

## Xét nghiệm di truyền phôi tiền làm tổ không xâm lấn

Trương Văn Hải<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Minh Phương<sup>1</sup>, Lưu Thị Minh Tâm<sup>1</sup>, Phan Thị Kim Anh<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IVFMD, Bệnh viện đa khoa Mỹ Đức

<sup>2</sup> IVFBMT-Bệnh viện Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột

doi:10.46755/vjog.2021.3.1211

Tác giả liên hệ (Corresponding author): Trương Văn Hải, email: tvhai@bmtvietnam.com

Nhận bài (received): 15/7/2021 - Chấp nhận đăng (accepted): 10/9/2021

### Tóm tắt

Hiện tượng lệch bội nhiễm sắc thể ở phôi là một trong những nguyên nhân chính gây thất bại làm tổ, sảy thai liên tiếp, làm giảm hiệu quả điều trị thụ tinh trong ống nghiệm. Xét nghiệm di truyền phôi tiền làm tổ phát hiện phôi lệch bội (Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy) giúp sàng lọc, phát hiện các phôi mang bất thường về số lượng nhiễm sắc thể bằng cách thu nhận 5-10 tế bào lá nuôi phôi (Trophectoderm). Tuy nhiên, việc sinh thiết tế bào mang tính xâm lấn và yêu cầu kỹ năng thực hiện của chuyên viên phôi học để bảo đảm tiềm năng của phôi. Ngoài ra, lượng phôi bào chỉ được thu nhận từ lá nuôi phôi không đại diện cho thông tin di truyền của toàn bộ phôi. Trong những năm gần đây, một hướng tiếp cận mới là xét nghiệm di truyền phôi tiền làm tổ không xâm lấn đã được nghiên cứu mạnh mẽ nhằm thay thế, khắc phục hạn chế của phương thức truyền thống, sử dụng đối tượng nghiên cứu mới là DNA tự do. Trong quá trình nuôi cấy in-vitro, DNA tự do đã được chứng minh có nguồn gốc từ quá trình chết theo chu trình (apoptosis) hoặc sửa sai của cả lớp tế bào lá nuôi và khối tế bào bên trong (Inner Cell Mas) của phôi, được tiết vào trong dịch khoang phôi hay môi trường nuôi cấy. Các nghiên cứu ứng dụng thu nhận, khuếch đại, phân tích nhiễm sắc thể từ nguồn DNA tự do bước đầu ghi nhận kết quả khả quan, tuy nhiên vẫn cần nhiều cải thiện và phân tích đánh giá sâu trong tương lai.

**Từ khóa:** Lệch bội, xét nghiệm di truyền phôi tiền làm tổ không xâm lấn, ni-PGT, DNA tự do, cf-DNA.

## Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT)

Trương Văn Hải<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Minh Phương<sup>1</sup>, Lưu Thị Minh Tâm<sup>1</sup>, Phan Thị Kim Anh<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IVFMD, My Duc Hospital

<sup>2</sup> IVFBMT, Buon Ma Thuot University Hospital of Medicine and Pharmacy

### Summary

Embryo aneuploidy is the most important reason of failed implantation, recurrent miscarriages and IVF failure. Preimplantation genetic testing (PGT) for aneuploidy is a technique developed to analyse the number of chromosomes and select chromosomally healthy embryos. Current PGT methods have biopsied 5 - 10 trophectoderm cells for the sampling of genetic material. However, biopsy protocols remain technically challenging, invasive procedures, which could conceivably impact embryo viability. Furthermore, a single Trophectoderm biopsy might not be representative of the whole embryo. The recent discovery of cell free - DNA within the blastocoele fluid of blastocysts and in spent embryo culture media has led to the interest in the development of non-invasive methods of PGT. Cell free-DNA present is from intracellular contents of embryonic cells that underwent apoptosis during preimplantation embryo development. Many studies have been conducted in the last years to evaluate this technique and many of them reported moderate success rates. Although very promising, non-invasive methods for analyzing embryo ploidy are still at a premature stage, needing further study and standardization protocols.

