuổi cao gấp 4 lần nhóm <35 tuổi (bảng 3.22).

Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Alfarawati năm 2011, cho thấy các bất thường trên liên quan chặt chẽ đến tuổi của người mẹ. Theo tác giả, sự chênh lệch có khác về cấp số nhân so với nghiên cứu của chúng tôi: tỷ lệ lệch bội NST 21 ở nhóm ≥ 37 tuổi cao gấp 10 lần ở nhóm dưới <37 tuổi, tỷ lệ lệch bội NST 18 ở nhóm ≥ 37 tuổi cao gấp 6 lần ở nhóm dưới <37 tuổi. Điều này có thể được giải thích là do ngưỡng tuổi để so sánh của bệnh nhân (37 tuổi) lấy cao hơn ngưỡng tuổi trong nghiên cứu của chúng tôi (35 tuổi) [105].

Để đánh giá mối liên quan giữa tuổi mẹ với tỷ lệ phôi bình thường và tỷ lệ phôi bất thường, chúng tôi chia tuổi mẹ thành 3 nhóm tuổi: <35; 35-38;

≥ 39 . Kết quả là tỷ lệ phôi bình thường giảm dần khi tuổi mẹ tăng lên. Nhóm tuổi < 35 có tỷ lệ phôi bình thường là cao nhất 71,4%, nhóm 35-38 tuổi là 58,8% và nhóm ≥ 39 có tỷ lệ phôi bình thường thấp nhất là 42,8% ($p > 0,05$) (biểu đồ 3.21). Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu của một số tác giả khác.

Theo nghiên cứu của Zachary và cộng sự (2016). Phụ nữ từ 24-35 tuổi có tỷ lệ phôi bình thường cao nhất $\sim 35\%$ khi sinh thiết phôi ngày 3, và $\sim 55\%$ trong sinh thiết ngày 5 ở phụ nữ 27-35 tuổi, và sau đó nhanh chóng giảm xuống 0% ở tuổi 44 [177].

Trong một nghiên cứu của Munné và cộng sự (2007) cũng cho thấy tỷ lệ phôi bình thường giảm dần khi tuổi người mẹ tăng dần, cụ thể ở nhóm tuổi < 35 tuổi là 40%, tỷ lệ này giảm xuống 20% ở nhóm tuổi > 41 tuổi [178].

Đặc biệt, theo kết quả của chúng tôi, tuổi mẹ càng tăng số phôi bất thường càng tăng. Nhóm 35-38 tuổi có tỷ lệ phôi bất thường cao hơn nhóm < 35 tuổi. Đặc biệt nhóm ≥ 39 tuổi có tỷ lệ phôi bất thường cao nhất 57,2%. ($p > 0,05$) (biểu đồ 3.21). Tỷ lệ này tương đồng với kết quả của các nghiên cứu trước đó của Rubio và cộng sự (2013), tỷ lệ bất thường ở nhóm đối tượng không có tiền sử sẩy thai liên tiếp và độ tuổi < 37 là 33,3%; trong khi ở nhóm đối tượng ≥ 37 là 57,7% [179]. Kết luận của Fraouli cũng cho rằng tỷ lệ lệch bội NST vượt trên 50% đối với hầu hết phụ nữ trên 40 tuổi [180].

Khi chúng tôi so sánh kết quả của mình với nghiên cứu của Alfarawati và cộng sự (2011), tỷ lệ rối loạn NST cũng tăng dần khi tuổi người mẹ cao; cụ thể ở nhóm tuổi 38-47 (trung bình 41 tuổi) là 60,7% cao hơn tỷ lệ ở nhóm tuổi từ 31-37 tuổi (trung bình 34,6 tuổi) 9,7% [105]. Cả 2 nhóm tuổi này đều cao hơn 2 nhóm tuổi ở nghiên cứu của chúng tôi nên tỷ lệ rối loạn NST phát hiện được cũng cao hơn.

Năm 2002, Munné đưa ra bằng chứng chứng minh mối quan hệ giữa tuổi người mẹ và sự rối loạn NST ở phôi IVF. 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% [181]. Tuy nhiên, tác giả sử dụng kỹ thuật 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 do vậy không thể loại trừ các trường hợp âm tính giả do không xác định được các bất thường trên NST khác.

Theo Phan Thị Khánh Vy (2015), tỷ lệ lệch bội NST cũng tăng theo tuổi: tỷ lệ này tăng mạnh khi tuổi mẹ tăng trên 40 tuổi ở cả phôi phát triển bình thường cũng như phôi phát triển nhanh.

Bên cạnh đó đi sâu vào việc đánh giá mức độ tương quan giữa yếu tố và tỷ lệ phần trăm bình thường, bất thường NST và tuổi người mẹ chúng tôi tiến hành thống kê và xây dựng hệ số tương quan r sử dụng phần mềm thống kê STATA 12.0. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng thấy mối tương quan giữa tuổi mẹ với tỷ lệ phôi bình thường và tỷ lệ phôi bất thường khi chia tuổi mẹ thành 3 nhóm tuổi: <35; 35-38; ≥39. Tỷ lệ phần trăm phôi bình thường (y) tương quan ngược chiều rất chặt chẽ với tuổi mẹ (x) theo phương trình tương quan $y = -0,14x + 0,86$, hệ số tương quan $r = 0,997$, ($p > 0,05$). Tỷ lệ phần trăm phôi bất thường (y) tương quan cùng chiều rất chặt chẽ với tuổi mẹ (x) theo phương trình tương quan $y = 0,14x + 0,14$, hệ số tương quan $r = 0,998$ với $p > 0,05$ (biểu đồ 3.22).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu của Zachary và cộng sự (2016): phụ nữ 24-35 tuổi có tỷ lệ phôi bình thường cao nhất; >35 tuổi, tỷ lệ phôi bình thường giảm khi tuổi mẹ tăng với tương quan tuyến tính rất chặt chẽ ($r = 0,99$) và chỉ ra rằng phương trình $y = - 4.855x +$

230 ($p < 0,001$) có thể được sử dụng để tính toán chính xác (nội suy) tỷ lệ phôi bình thường trung bình ở phụ nữ từ 35-45 tuổi[177].

