

BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ CHẨN ĐOÁN DI TRUYỀN TIỀN LÀM TỔ TẠI BỆNH VIỆN PHỤ SẢN TRUNG ƯƠNG

Nguyễn Việt Tiến⁽¹⁾, Nguyễn Thị Minh⁽²⁾

(1) Trường Đại học Y Hà Nội, (2) Bệnh viện Phụ Sản Trung Ương

Tóm tắt

Mục tiêu: Bước đầu đánh giá kết quả kỹ thuật chẩn đoán di truyền tiền làm tổ áp dụng trên phôi của các bệnh nhân thụ tinh trong ống nghiệm tại Trung tâm Hỗ trợ Sinh sản bệnh viện Phụ Sản Trung ương. **Phương pháp:** nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 37 phôi của 11 bệnh nhân thụ tinh trong ống nghiệm áp dụng phương pháp chẩn đoán di truyền tiền làm tổ. Sinh thiết phôi được thực hiện trên phôi ngày 3. Sau khi cố định phôi bào, quá trình lai được thực hiện với các mẫu dò ADN bằng phương pháp FISH. Các tín hiệu từ kính hiển vi huỳnh quang của 5 nhiễm sắc thể (13, 18, 21 and X, Y) khảo sát được ghi nhận. **Kết quả:** Tỷ lệ phôi bất thường NST: 45,9%. Tỷ lệ bất thường dị bội ở cặp NST 21 là cao nhất: 40,93% và thấp nhất ở cặp NST giới tính và cặp NST 13: 13,63%. Tỷ lệ phôi phát triển thành phôi nang sau sinh thiết: 86,49%. Tỷ lệ có thai lâm sàng: 66,67% và tỷ lệ làm tổ: 40,9%. **Kết luận:** Tỷ lệ bất thường phôi khá cao trong số các phôi được chẩn đoán. Tỷ lệ làm tổ và tỷ lệ có thai đạt được khá cao khi chuyển các phôi bình thường. **Từ khóa:** chẩn đoán di truyền tiền làm tổ, FISH, tỷ lệ mang thai.

Abstract

THE FIRST STEP EVALUATION OF PREIMPLANTATION GENETIC SCREENING IN HUMAN EMBRYOS AT IVF CENTRE OF NHOG

Objective: first step evaluation of preimplantation genetic screening in human embryos at IVF center of NHOG. **Methods:** A cross sectional study of 11 women with 37 embryos underwent FISH-based PGD during IVF procedure. At day 3, one or two blastomeres were aspirated from each embryo. Biopsied blastomeres were examined using FISH analysis to screen out embryos with chromosomal abnormalities (5 chromosomes: 13, 18, 21 and X, Y). **Results:** There were 45,9% embryos with abnormal chromosomes. The highest abnormal chromosome rate was 21 (40,93%), the lowest rate were X,Y and 13 (13,63%). Blatulation rate: 86,49%. Pregnancy rate: 66,67%, implantation rate: 40,9%. **Conclusion:** A high incidence of chromosomal abnormalities has been observed in these patient groups. PGD has no influence on implantation and clinical pregnancy rate in IVF. **Key word:** PGD, FISH, abnormal chromosomes, pregnancy rate.

1. Đặt vấn đề

Sau 12 năm, từ khi em bé đầu tiên ra đời với phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm vào năm 1978 [1]. Đến năm 1990, kỹ thuật hỗ trợ sinh sản đã có một bước phát triển mới với sự thành công của kỹ thuật chẩn đoán di truyền tiền làm tổ (Pre-implantation Genetic Diagnosis – PGD) [2]. Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ là một kỹ thuật chủ động sàng lọc các bất thường di truyền của phôi trước khi chuyển phôi vào buồng tử cung. Do đó, tránh được phá thai vì lý do bất thường, làm ảnh hưởng đến thể chất và tinh thần của người mẹ. Kỹ thuật PGD còn mang ý nghĩa nhân đạo khi góp phần giảm thiểu trẻ dị tật bẩm sinh, giảm gánh nặng cho gia đình và xã hội. Ngày nay, cùng với sự phát triển của lĩnh vực di truyền, kỹ thuật PGD cho phép phân tích sâu hơn về di truyền của phôi, noãn bằng các kỹ thuật di truyền