**Keywords:** Aneuploidy, Non-invasive preimplantation genetic testing, niPGT, cell free DNA, cf-DNA.

### 1. TỔNG QUAN DNA TỰ DO (CELL FREE-DNA, CF-DNA) TRONG XÉT NGHIỆM NIPGT

#### 1.1. cf-DNA: nguồn gốc và tiềm năng.

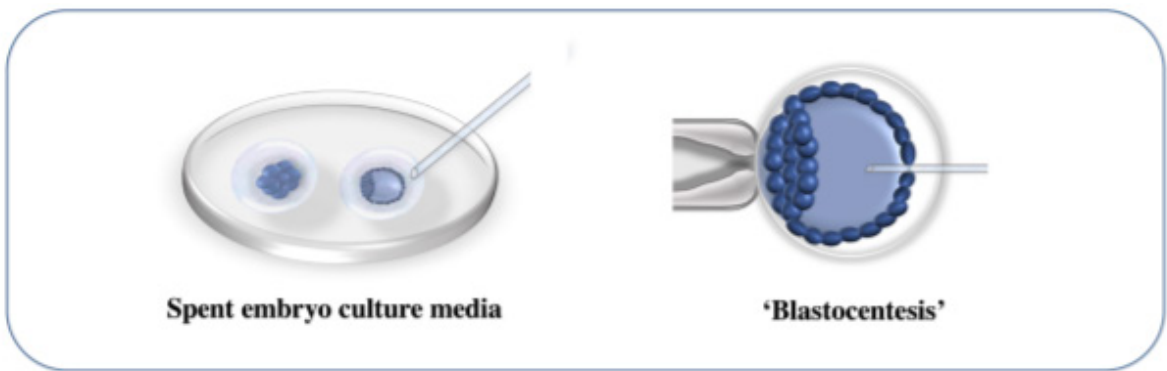
DNA tự do (cell free-DNA, cf-DNA) là những đoạn DNA mạch đôi ngắn với kích thước khoảng 180 - 200 bp, được phát hiện đầu tiên vào năm 1948 trong huyết tương người. Nguồn gốc của cf-DNA được cho là tiết ra từ các hoạt động chết theo chương trình (apoptosis) hoặc quá trình hoại tử (necrosis) của tế bào. Năm 1997, Denis và cộng sự đã phân lập thành công cf-DNA có nguồn gốc

từ nhiễm sắc thể (NST) Y trong huyết tương người, từ đó mở ra một hướng nghiên cứu mới cho việc phân tích di truyền từ nguồn vật chất di truyền ngoại bào [1]. Trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản (HTSS), khi nuôi cấy phôi in-vitro, một lượng cf-DNA được phát hiện và thu nhận ở dịch khoang phôi (blastocoele fluid - BF) hoặc môi trường nuôi cấy đã qua sử dụng (spent culture medium - SCM). Nhiều nghiên cứu ủng hộ giả thuyết rằng cf-DNA có nguồn gốc từ phôi bào qua quá trình chết theo chương trình và sửa sai liên tục trong thời gian phát triển của phôi, dù là phôi

nguyên bội hay dị bội. Hệ quả là sự tiết các mảnh DNA vào môi trường nuôi cấy và dịch khoang phôi (đối với phôi nang), hoạt động này diễn ra ở cả tế bào lá nuôi phôi (Trophectoderm-TE) và khối tế bào bên trong (Inner Cell Mass-ICM) [2], [3]. Xét nghiệm di truyền phôi tiền làm tổ không xâm lấn (non-invasive preimplantation genetic testing – niPGT) dựa trên cơ sở phân tích nguồn cf-DNA được cho là phản ánh đầy đủ thông tin di truyền của toàn bộ phôi so với kỹ thuật PGT truyền thống chỉ thu nhận tế bào TE. Do đó, cf-DNA hiện nay đang được nghiên cứu ứng dụng như một xét nghiệm mới trong phân tích di truyền phôi, là bước tiến mới trong nâng cao chất lượng HTSS [4].