Những dữ liệu này sẽ giúp các chuyên gia hỗ trợ sinh sản đưa ra dự đoán thành công theo độ tuổi cụ thể hơn cho phụ nữ trải qua IVF có hoặc không có sàng lọc di truyền trước làm tổ.

Nhiều nghiên cứu khác cũng chứng minh được mối liên quan chặt chẽ giữa tuổi mẹ và tỷ lệ phôi bất thường ($p < 0,05$), đó là nghiên cứu của Ata và cộng sự (2012); Fragouli và cộng sự (2011); Hellani và cộng sự (2008); Márquez và cộng sự (2000); Munné và cộng sự (1995); Schoolcraft và cộng sự (2010); Verpoest và cộng sự (2009). Có lẽ do cỡ mẫu nghiên cứu của chúng tôi chưa đủ lớn nên $p > 0,05$.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã giúp một lần nữa khẳng định bất thường NST của phôi là nguyên nhân hàng đầu gây làm tỷ lệ thụ thai của IVF thấp hoặc thai IVF bị sảy thai, thai lưu nhiều giống như nghiên cứu của Macklon (2002) và Lathi (2008).

Hơn thế, Fragouli (2008) và Alfarawati (2011) thực hiện nghiên cứu đánh giá mối tương quan giữa hình thái phôi và tình trạng NST đã chứng minh rằng phôi có hình thái bình thường không tương quan với phôi có bộ NST bình thường.

Do đó, vừa ứng dụng các kỹ thuật IVF tiên tiến, vừa kết hợp lựa chọn phôi dựa cả vào hình thái phôi và tình trạng di truyền bằng NGS sẽ chọn lựa được phôi tốt nhất để chuyển vào buồng tử cung là thiết thực nhằm giúp giảm tỷ lệ sảy thai thai lưu và tăng cơ hội sinh ra các em bé khỏe mạnh từ IVF.

Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy rằng ứng dụng NGS để sàng lọc phôi nang IVF không những giúp phát hiện lệch bội NST, mà còn

giúp phát hiện được rối loạn cấu trúc và thể khảm. Đặc biệt NGS còn có nhiều lợi thế hơn các kỹ thuật ra đời trước đó: thông lượng cao, độ đọc dài, độ chính xác cao, cần lượng DNA thư viện ít, thời gian trả kết quả nhanh, chi phí thấp hơn aCGH. Điều này càng khẳng định tiềm năng ứng dụng rộng rãi của NGS trong sàng lọc di truyền trước làm tổ.

KẾT LUẬN

1. Về hoàn thiện quy trình sàng lọc rối loạn 24 NST bằng kỹ thuật NGS

Đã hoàn thiện quy trình kỹ thuật NGS phục vụ sàng lọc trước làm tổ.

- Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy cả 24 mẫu tế bào phôi đều xuất hiện băng sản phẩm, mẫu dung dịch rửa đảm bảo không nhiễm, cả 24 mẫu dung dịch đều không xuất hiện băng sản phẩm. Nồng độ DNA của 24 mẫu sau nhân toàn bộ hệ gen đều đạt >25 ng/ μ L, các mẫu dung dịch rửa đều <10 ng/ μ L. Điều này cho thấy việc sinh thiết và rửa tế bào đã thành công, việc WGA thành công, đảm bảo không nhiễm DNA ngoại lai đồng thời có nồng độ DNA đảm bảo cho thư viện phục vụ cho bước giải trình tự gen tiếp theo.
- Đã chuẩn hóa thành công quy trình giải trình tự gen theo bộ kit MiSeq Reagent Kit - PGS (tối đa 96 mẫu). Kết quả chuẩn hóa quy trình đều đạt các tiêu chí đảm bảo đúng yêu cầu kỹ thuật, giúp các mẫu thực hiện phân tích có đầy đủ dữ liệu để kết luận kết quả.
- Đã tối ưu hóa thành công quy trình giải trình tự gen, xây dựng thành công quy trình chạy trên số lượng mẫu nhỏ bằng các bộ kit khác nhau với số lượng mẫu linh hoạt như 4 mẫu/lần chạy (MiSeq Reagent kit v2 Nano), 8 mẫu/lần chạy (MiSeq Reagent kit v2 Micro), 16 mẫu/lần chạy (MiSeq Reagent kit v2 Standard) và 24 mẫu/lần (MiSeq Reagent kit V3) giúp tiết kiệm thời gian và chi phí nhưng vẫn đảm bảo tính chính xác của kỹ thuật.

2. Về độ chính xác của kỹ thuật NGS so với kỹ thuật aCGH trong sàng lọc rối loạn 24 NST trên tế bào phôi IVF

Độ nhạy, độ đặc hiệu, tỷ lệ đồng thuận của 2 kỹ thuật NGS và aCGH là 100%. Như vậy kỹ thuật NGS có độ chính xác tương tự aCGH trong sàng lọc rối loạn 24 NST của phôi trước làm tổ.

3. Về kết quả bước đầu sàng lọc phôi trước làm tổ bằng kỹ thuật NGS

- Tỷ lệ rối loạn NST ở phôi nang IVF trong nghiên cứu là 40,4%.
- Phát hiện rối loạn NST xảy ra ở 23 NST, không gặp rối loạn NST Y.
- Phát hiện được cả rối loạn cấu trúc NST, thể khảm, thể đa bội.
- Phát hiện được những rối loạn NST làm giảm sức sống nghiêm trọng của phôi như: Hội chứng Turner, Thể đa bội, rối loạn >2 NST.
- Tỷ lệ rối loạn NST là khác nhau ở các độ tuổi phụ nữ khác nhau. Sau 35 tuổi, tỷ lệ phôi bình thường giảm, tỷ lệ phôi bất thường NST tăng nhanh ($p > 0,05$).