### 1.2. Thu nhận và phân tích cf-DNA

Trong xét nghiệm niPGT, cf-DNA được thu nhận từ ba nguồn: dịch khoang phôi (BF), môi trường nuôi cấy phôi (SCM) hoặc kết hợp cả 2 nguồn trên.



Hình 1. cf-DNA được thu nhận từ SCM và BF [6].

Sau khi thu nhận, cf-DNA được khuếch đại toàn bộ gen (WGA) bằng các kỹ thuật tối ưu hiện nay là MALBAC hay SurePLEX vì độ bao phủ bộ gen cao và tỷ lệ bỏ sót allele thấp [7]. Kết quả phân tích thu được bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing-NGS).

### 1.3. Một số nghiên cứu ứng dụng niPGT

Hiện nay đã có nhiều nghiên cứu phân tích, so sánh hiệu quả thu nhận và kết quả di truyền của cf-DNA được thu từ 3 nguồn trên với sinh thiết tế bào TE.

#### Dịch khoang phôi (BF):

Năm 2013, Palini và cộng sự đã báo cáo thu nhận, khuếch đại thành công cf-DNA từ BF bằng phương pháp realtime-PCR với hiệu suất thu nhận đạt 90%. Hàm lượng cf-DNA trung bình thu nhận là 9,9 pg/mẫu tương đương với hàm lượng DNA của một phôi bào. Ngoài ra, nghiên cứu cũng khuếch đại thành công 80% các locus trên NST số 16, 17 và giới tính của phôi, mở ra một bước tiến mới trong vấn đề xét nghiệm các bệnh lý đơn gen liên kết với NST giới tính mà không gây xâm lấn phôi [8]. Tác giả Gianaroli (2014) đã phát hiện có 76,5% mẫu dịch khoang phôi có tồn tại cf-DNA. Tỷ lệ tương đồng lần lượt giữa cf-DNA với DNA từ sinh thiết thể cực là 94,9%, sinh thiết TE là 97,4%. Có thể thấy cf-DNA có nguồn gốc từ BF có thể là một nguồn thay thế tiềm năng so với DNA từ sinh thiết TE trong phân tích NST [9].

Năm 2012, nghiên cứu của Alessandro và cộng sự đã phát hiện ra một loạt các chất chuyển hóa trong dịch khoang phôi (BF) [5]. Phương pháp thu nhận từ BF được gọi là blastocentesis, bằng cách cố định phôi nang mở rộng bằng kim giữ và sử dụng một vi kim xuyên qua lớp TE ở phần đối diện ICM để hút dịch trong khoang phôi. Thao tác hút dịch BF tương tự như thao tác làm sụp khoang phôi (collapse) bằng laser trước khi trữ lạnh phôi, do đó, việc hút dịch khoang phôi, không làm ảnh hưởng đến tiềm năng phát triển của phôi. Đối với SCM, cf-DNA được thu nhận bằng cách thu dịch môi trường nuôi cấy xung quanh phôi, không thu nhận phần đầu phủ môi trường.

Có thể thu nhận cf-DNA từ cả 2 nguồn gồm 2 bước: đầu tiên là sử dụng vi kim hoặc laser làm sụp khoang phôi, để dịch khoang phôi tiết ra ngoài môi trường nuôi cấy. Sau đó, dùng dụng cụ chuyên dụng thu nhận hỗn hợp môi trường nuôi và dịch khoang phôi [6].

Ngược lại, báo cáo của Tobler (2015) cho kết quả khuếch đại cf-DNA từ dịch phôi nang chỉ đạt 63%, tỷ lệ tương đồng NST so với sinh thiết TE đạt 62% và so với toàn bộ phôi đạt 48%. Kết quả này thấp hơn nhiều so với các dữ liệu đã công bố trước đó, nguyên nhân có thể do hiện tượng nhiễm DNA từ khối cumulus quanh nõn trong quá trình nuôi cấy. Theo những báo cáo hiện tại, tỷ lệ khuếch đại cf-DNA từ BF dao động trong khoảng 40 - 98% và độ tương đồng với TE khoảng 62 - 97% [10].

cf-DNA thu nhận từ BF có thể là một nguồn tiềm năng trong xét nghiệm niPGT. Tuy nhiên, vẫn có một số khác biệt giữa các nghiên cứu. Đầu tiên đây vẫn được xem xét là phương pháp xâm lấn tối thiểu; việc sử dụng kim để hút dịch BF có thể làm tổn thương một số tế bào, dẫn đến sự tiết DNA của các tế bào đó làm sai lệch kết quả phân tích. Ngoài ra, thể tích dịch khoang phôi được thu nhận dao động từ 0,3µl (được cho là dịch BF) đến 1µl (bị pha loãng bởi thành phần khác), sự khác biệt này sẽ ảnh hưởng lớn đến nồng độ cf-DNA thu nhận và kết quả phân tích [6].

#### Môi trường nuôi cấy (SCM):

Năm 2015, Wu và cộng sự đã công bố khuếch đại và phân tích thành công từ môi trường nuôi cấy phôi để chẩn đoán bệnh lý di truyền đơn gen Alpha-thalassemia, hiệu quả chẩn đoán đạt 88,6%, so với sinh thiết TE là 83,7% [11]. Năm 2016, Liu và cộng sự

đã thành công phát hiện các đột biến Beta-thalassemia thông qua phân tích cf-DNA từ SCM, tỷ lệ tương đồng với sinh thiết TE đạt 83,87% [12]. Những dữ liệu trên đã mở ra một hướng mới cho việc phân tích các bệnh lý di truyền đơn gen trong HTSS. Nghiên cứu của Capalbo và cộng sự năm 2018, thực hiện kỹ thuật niPGT-M thông qua phân tích cf-DNA từ SCM, so sánh với kết quả PGT-M từ những phôi trên cho thấy mức độ tương đồng thấp (trong các nhóm BF và SBM tương ứng, chỉ 2,9% và 20,8% mẫu có kiểu gen đơn bội hoàn toàn phù hợp với mẫu sinh thiết TE). Kết quả này có thể do sự nhiễm DNA ngoại lai hoặc/và DNA từ noãn, hoặc do quy trình thực hiện chưa đồng nhất [13].

Hiện nay, phần lớn các nghiên cứu tiến hành thực hiện niPGT-A nhằm phân tích bất thường số lượng NST. Theo báo cáo của tác giả Ho và cộng sự năm 2018, tỷ lệ khuếch đại cf-DNA thành công lần lượt là 39% và 80,4% ở SCM thu ở giai đoạn phôi ngày 3 và ngày 5. Sự tương đồng về thể nguyên bội và NST giới tính của phân tích cf-DNA so với sinh thiết TE tương ứng là 56,3% và 81,3% ở ngày 3; 65% và 70% ở ngày 5 [14]. Năm 2019, Huang và cộng sự so sánh kết quả của niPGT-A và PGT-A trên 52 phôi hiến tặng, tỷ lệ dương tính giả ở niPGT-A (20%) thấp hơn so với PGT-A (50%). Đặc biệt, mức độ tương đồng NST 100% đã được ghi nhận khi phân tích phôi đa bội [15]. Nghiên cứu đa trung tâm của Vagnini và cộng sự cũng cho kết quả tương đồng, giá trị tiên đoán dương (PPV, được xác định bằng tỷ lệ giữa số lượng phôi có lệch bội được ghi nhận trong xét nghiệm với số lượng phôi lệch bội thực tế) là 93,5% ở niPGT-A, cao hơn so với PGT-A là 78,4%. Cả hai phương pháp đều có giá trị dự đoán âm (NPV, được xác định bằng tỷ lệ giữa số lượng phôi nguyên bội trong xét nghiệm so với số lượng phôi nguyên bội thực tế) là 100% và tỷ lệ âm tính giả (FNR) là 0% [16]. Như vậy, các nghiên cứu hiện tại đều cho kết quả khả quan khi ứng dụng niPGT-A bằng cách thu nhận cf-DNA từ SCM vào thực hành lâm sàng. niPGT-A cho kết quả phân tích tình trạng nguyên bội hoặc dị bội của phôi có thể tương đương hoặc cao hơn so với PGT-A.