Kỹ thuật NGS, cho phép phân tích tất cả 24 NST để đánh giá một cách toàn diện bộ NST cho phôi. Lựa chọn phôi nang vừa ít gây tổn thương phôi, vừa giúp làm giảm nguy cơ phân loại sai do phôi thể khảm. Nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy rằng ứng dụng NGS để sàng lọc phôi nang IVF không những giúp phát hiện lệch bội NST, mà còn giúp phát hiện được rối loạn cấu trúc và thể khảm với độ tin cậy cao. Đặc biệt NGS còn có nhiều lợi thế hơn các kỹ thuật ra đời trước đó: thông lượng cao hơn, độ đọc dài hơn, độ chính xác cao hơn, cần lượng DNA thư viện ít hơn, thời gian trả kết quả nhanh hơn, chi phí thấp hơn. Điều này càng khẳng định tiềm năng ứng dụng rộng rãi của NGS trong sàng lọc di truyền trước làm tổ.

KIẾN NGHỊ

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 với cỡ mẫu lớn hơn, đồng thời tìm 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, từ đó đánh giá hiệu quả lâm sàng của IVF có kết hợp sàng lọc di truyền của phôi bằng kỹ thuật NGS.

NHỮNG ĐÓNG GÓP CỦA NGHIÊN CỨU

1. Hoàn thiện được quy trình sàng lọc rối loạn 24 NST của phôi IVF bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS). Trong đó, đã tối ưu hóa quy trình chạy giải trình tự trên bộ chạy máy công suất nhỏ hơn, có thể chạy trên số mẫu ít hơn; giúp công suất chạy máy có thể thay đổi linh hoạt từ 4 mẫu đến 24 mẫu/lần giải trình tự; giúp rút ngắn thời gian trả kết quả, giảm giá thành của dịch vụ. Điều này rất có ý nghĩa và phù hợp với điều kiện thực tế ở Việt Nam.
2. Kết quả sàng lọc lệch bội của NGS phù hợp với kết quả aCGH. Tuy nhiên, kỹ thuật NGS có những ưu thế hơn như: công suất cao hơn, độ chính xác cao hơn, cần lượng DNA thư viện ít hơn, thời gian trả kết quả nhanh hơn, chi phí thấp hơn, có thể kết hợp phân tích đột biến gen. Điều này khẳng định tiềm năng ứng dụng của NGS trong lĩnh vực phân tích rối loạn di truyền trước làm tổ.
3. Xác định được tỷ lệ bất thường NST của phôi IVF là rất cao, tỷ lệ bất thường số lượng NST tăng nhanh theo tuổi, đặc biệt khi tuổi mẹ ≥ 35 ; xác định được những rối loạn NST gây chết phôi giai đoạn làm tổ, hoặc gây sảy thai, thai lưu trong thai kỳ I. Kết quả này định hướng việc vừa ứng dụng các kỹ thuật IVF tiên tiến nhất vừa kết hợp lựa chọn phôi dựa cả vào hình thái phôi và di truyền thông qua kỹ thuật NGS sẽ chọn lựa được phôi tốt nhất, chuyển vào buồng tử cung, sinh con khỏe mạnh là thiết thực.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyễn Thị Sim, Lương Thị Lan Anh, Đặng Tiến Trường, Đàm Linh Phương, Hoàng Văn Lương, Nguyễn Duy Bắc (2018). Đánh giá độ chính xác của kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trong sàng lọc rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyên phôi. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 469, số đặc biệt tháng 8, tr 470-477.
2. Hoàng Văn Lương, Nguyễn Duy Bắc, Trần Ngọc Anh, Nguyễn Thanh Tùng, Nguyễn Văn Điều, Nguyễn Duy Ánh, Nguyễn Thị Sim, Đặng Tiến Trường, Đàm Linh Phương, (2017). Đánh giá kiểm soát nhiễm DNA trong sinh thiết phôi phục vụ chẩn đoán và sàng lọc tiền chuyên phôi. *Tạp chí Y Dược học Quân sự*, tập 42, số chuyên đề tháng 9, tr 219-226.
3. Nguyễn Thị Sim, Nguyễn Thị Bích Vân, Lương Thị Lan Anh, Đàm Linh Phương, Hoàng Văn Lương, Đặng Tiến Trường, Nguyễn Duy Bắc (2018). Một số đặc điểm rối loạn nhiễm sắc thể ở phôi thụ tinh ống nghiệm ngày năm. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 469, số đặc biệt tháng 8, tr 470-477.
4. 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 Macedonian journal of medical sciences*, 7(24), 4427 - 4431.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. J. Boivin, L. Bunting, J. A. Collins et al. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*, 22(6), 1506-12.
2. S.J. Dyer, N. Abrahams, N.E. Mokoena et al. (2004). You are a man because you have children: experiences, reproductive health knowledge and treatment-seeking behaviour among men suffering from couple infertility in South Africa. *Human Reproduction*, 19(4), 960-967.
3. S. J. Dyer, N. Abrahams, N. E. Mokoena et al. (2005). Psychological distress among women suffering from couple infertility in South Africa: a quantitative assessment. *Human Reproduction*, 20(7), 1938-43.
4. N. J. Wiersema, A. J. Drukker, B. T. Mai et al. (2006). Consequences of infertility in developing countries: results of a questionnaire and interview survey in the South of Vietnam. *Journal of Translational Medicine*, 4, 54.
5. C. Gnoth, B. Maxrath, T. Skonieczny et al. (2011). Final ART success rates: a 10 years survey. *Human Reproduction*, 26(8), 2239-2246.
6. R. T. Scott, Jr., K. Ferry, J. Su et al. (2012). Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective, blinded, nonselection study. *Fertility and Sterility*, 97(4), 870-5.
7. E. Vanneste, T. Voet, C. Le Caignec et al. (2009). Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nature Medicine*, 15(5), 577-83.
8. E. Fragouli, M. Lenzi, R. Ross et al. (2008). Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Human Reproduction*, 23(11), 2596-608.
9. D. S. Johnson, G. Gemelos, J. Baner et al. (2010). Preclinical validation of a microarray method for full molecular karyotyping of blastomeres in a 24-h protocol. *Human reproduction (Oxford, England)*, 25(4), 1066-1075.
10. J. C. Harper, E. Coonen, A. H. Handyside et al. (1995). Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal,

monospermic preimplantation human embryos. *Prenatal Diagnosis*, 15(1), 41-9.