#### **Kết hợp giữa dịch khoang phôi (BF) và môi trường nuôi cấy (SCM):**

Nhằm tăng hiệu quả thu nhận và phân tích cf-DNA, đã có một số nghiên cứu kết hợp thu nhận từ dịch khoang phôi (BF) và môi trường nuôi cấy phôi (SCM), gọi tắt là BCM (Blastocyst Culture Medium). Năm 2018, Kuznyetsov đã tiến hành thu nhận cf-DNA từ BCM trên 47 phôi hiến tặng với nồng độ dao động từ 6,3 đến 44,0 ng/ $\mu$ l, hoàn toàn đủ lượng cf-DNA sử dụng cho phân tích di truyền. Ngoài ra, có thể sử dụng WGA trực tiếp và không cần phải qua bước xử lý mẫu với enzyme hoặc tinh chế trước khi tiến hành khuếch đại mà vẫn cho kết quả không khác biệt [17]. Nghiên cứu của Li và cộng sự năm 2018 cũng cho thấy tỷ lệ phát hiện cf-DNA trong mẫu BCM cao (97,5%) nhưng tỷ lệ tương đồng so với toàn bộ phôi chỉ đạt 50%, tác giả khuyến cáo không nên sử dụng nguồn cf-DNA từ các mẫu này cho sàng lọc lệch bội [18]. Gần đây nhất, tác giả Jiao và cộng sự (2019) đã khẳng định mẫu BCM cho nồng độ thư viện

DNA trung bình là  $38,88 \pm 24,08$  ng/ml hoàn toàn đủ để phân tích, 100% các mẫu BCM có khả năng phát hiện các dạng bất thường cấu trúc NST. Khi so sánh tỷ lệ tương đồng NST trong mẫu BCM và TE so với kết quả phân tích toàn bộ phôi (BE - blastocyst-stage embryos) thì tỷ lệ này lần lượt là 90% và 100% [19]. Nhìn chung, các nghiên cứu nêu trên đều cho thấy lượng cf-DNA thu nhận từ BCM lớn, có thể sử dụng để khuếch đại WGA trực tiếp và phân tích thông tin di truyền của phôi. Tuy nhiên, mức độ tương đồng với sinh thiết TE vẫn còn khác biệt giữa những nghiên cứu và tương tự như ở quy trình thu nhận dịch khoang phôi, phương thức này vẫn có tính xâm lấn tối thiểu và có thể hoà lẫn DNA phôi bào bị vỡ do thao tác hút dịch.

## **2. KHUYẾN CÁO THỰC HIỆN NIPGT**

### **2.1. Giảm nhiễm DNA ngoại lai**

cf-DNA được thu nhận từ môi trường nuôi cấy có thể nhiễm DNA ngoại lai, xuất phát từ tinh trùng hoặc tế bào cumulus quanh noãn hoặc một số nguồn khác trong quá trình nuôi cấy. Đây cũng là nguyên nhân làm cho kết quả phân tích cf-DNA không tương đồng với kết quả sinh thiết TE hay của toàn bộ phôi. Nhằm hạn chế nhiễm DNA từ tinh trùng, hiện nay việc thực hiện "ICSI toàn bộ" được khuyến cáo đối với niPGT, bên cạnh đó các khối tế bào hạt bao quanh noãn cũng cần được loại bỏ tối đa để hạn chế việc nhiễm DNA từ noãn [20]. Nuôi cấy phôi đơn được đề xuất để đảm bảo rằng nguồn cf-DNA được thu nhận có nguồn gốc từ một phôi, tránh việc nhầm lẫn thông tin di truyền giữa các phôi. Tuy nhiên, phương pháp này cần phải sử dụng lượng môi trường và đĩa nuôi cấy nhiều hơn so với nuôi cấy nhóm [21]. Như vậy, để đảm bảo giảm thiểu nhiễm DNA ngoại lai thì cần thực hiện kỹ thuật ICSI, nuôi cấy đơn và loại sạch tế bào quanh noãn để đạt được hiệu quả phân tích cao nhất.

### **2.2. Thời gian thu nhận cf-DNA**

Đối với nguồn cf-DNA thu nhận từ SCM, nghiên cứu của Wu năm 2015 ghi nhận tỷ lệ khuếch đại cf-DNA ở giai đoạn phôi dâu ngày thứ 4 chỉ đạt 9,67%, tuy nhiên, nếu thu ở giai đoạn ngày 5 thì tỷ lệ có thể đạt đến 90,16%. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ khuếch đại DNA thành công của giai đoạn thu nhận ngày 5 so với ngày 6 ( $p > 0,05$ ). Bên cạnh đó, việc thay đổi môi trường nuôi cấy vào ngày 3 không những không làm mất lượng cf-DNA đáng kể mà còn có thể làm giảm tác nhân gây nhiễm từ noãn bào [11]. Tương tự, nghiên cứu của Lane và cộng sự năm 2017 cho thấy môi trường nuôi cấy phôi nang từ ngày 4 đến ngày 5 cho kết quả tương đồng lệch bội chính xác hơn giai đoạn từ ngày 3 đến ngày 5. Điều này có thể được giải thích bởi sự tăng cao của cf-DNA ở giai đoạn muộn của phôi và giảm nguy cơ cf-DNA bị phân huỷ trong quá trình nuôi cấy [22]. Đối với những phôi phát triển chậm, nghiên cứu của Rubio năm 2019 trên 1301 phôi nang ngày 6 - 7 từ 8 trung tâm IVF ở 4 châu lục khác nhau cho thấy độ nhạy xét nghiệm ở mỗi trung tâm dao động từ 76,5% đến 91,3% và độ đặc hiệu từ 64,7% đến 93,3%. Tỷ lệ âm tính giả là 8,3% và tỷ lệ

dương tính giả là 12,4%. Từ dữ liệu trên, những phôi phát triển chậm ngày 6, ngày 7 hoàn toàn có thể sử dụng để phân tích niPGT mà vẫn phản ánh chính xác tình trạng di truyền của phôi [23]. Thời gian thu nhận cf-DNA từ môi trường nuôi cấy phôi hay dịch khoang phôi đều nên tiến hành ở giai đoạn phôi nang ngày 5, hoặc kể cả giai đoạn ngày 6 - 7 đối với những phôi phát triển chậm.

### 3. BÀN LUẬN

Hiện nay, các kết quả nghiên cứu bước đầu cho kết quả khả quan khi so sánh với phương pháp PGT truyền thống. Phương thức thu nhận cf-DNA dễ dàng và giúp giảm bớt các tổn thương đối với phôi. Ngoài ra, trong các trường hợp phôi chất lượng kém không đạt tiêu chuẩn sinh thiết TE thì niPGT cho thấy rõ tiềm năng giúp tăng cơ hội có phôi hữu dụng cho bệnh nhân.