11. J. D. Delhanty, D. Wells and J. C. Harper (1997). Genetic diagnosis before implantation. *British Medical Journal*, 315(7112), 828-9.
12. Santiago Munné, Cristina Magli, Muhterem Bahçe et al. (1998). Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenatal Diagnosis*, 18(13), 1459-1466.
13. D. Warburton, Kline, J., and Stein, Z . , (1986), "Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions", *Perinatal genetics: diagnosis and treatment*, Academic Press, New York, 133-148.
14. P. A. Jacobs (1992). The chromosome complement of human gametes. *Oxford reviews of reproductive biology*, 14, 47-72.
15. Stein Z Kline J, Susser M (1989), *Conception to birth: epidemiology of prenatal development*, Oxford University Press, New York.
16. P. W. Yoon, R. S. Olney, M. J. Khoury et al. (1997). Contribution of birth defects and genetic diseases to pediatric hospitalizations. A population-based study. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 151(11), 1096-103.
17. David A. Stevenson and John C. Carey (2004). Contribution of malformations and genetic disorders to mortality in a children's hospital. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 126A(4), 393-397.
18. J. Friedenthal, S. M. Maxwell, S. Munne et al. (2018). 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*, 109(4), 627-632.
19. Z. Yang, J. Liu, G. S. Collins et al. (2012). 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*, 5(1), 24.
20. S. Munne (2018). Status of preimplantation genetic testing and embryo selection. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(4), 393-396.
21. S. A. Neal, S. J. Morin, J. M. Franasiak et al. (2018). Preimplantation genetic testing for aneuploidy is cost-effective, shortens treatment time,

and reduces the risk of failed embryo transfer and clinical miscarriage. *Fertility and Sterility*, 110(5), 896-904.

22. F. Fiorentino, A. Biricik, S. Bono et al. (2014). Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertility and Sterility*, 101(5), 1375-82.
23. L. E. Northrop, N. R. Treff, B. Levy et al. (2010). SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Molecular Human Reproduction*, 16(8), 590-600.
24. J. F. C. Chow, W. S. B. Yeung, V. C. Y. Lee et al. (2018). Evaluation of preimplantation genetic testing for chromosomal structural rearrangement by a commonly used next generation sequencing workflow. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 224, 66-73.
25. C. Gutierrez-Mateo, P. Colls, J. Sanchez-Garcia et al. (2011). Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertility and Sterility*, 95(3), 953-8.
26. WHO (2010), "Laboratory manual for the examination and processing of human semen", trong 5th ed, chủ biên, Cambridge University Press.
27. Maya N. Mascarenhas, Seth R. Flaxman, Ties Boerma et al. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine*, 9(12), e1001356-e1001356.
28. Tracey Bushnik, Jocelynn L. Cook, A. Albert Yuzpe et al. (2013). Estimating the prevalence of infertility in Canada. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(4), 1151-1151.
29. Mohammad Mehdi Akhondi, Koorosh Kamali, Fahimeh Ranjbar et al. (2013). Prevalence of Primary Infertility in Iran in 2010. *Iranian journal of public health*, 42(12), 1398-1404.
30. Ashok Agarwal, Aditi Mulgund, Alaa Hamada et al. (2015), *A unique view on male infertility around the globe*, Vol. 13, 37.
31. A. Makler, Z. Blumenfeld, J. M. Brandes et al. (1979). Factors affecting sperm motility. II. Human sperm velocity and percentage of

- motility as influenced by semen dilution. *Fertility and Sterility*, 32(4), 443-9.
32. Khắc Liêu Nguyễn (2003), *Chẩn đoán và điều trị vô sinh*, Hà Nội, Nhà xuất bản Y học.
 33. Ngô Huy Toàn Nguyễn Việt Tiến, Bạch Huy Anh (2009), *Nghiên cứu thực trạng vô sinh ở Việt Nam theo các vùng sinh thái*, Bệnh viện Phụ sản Trung ương, Đại học Y Hà Nội Hà Nội.
 34. Nguyễn Bửu Triều Trần Quán Anh (2009), *Bệnh học giới tính nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
 35. Hoàng Nông Minh (2010), *Nghiên cứu tình hình vô sinh 4 tỉnh Miền núi phía Bắc Việt Nam.* , Luận văn thạc sỹ Y học Đại học Y Hà Nội.
 36. Như Nguyễn Đức (2015), *Nghiên cứu bất thường NST và phát hiện mất đoạn AZFabcd ở những nam giới vô tinh và thiếu tinh năng*, Luận văn Tiến Sĩ Y học.
 37. Gallagher J. (2012), *Five millionth “test tube baby”*, BBC News, truy cập ngày July 1-2019, tại trang web <http://www.bbc.com/news/health-18649582>.
 38. Đặng Quang Vinh Hồ Mạnh Tường, Vương Thị Ngọc Lan (2011), *IVF*, Nhà xuất bản giáo dục Việt Nam.
 39. Nguyễn Khắc Liêu (2002), *Những phương pháp hỗ trợ sinh sản, Vô sinh chẩn đoán và điều trị*, NXB Y học
 40. Rainsbury PA Brinsden PR (1992), *A textmbook of in vitro fertilization and assisted reproduction*, The Parthenon Publishing Group, Carnforth.
 41. ASRM Practice Committee (2009). ASRM Practice Committee response to Rybak and Lieman: elective self-donation of oocytes. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1513-4.
 42. Nguyễn Song Nguyên (1999), *Hiếm muộn - vô sinh và kỹ thuật hỗ trợ sinh sản*, NXB Thành phố Hồ Chí Minh.
 43. SART and ASRM (2004). Assisted reproductive technology in the United States: 2000 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertility and Sterility*, 81(5), 1207-20.
 44. Q. F. Cai, F. Wan, R. Huang et al. (2011). Factors predicting the cumulative outcome of IVF/ICSI treatment: a multivariable analysis of 2450 patients. *Human Reproduction*, 26(9), 2532-40.