Tuy nhiên, yếu điểm lớn nhất hiện nay của niPGT là chưa có quy trình chuẩn hóa. Sự khác biệt về cỡ mẫu nghiên cứu, thể tích môi trường thu nhận, giai đoạn phát triển của phôi dẫn đến sự khác nhau về nồng độ cf-DNA và kết quả phân tích di truyền. Hầu hết các bộ khuếch đại WGA thương mại hiện nay được thiết kế phân tích cho thể tích mẫu nhỏ (thường < 10 $\mu$ l) nên nếu tăng lượng thể tích mẫu sẽ dẫn đến gia tăng chi phí và giảm hiệu quả phân tích, từ đó đặt ra thách thức trong việc lựa chọn thể tích mẫu [6]. Ngoài ra, sự khác biệt về nguồn gốc phôi tươi hay phôi đông lạnh có thể ảnh hưởng đến nồng độ cf-DNA. Theo tác giả Kuznyetsov (2018) thì sự thay đổi các yếu tố vật lý, hoá học của hoạt động trứ rã làm tăng sự chết theo chương trình của tế bào nên có thể tăng lượng cf-DNA được giải phóng vào môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, việc sử dụng phôi đông lạnh sẽ đặt thêm thách thức trong việc thiết kế quy trình nuôi cấy và thu nhận cf-DNA khi mà các dữ liệu trên phôi trữ còn hạn chế [23].

Các hiểu biết hiện nay về nguồn gốc cf-DNA trên phôi, cách thức thu nhận và phân tích vẫn còn đang được tìm hiểu dẫn đến chưa có một quy trình thống nhất. Các dữ liệu tiền lâm sàng hiện nay chắc chắn sẽ tiếp tục thúc đẩy sự quan tâm đến nguồn vật liệu di truyền này. Cần thực hiện nhiều nghiên cứu sâu hơn để có câu trả lời chính xác cho lĩnh vực tiềm năng này.

### 4. KẾT LUẬN

Xét nghiệm di truyền phôi tiền làm tổ không xâm lấn (niPGT) dựa trên cơ sở thu nhận, phân tích cf-DNA có trong dịch khoang phôi, môi trường nuôi cấy là hướng tiếp cận tiềm năng trong phân tích di truyền, cải thiện một số khiếm khuyết của PGT truyền thống. Nhiều nghiên cứu thực hiện niPGT cho thấy tỷ lệ tương đồng NST so với sinh thiết TE hoặc toàn bộ phôi cao. Tuy nhiên, vẫn còn tồn đọng một số khó khăn nhất định dẫn đến sự khác biệt dữ liệu ở một số nghiên cứu, đặt ra thách thức cần xây dựng quy trình thực hiện chuẩn để nâng cao hiệu quả.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Y. M. D. Lo et al., "Presence of fetal DNA in

maternal plasma and serum," *The Lancet*, vol. 350, no. 9076, pp. 485–487, Aug. 1997, doi: 10.1016/S0140-6736(97)02174-0.

[2]. H. Bolton et al., "Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential," *Nat Commun*, vol. 7, p. 11165, Mar. 2016, doi: 10.1038/ncomms11165.

[3]. P. Zhu et al., "Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos," *Nat Genet*, vol. 50, no. 1, pp. 12–19, Jan. 2018, doi: 10.1038/s41588-017-0007-6.

[4]. M. Qasemi, R. Mahdian, and F. Amidi, "Cell-free DNA discoveries in human reproductive medicine: providing a new tool for biomarker and genetic assays in ART," *J Assist Reprod Genet*, vol. 38, no. 2, pp. 277–288, Feb. 2021, doi: 10.1007/s10815-020-02038-4.

[5]. A. D'Alessandro, G. Federica, S. Palini, C. Bulletti, and L. Zolla, "A mass spectrometry-based targeted metabolomics strategy of human blastocoele fluid: a promising tool in fertility research," *Mol Biosyst*, vol. 8, no. 4, pp. 953–958, Apr. 2012, doi: 10.1039/c1mb05358b.