45. ESHRE PGD Consortium Steering Committee (2002). ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Human Reproduction*, 17(1), 233-246.
46. Hamerton J.L. (1971), *Human cytogenetics*, New York and London, Academic Press, Vol 2.
47. A. Azzarello, T. Hoest and A. L. Mikkelsen (2012). The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Human Reproduction*, 27(9), 2649-57.
48. Alain Debec, William Sullivan and Monica Bettencourt-Dias (2010). Centrioles: active players or passengers during mitosis? *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(13), 2173-2194.
49. H. W. Jones, Jr., H. J. Out, E. H. Hoomans et al. (1997). Cryopreservation: the practicalities of evaluation. *Human Reproduction*, 12(7), 1522-4.
50. Vương Thị Ngọc Lan (2002), *Tương quan giữa độ dày nội mạc tử cung qua siêu âm với tỉ lệ thai lâm sàng bằng IVF*, Luận văn tốt nghiệp bác sĩ nội trú, Trường đại học Y dược tp HCM.
51. K. K. Niakan, J. Han, R. A. Pedersen et al. (2012). Human pre-implantation embryo development. *Development*, 139(5), 829-41.
52. John C.M. Dumoulin, Josien G. Derhaag, Marijke Bras et al. (2005). Growth rate of human preimplantation embryos is sex dependent after ICSI but not after IVF. *Human Reproduction*, 20(2), 484-491.
53. P. F. Ray, J. Conaghan, R. M. Winston et al. (1995). Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following in vitro fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility*, 104(1), 165-71.
54. Kyoko Iwata, Keitaro Yumoto, Minako Sugishima et al. (2014). Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(4), 421-426.
55. M. Ivec, B. Kovacic and V. Vlasisavljevic (2011). Prediction of human blastocyst development from morulas with delayed and/or incomplete compaction. *Fertility and Sterility*, 96(6), 1473-1478.e2.
56. L. A. Scott (2000). Oocyte and embryo polarity. *Seminars in reproductive medicine*, 18(2), 171-183.

57. K. Hardy, A. H. Handyside and R. M. Winston (1989). The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development*, 107(3), 597-604.
58. Luca Gianaroli, M. Cristina Magli, Anna P. Ferraretti et al. (2003). Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertility and Sterility*, 80(2), 341-349.
59. D. K. Gardner, M. Lane, J. Stevens et al. (2000). Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility*, 73(6), 1155-8.
60. D. Wells and J. D. Delhanty (2000). Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Molecular Human Reproduction*, 6(11), 1055-62.
61. C. Tomassetti and T. D'Hooghe (2018). Endometriosis and infertility: Insights into the causal link and management strategies. *Best practice & research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 51, 25-33.
62. Alex Simon and Neri Laufer (2012). Assessment and treatment of repeated implantation failure (RIF). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(11), 1227-1239.
63. Majid Mojarrad, Mohammad Hassanzadeh-Nazarabadi and Niaiesh Tafazoli (2013). Polymorphism of genes and implantation failure. *International journal of molecular and cellular medicine*, 2(1), 1-8.
64. C. Rubio, J. Bellver, L. Rodrigo et al. (2013). Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertility and Sterility*, 99(5), 1400-7.
65. John J. Orris, Tyl H. Taylor, Janice W. Gilchrist et al. (2010). The utility of embryo banking in order to increase the number of embryos available for preimplantation genetic screening in advanced maternal age patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(12), 729-733.
66. M. Milan, A. C. Cobo, L. Rodrigo et al. (2010). Redefining advanced maternal age as an indication for preimplantation genetic screening. *Reproductive Biomedicine Online*, 21(5), 649-57.
67. E. Greco, S. Bono, A. Ruberti et al. (2014). Comparative genomic hybridization selection of blastocysts for repeated implantation failure treatment: a pilot study. *BioMed Research International*, 2014, 457913.

68. C. Blockeel, V. Schutyser, A. De Vos et al. (2008). Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reproductive BioMedicine Online*, 17(6), 848-54.
69. L. K. Shahine and R. B. Lathi (2014). Embryo selection with preimplantation chromosomal screening in patients with recurrent pregnancy loss. *Seminars in Reproductive Medicine*, 32(2), 93-9.
70. S. Munne, S. Chen, J. Fischer et al. (2005). Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertility and Sterility*, 84(2), 331-5.
71. J. C. Harper, L. Wilton, J. Traeger-Synodinos et al. (2012). The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum Reprod Update*, 18(3), 234-47.
72. Norbert Gleicher, Vitaly A. Kushnir and David H. Barad (2014). Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: a systematic review. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 12, 22-22.
73. Fernando Zegers-Hochschild, G. David Adamson, Silke Dyer et al. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Human reproduction (Oxford, England)*, 32(9), 1786-1801.
74. W. Verpoest, C. Staessen, P. M. Bossuyt et al. (2018). Preimplantation genetic testing for aneuploidy by microarray analysis of polar bodies in advanced maternal age: a randomized clinical trial. *Human Reproduction*, 33(9), 1767-1776.
75. T. Zore, L. L. Kroener, C. Wang et al. (2019). Transfer of embryos with segmental mosaicism is associated with a significant reduction in live-birth rate. *Fertility and Sterility*, 111(1), 69-76.
76. S. Munné, H. U. G. Weier, J. Grifo et al. (1994). Chromosome Mosaicism in Human Embryos. *Biology of Reproduction*, 51(3), 373-379.
77. Paul R. Brezina, William H. Kutteh, Amelia P. Bailey et al. (2016). Preimplantation genetic screening (PGS) is an excellent tool, but not perfect: a guide to counseling patients considering PGS. *Fertility and Sterility*, 105(1), 49-50.
78. P. R. Brezina, R. Ross, R. Kaufmann et al. (2013). Genetic normalization of differentiating aneuploid cleavage stage embryos. *Fertility and Sterility*, 100(3), S69.