[6]. M. Leaver and D. Wells, "Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics?," *Human Reproduction Update*, vol. 26, no. 1, pp. 16–42, Jan. 2020, doi: 10.1093/humupd/dmz033.

[7]. C. Zong, S. Lu, A. R. Chapman, and X. S. Xie, "Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell," *Science*, vol. 338, no. 6114, pp. 1622–1626, Dec. 2012, doi: 10.1126/science.1229164.

[8]. S. Palini et al., "Genomic DNA in human blastocoele fluid," *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 26, no. 6, pp. 603–610, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.rbmo.2013.02.012.

[9]. L. Gianaroli et al., "Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study," *Fertil Steril*, vol. 102, no. 6, pp. 1692–1699.e6, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.08.021.

[10]. K. J. Tobler et al., "Blastocoele fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis," *Fertil Steril*, vol. 104, no. 2, pp. 418–425, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.04.028.

[11]. H. Wu et al., "Medium-Based Noninvasive Preimplantation Genetic Diagnosis for Human  $\alpha$ -Thalassemias-SEA," *Medicine (Baltimore)*, vol. 94, no. 12, Mar. 2015, doi: 10.1097/MD.0000000000000669.

[12]. W. Liu, J. Liu, H. Du, J. Ling, X. Sun, and D. Chen, "Non-invasive preimplantation aneuploidy screening and diagnosis of beta thalassemia IVSII654 mutation using spent embryo culture medium," *Ann Med*, vol. 49, no. 4, pp. 319–328, Jun. 2017, doi: 10.1080/07853890.2016.1254816.

[13]. A. Capalbo et al., "Diagnostic efficacy of blastocoele fluid and spent media as sources of DNA

for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions," *Fertility and Sterility*, vol. 110, no. 5, pp. 870-879.e5, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.05.031.

[14]. J. R. Ho et al., "Pushing the limits of detection: investigation of cell-free DNA for aneuploidy screening in embryos," *Fertility and Sterility*, vol. 110, no. 3, pp. 467-475.e2, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.03.036.

[15]. L. Huang, B. Bogale, Y. Tang, S. Lu, X. S. Xie, and C. Racowsky, "Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophectoderm biopsy," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 116, no. 28, pp. 14105–14112, Jul. 2019, doi: 10.1073/pnas.1907472116.

[16]. L. D. Vagnini et al., "Noninvasive preimplantation genetic test for aneuploidy (NIPGT-A) has a lower false positive rate than that of the invasive PGT-A," p. 1.

[17]. V. Kuznyetsov et al., "Evaluation of a novel non-invasive preimplantation genetic screening approach," *PLoS One*, vol. 13, no. 5, p. e0197262, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0197262.

[18]. P. Li et al., "Preimplantation Genetic Screening with Spent Culture Medium/Blastocoel Fluid for in Vitro Fertilization," *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 9275, Jun. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-27367-4.

[19]. J. Jiao et al., "Minimally invasive preimplantation genetic testing using blastocyst culture medium," *Human Reproduction*, vol. 34, no. 7, pp. 1369–1379, Jul. 2019, doi: 10.1093/humrep/dez075.

[20]. C. Farra, F. Choucair, and J. Awwad, "Non-invasive pre-implantation genetic testing of human embryos: an emerging concept," *Hum Reprod*, vol. 33, no. 12, pp. 2162–2167, Dec. 2018, doi: 10.1093/humrep/dey314.

[21]. M. I. Shamonki, H. Jin, Z. Haimowitz, and L. Liu, "Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media," *Fertility and Sterility*, vol. 106, no. 6, pp. 1312–1318, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.1112.

[22]. M. Lane et al., "Ability to detect aneuploidy from cell free DNA collected from media is dependent on the stage of development of the embryo," *Fertility and Sterility*, vol. 108, p. e61, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.07.192.

[23]. C. Rubio et al., "Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophectoderm biopsies from 1301 human blastocysts," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 223, no. 5, p. 751.e1-751.e13, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.ajog.2020.04.035.