79. Boris B. T. Wang, Cathi H. Rubin and John Williams III (1993). Mosaicism in chorionic villus sampling: An analysis of incidence and chromosomes involved in 2612 consecutive cases. *Prenatal Diagnosis*, 13(3), 179-190.
80. M. Cristina Magli, Alessandra Pomante, Giulia Cafueri et al. (2016). Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophoctoderm cells, or blastocoelic fluid? *Fertility and Sterility*, 105(3), 676-683.e5.
81. John B. Whitney, Katie Balloch, Robert E. Anderson et al. (2019). Day 7 blastocyst euploidy supports routine implementation for cycles using preimplantation genetic testing. *JBRA Assisted Reproduction*, 23(1), 45-50.
82. Hui He, Shuang Jing, Chang Fu Lu et al. (2019). Neonatal outcomes of live births after blastocyst biopsy in preimplantation genetic testing cycles: a follow-up of 1,721 children. *Fertility and Sterility*, 112(1), 82-88.
83. A. De Vos, C. Staessen, M. De Rycke et al. (2009). Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. *Human Reproduction*, 24(12), 2988-96.
84. H. Zhao, W. Tao, M. Li et al. (2019). Comparison of two protocols of blastocyst biopsy submitted to preimplantation genetic testing for aneuploidies: a randomized controlled trial, 299(5), 1487-1493.
85. A. Adler, H. L. Lee, D. H. McCulloh et al. (2014). Blastocyst culture selects for euploid embryos: comparison of blastomere and trophoctoderm biopsies. *Reproductive BioMedicine Online*, 28(4), 485-91.
86. Long Jin and Ricardo V. Lloyd (1997). In situ hybridization: Methods and applications. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11(1), 2-9.
87. D. K. Griffin, L. J. Wilton, A. H. Handyside et al. (1992). Dual fluorescent in situ hybridisation for simultaneous detection of X and Y chromosome-specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Human Genetics*, 89(1), 18-22.
88. F. Fiorentino, L. Spizzichino, S. Bono et al. (2011). PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Human Reproduction*, 26(7), 1925-1935.

89. Francesco Fiorentino, Anil Biricik, Sara Bono et al. (2014). Development and validation of a next-generation sequencing- based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertility and Sterility*, 101(5), 1375-1382.e2.
90. J. Yan, E. Guilbault, J. Masse et al. (2000). Optimization of the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique for high detection efficiency of very small proportions of target interphase nuclei. *Clinical Genetics*, 58(4), 309-18.
91. V. Jobanputra, K. K. Roy and K. Kucheria (2002). Prenatal detection of aneuploidies using fluorescence in situ hybridization: a preliminary experience in an Indian set up. *Journal of Biosciences*, 27(2), 155-63.
92. D. Pinkel and D. G. Albertson (2005). Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nature Genetics*, 37 Suppl, S11-7.
93. C. Garnis, B. P. Coe, S. L. Lam et al. (2005). High-resolution array CGH increases heterogeneity tolerance in the analysis of clinical samples. *Genomics*, 85(6), 790-3.
94. L. Voullaire, H. Slater, R. Williamson et al. (2000). Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Human Genetics*, 106(2), 210-7.
95. Nicolas Wicker, Annaïck Carles, Ian G. Mills et al. (2007). A new look towards BAC-based array CGH through a comprehensive comparison with oligo-based array CGH. *BMC genomics*, 8, 84-84.
96. S. Solinas-Toldo, S. Lampel, S. Stilgenbauer et al. (1997). Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*, 20(4), 399-407.
97. Antoine M. Snijders, Norma Nowak, Richard Seagraves et al. (2001). Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nature Genetics*, 29(3), 263-264.
98. D. Pinkel, R. Seagraves, D. Sudar et al. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genetics*, 20(2), 207-11.
99. S. Y. Kim, S. W. Nam, S. H. Lee et al. (2005). ArrayCyGHt: a web application for analysis and visualization of array-CGH data. *Bioinformatics*, 21(10), 2554-5.

100. B. Chi, R. J. DeLeeuw, B. P. Coe et al. (2004). SeeGH--a software tool for visualization of whole genome array comparative genomic hybridization data. *BMC Bioinformatics*, 5, 13.
101. N. Wicker, A. Carles, I. G. Mills et al. (2007). A new look towards BAC-based array CGH through a comprehensive comparison with oligo-based array CGH. *BMC Genomics*, 8, 84.
102. D Wells, MG Bermudez, N Steuerwald et al. (2004). Microarrays for analysis and diagnosis of human embryos. *Recent Advances in Prenatal Genetic Diagnosis. Bologna, Italy: Medimond*, 9-17.
103. D. G. Hu, G. Webb and N. Hussey (2004). Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Molecular Human Reproduction*, 10(4), 283-9.
104. M. V. Traversa, J. Marshall, S. McArthur et al. (2011). The genetic screening of preimplantation embryos by comparative genomic hybridisation. *Reproductive Biology*, 11 Suppl 3, 51-60.
105. S. Alfarawati, E. Fragouli, P. Colls et al. (2011). The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertility and Sterility*, 95(2), 520-4.
106. C. Rubio, L. Rodrigo, P. Mir et al. (2013). Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertility and Sterility*, 99(4), 1044-8.
107. B. Xiang, A. Li, D. Valentin et al. (2008). Analytical and clinical validity of whole-genome oligonucleotide array comparative genomic hybridization for pediatric patients with mental retardation and developmental delay. *American Journal of Medical Genetics*, 146a(15), 1942-54.
108. X. Lu, C. A. Shaw, A. Patel et al. (2007). Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PLoS One*, 2(3), e327.
109. C. Tyson, C. Harvard, R. Locker et al. (2005). Submicroscopic deletions and duplications in individuals with intellectual disability detected by array-CGH. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 139A(3), 173-185.
110. A. Rauch, J. Hoyer, S. Guth et al. (2006). Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *American Journal of Medical Genetics*, 140(19), 2063-74.

111. K. Lukaszuk, S. Puksza, D. Wells et al. (2015). Routine use of next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis of blastomeres obtained from embryos on day 3 in fresh in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility*, 103(4), 1031-6.
112. K. Lukaszuk, G. Jakiel, W. Kuczynski et al. (2016). Next generation sequencing for preimplantation genetic testing of blastocysts aneuploidies in women of different ages. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(1), 163-6.
113. Z. Yang, J. Lin, J. Zhang et al. (2015). Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: a pilot study. *BMC Medical Genomics*, 8, 30.
114. S. Zhou, D. Cheng, Q. Ouyang et al. (2018). Prevalence and authenticity of de-novo segmental aneuploidy (>16 Mb) in human blastocysts as detected by next-generation sequencing. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(5), 511-520.
115. M. J. Escribà, X. Vendrell and V. Peinado (2019). Segmental aneuploidy in human blastocysts: a qualitative and quantitative overview. *Reprod Biol Endocrinol*, 17(1), 76.
116. J. Liss, E. Pastuszek, S. Puksza et al. (2018). Effect of next-generation sequencing in preimplantation genetic testing on live birth ratio. *Reproduction Fertility and Development*, 30(12), 1720-1727.
117. Svetlana Rechistky and Anver Kuliev (2018). Preimplantation genetic testing (PGT) for borderline indications – PGT for cancer. *Reproductive BioMedicine Online*, 36, e5.
118. N. Ramos, D. Johnson, L. Eisman et al. (2019), *The survival, biopsy, ploidy and pregnancy rates of previously vitrified blastocysts subjected to warming/biopsy/revitrification for PGT-A analysis*, Vol. 111, e36-e37.
119. S. Munné, M. Alikani, G. Tomkin et al. (1995). Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertility and Sterility*, 64(2), 382-91.
120. G. Sher, L. Keskinetepe, M. Keskinetepe et al. (2007). Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization [correction of hybridization] provides a highly reliable method for selecting "competent" embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study. *Fertility and Sterility*, 87(5), 1033-40.

121. L. Gianaroli, M. C. Magli, A. P. Ferraretti et al. (2003). Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertility and Sterility*, 80(2), 341-9.
122. C. K. Chen, G. Y. Shen, S. G. Horng et al. (2003). The relationship of pronuclear stage morphology and chromosome status at cleavage stage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 20(10), 413-20.
123. B. Balaban, K. Yakin, B. Urman et al. (2004). Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. *Reproductive BioMedicine Online*, 8(6), 695-700.
124. N. Al-Asmar, V. Peinado, M. Vera et al. (2012). Chromosomal abnormalities in embryos from couples with a previous aneuploid miscarriage. *Fertility and Sterility*, 98(1), 145-50.
125. M. Rabinowitz, A. Ryan, G. Gemelos et al. (2012). Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres. *Fertility and Sterility*, 97(2), 395-401.
126. Nguyễn Việt Tiên và Nguyễn Thị Minh (2014). Bước đầu đánh giá kết quả chẩn đoán di truyền tiền làm tổ tại bệnh viện phụ sản trung ương. *Tạp chí phụ sản*, (12), 173-175.
127. Nguyễn Việt Tiên và Đặng Thu Hằng Hoàng Thị Hương (2014). Ứng dụng kỹ thuật FISH trong sàng lọc một số lệch bội nhiễm sắc thể cho chẩn đoán di truyền tiền làm tổ. *Tạp chí phụ sản*, 12, 176-178.
128. W. B. Schoolcraft, E. Fragouli, J. Stevens et al. (2010). Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertility and Sterility*, 94(5), 1700-6.
129. E. Fragouli, M. Katz-Jaffe, S. Alfarawati et al. (2010). Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertility and Sterility*, 94(3), 875-87.
130. J. D. Delhanty, D. K. Griffin, A. H. Handyside et al. (1993). Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation, (FISH). *Human Molecular Genetics*, 2(8), 1183-5.
131. D.D. Daphnis, J.D.A. Delhanty, S. Jerkovic et al. (2005). Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy. *Human Reproduction*, 20(1), 129-137.

132. E. B. Baart, E. Martini, I. van den Berg et al. (2006). Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Human Reproduction*, 21(1), 223-33.
133. S. Ziebe, K. Lundin, A. Loft et al. (2003). FISH analysis for chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X and Y in all blastomeres of IVF pre-embryos from 144 randomly selected donated human oocytes and impact on pre-embryo morphology. *Human Reproduction*, 18(12), 2575-81.
134. J. Van Echten-Arends, S. Mastenbroek, B. Sikkema-Raddatz et al. (2011). Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. *Human Reproduction*, 17(5), 620-7.
135. L. Voullaire, L. Wilton, J. McBain et al. (2002). Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Molecular Human Reproduction*, 8(11), 1035-41.
136. Esther Baart, I. van den Berg, E. Martini et al. (2007), *FISH analysis of 15 chromosomes in human day 4 and 5 preimplantation embryos: The added value of extended aneuploidy detection*, Vol. 27, 55-63.
137. M. A. Santos, G. Teklenburg, N. S. Macklon et al. (2010). The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of Day 4, 5 and 8 human embryos. *Human Reproduction*, 25(8), 1916-26.
138. A. Mertzaniidou, L. Wilton, J. Cheng et al. (2012). Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Human Reproduction*, 28(1), 256-264.
139. E. Fragouli, S. Alfarawati, D. D. Daphnis et al. (2011). Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Human Reproduction*, 26(2), 480-90.
140. M. Sandalinas, S. Sadowy, M. Alikani et al. (2001). Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Human Reproduction*, 16(9), 1954-8.
141. M. Li, C. M. DeUgarte, M. Surrey et al. (2005). Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3. *Fertility and Sterility*, 84(5), 1395-400.

142. E. Fragouli, M. Lenzi, R. Ross et al. (2008). Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Human Reproduction*, 23(11), 2596-2608.
143. S. Barbash-Hazan, T. Frumkin, M. Malcov et al. (2009). Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertility and Sterility*, 92(3), 890-6.
144. R. Vassena, S. Boue, E. Gonzalez-Roca et al. (2011). Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development*, 138(17), 3699-709.
145. M. Cristina Magli, Luca Gianaroli, Anna Pia Ferraretti et al. (2007). Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertility and Sterility*, 87(3), 534-541.
146. Illumina (2014), *A Technical Guide to Aneuploidy Calling with VeriSeq PGS*, truy cập ngày 15 - 9-2019, tại trang web https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/veriseq-pgs/veriseq-pgs-technical-guide-to-aneuploidy-calling-15059470-a.pdf.
147. J. M. Franasiak, K. H. Hong, M. D. Werner et al. (2017). Preimplantation genetic screening (PGS) in low responders shortens time to pregnancy: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*, 108(3), e60-e61.
148. R. T. Scott, Jr. (2017). Introduction: Subchromosomal abnormalities in preimplantation embryonic aneuploidy screening. *Fertility and Sterility*, 107(1), 4-5.
149. S. C. Kane, E. Willats, E. Holanda Moura S. Bezerra Maia et al. (2016). Pre-Implantation Genetic Screening Techniques: Implications for Clinical Prenatal Diagnosis. *Fetal diagnosis and therapy*, 40(4), 241-254.
150. E Fragouli, M Lenzi, R Ross et al. (2008). Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Human reproduction*, 23(11), 2596-2608.
151. A. R. Victor, D. K. Griffin, A. J. Brake et al. (2019). Assessment of aneuploidy concordance between clinical trophoctoderm biopsy and blastocyst. *Human Reproduction*, 34(1), 181-192.

152. J. Doležel, J. Bartoš, H. Voglmayr et al. (2003). Letter to the editor. *Cytometry Part A*, 51A(2), 127-128.
153. N. R. Treff, J. Su, X. Tao et al. (2011). Single-cell whole-genome amplification technique impacts the accuracy of SNP microarray-based genotyping and copy number analyses. *Molecular Human Reproduction*, 17(6), 335-43.
154. D. Chen, H. Zhen, Y. Qiu et al. (2018). Comparison of single cell sequencing data between two whole genome amplification methods on two sequencing platforms. *Scientific Reports*, 8(1), 4963.
155. L. Deleye, Coninck, D., Christodoulou, C. et al. (2015). Whole genome amplification with SurePlex results in better copy number alteration detection using sequencing data compared to the MALBAC method. *Scientific Reports*, 5(1), 11711.
156. Allen Kung, Santiago Munné, Brandon Bankowski et al. (2015). Validation of next-generation sequencing for comprehensive chromosome screening of embryos. *Reproductive BioMedicine Online*, 31(6), 760-769.
157. N. Aleksandrova, E. Shubina, A. Ekimov et al. (2016). Comparison of the results of preimplantation genetic screening obtained by a-CGH and NGS methods from the same embryos. *Gynecological Endocrinology*, 32(sup2), 1-4.
158. Susan M. Maxwell, Pere Colls, Brooke Hodes-Wertz et al. (2016). 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*, 106(6), 1414-1419.e5.
159. M. G. Minasi, F. Fiorentino, A. Ruberti et al. (2017). Genetic diseases and aneuploidies can be detected with a single blastocyst biopsy: a successful clinical approach. *Human Reproduction*, 32(8), 1770-1777.
160. Cristina Gutiérrez-Mateo, Pere Colls, Jorge Sánchez-García et al. (2011). Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertility and sterility*, 95(3), 953-958.
161. William B Schoolcraft, Elpida Fragouli, John Stevens et al. (2010). Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertility and sterility*, 94(5), 1700-1706.

162. Carmen Rubio, José Bellver, Lorena Rodrigo et al. (2013). Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertility and sterility*, 99(5), 1400-1407.
163. E Fragouli and D Wells (2011). Aneuploidy in the human blastocyst. *Cytogenetic and genome research*, 133(2-4), 149-159.
164. Samer Alfarawati, Elpida Fragouli, Pere Colls et al. (2011). The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertility and sterility*, 95(2), 520-524.
165. Maria Teresa Zenzes and Robert F Casper (1992). Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization. *Human genetics*, 88(4), 367-375.
166. P. R. Brezina, K. Tobler, A. T. Benner et al. (2012). All 23 Chromosomes have Significant Levels of Aneuploidy in Recurrent Pregnancy Loss Couples. *Fertility and Sterility*, 97(3), S7.
167. C. Cuman, C. E. Beyer, D. Brodie et al. (2018). Defining the limits of detection for chromosome rearrangements in the preimplantation embryo using next generation sequencing. *Human Reproduction*, 33(8), 1566-1576.
168. Van Echten-Arends Jannie, Mastenbroek Sebastiaan, Sikkema-Raddatz Birgit et al. (2011). Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 17(5), 620-627.
169. Greco E., Minasi M. G. and Fiorentino F. (2015). Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. *The New England Journal of Medicine*, 373(21), 2089-90.
170. Bolton Helen, Graham Sarah J. L., van der Aa Niels et al. (2016). Mouse Model of Chromosome Mosaicism Reveals Lineage-Specific Depletion of Aneuploid Cells and Normal Developmental Potential. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 71(11), 665-666.
171. Ruttanajit Tida, Chanchamroen Sujin, Cram David S. et al. (2016). Detection and quantitation of chromosomal mosaicism in human blastocysts using copy number variation sequencing. *Prenatal Diagnosis*, 36(2), 154-162.
172. Fragouli Elpida, Alfarawati Samer, Spath Katharina et al. (2017). Analysis of implantation and ongoing pregnancy rates following the

- transfer of mosaic diploid–aneuploid blastocysts. *Human Genetics*, 136(7), 805-819.
173. Zhang Ying Xin, Chen Jang Jih, Nabu Sunanta et al. (2020). The Pregnancy Outcome of Mosaic Embryo Transfer: A Prospective Multicenter Study and Meta-Analysis. *Genes*, 11(9), 973.
 174. G. L. Harton, C. Cinnioglu and F. Fiorentino (2017). Current experience concerning mosaic embryos diagnosed during preimplantation genetic screening. *Fertility and Sterility*, 107(5), 1113-1119.
 175. S. Munne, F. Spinella, J. Grifo et al. (2020). Clinical outcomes after the transfer of blastocysts characterized as mosaic by high resolution Next Generation Sequencing- further insights. *European Journal of Medical Genetics*, 63(2), 103741.
 176. Takabachi Noriko, Nishimaki Shigeru, Omae Mari et al. (2008). Long-term survival in a 69,XXX triploid premature infant. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 146A(12), 1618-1621.
 177. Zachary P., A. L. Simon, R. C. McCoy et al. (2016). 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*, 105(5), 1307-1313.
 178. Santiago Munné, Shiuan Chen, P. Colls et al. (2007). Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reproductive biomedicine online*, 14, 628-34.
 179. C. Rubio, C. Simon, F. Vidal et al. (2003). Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Human Reproduction*, 18(1), 182-8.
 180. E. Fragouli and D. Wells (2011). Aneuploidy in the human blastocyst. *Cytogenetic and Genome Research*, 133(2-4), 149-59.
 181. Santiago Munné, Mireia Sandalinas, Tomas Escudero et al. (2002). Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reproductive biomedicine online*, 4(3), 223-232.