như FISH (fluorescent in situ hybridization), phát hiện dị bội hoặc bất thường của một số nhiễm sắc thể, PCR (polymerase chain reaction) phát hiện một số gen gây bệnh, CGH (comparative genomic hybridization) phát hiện bất thường về số lượng hoặc cấu trúc của bộ nhiễm sắc thể. Một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy kỹ thuật PGD kết hợp với lựa chọn hình thái phôi giúp lựa chọn được phôi tốt có di truyền bình thường do đó làm tăng tỷ lệ làm tổ, tăng tỷ lệ có thai và tỷ lệ trẻ sinh sống trong thụ tinh trong ống nghiệm [3][4]. Hiện nay, một số trung tâm hỗ trợ sinh sản lớn trên thế giới thực hiện kỹ thuật chẩn đoán di truyền tiền làm tổ thường quy cho các bệnh nhân thụ tinh trong ống nghiệm. Tại Việt Nam, Trung tâm Hỗ trợ Sinh sản bệnh viện Phụ sản Trung ương là nơi đầu tiên triển khai kỹ thuật này. Mặc dù, trung tâm đã nghiên cứu hoàn thiện quy trình trong năm 2012, đến 10/2013

mới ứng dụng trên bệnh nhân. Mục tiêu nghiên cứu: Bước đầu đánh giá kết quả kỹ thuật chẩn đoán di truyền tiền làm tổ áp dụng trên phôi của các bệnh nhân thụ tinh trong ống nghiệm tại Trung tâm Hỗ trợ Sinh sản bệnh viện Phụ sản Trung ương.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu: là 37 phôi của 11 bệnh nhân được làm thụ tinh trong ống nghiệm, áp dụng phương pháp chẩn đoán di truyền tiền làm tổ.

2.2 Phương pháp nghiên cứu: Phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang

2.3 Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm Hỗ trợ Sinh sản Bệnh viện Phụ sản Trung ương

2.4 Thời gian: từ tháng 10/2013 – 2/2014

2.5 Phương pháp tiến hành :

- Bệnh nhân dùng thuốc kích thích buồng trứng, theo dõi sự phát triển của nang noãn bằng siêu âm và tiêm thuốc kích thích phóng noãn, chọc hút noãn

- Noãn sau khi thu hoạch được ủ trong tủ nuôi cấy CO2 6 %, nhiệt độ 370 sau 2 – 4 giờ thực hiện kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI)

- Nuôi phôi đến ngày thứ 3 sau ICSI (62 – 67 giờ), lựa chọn các phôi có 6, 8 phôi bào, các phôi bào đồng đều, mảnh vỡ bào tương < 20 %, độ chiết quang sáng.

- Tiến hành sinh thiết phôi bằng môi trường PGD pha với HAS đã chuẩn bị sẵn.

- + Lựa chọn phôi bào có nhân, giữ phôi bào cần sinh thiết ở vị trí 1 – 5 giờ

- + Tạo lỗ thủng trên màng zona 40 μm cạnh phôi bào cần sinh thiết

- + Kim sinh thiết tiếp cận phôi bào cần sinh thiết qua lỗ thủng, hút phôi bào từ từ tránh bị vỡ phôi bào

- Phôi sau khi sinh thiết được cho vào môi trường nuôi phôi nang đã chuẩn bị sẵn có đánh số thứ tự phôi theo số thứ tự phôi bào được sinh thiết từ phôi đó

- Phôi bào sau khi sinh thiết sẽ được cố định trên lam kính có ghi tên mã số bệnh nhân và số thứ tự khớp với số thứ tự của giọt nuôi phôi.

- Áp dụng kỹ thuật FISH với kit lai MultiVysion trong đó tín hiệu huỳnh quang màu xanh (green) hiển thị cho NST 21; đỏ (red) hiển thị cho NST 13; màu xanh dương (Aqua) hiển thị cho NST 18; màu xanh nước biển (blue) hiển thị cho NST X và màu vàng (gold) hiển thị cho NST Y.

- Ngày thứ 5 sau chọc hút noãn, khi có kết quả phân tích di truyền của các phôi bào và dựa vào hình thái của phôi tương ứng sẽ lựa chọn 2 phôi tốt để chuyển phôi.

- Đánh giá hình thái phôi ngày 5 dựa vào số lượng

tế bào nụ phôi, số lượng tế bào lá nuôi phôi, độ lớn khoang dịch và độ nở rộng của phôi.

3. Kết quả và bàn luận

Bảng 1. Nhóm bệnh nhân nghiên cứu

Đặc điểm	Chỉ số
Tuổi trung bình	32,14
Thai sảy, lưu nhiều lần	8 (8/11)
IVF thất bại nhiều lần	1(1/11)
Tiền sử sinh con dị tật	1(1/11)
Lớn tuổi (> 40 tuổi)	1(1/11)
Tổng	11

Tổng số có 37 phôi của 11 bệnh nhân tiến hành làm PGD, phân tích di truyền bằng kỹ thuật FISH với 5 nhiễm sắc thể 13,18, 21 X và Y. tỷ lệ phôi lệch bội khá cao chiếm tới 45,9% trong tổng số các phôi được chẩn đoán.

Bảng 2. Kết quả phân tích di truyền

Kết quả di truyền	Số phôi	Tỷ lệ
Bất thường	17	45,9 %
Bình thường	20	54,1 %
Tổng	37	100 %

Trong 17 phôi bất thường dị bội về 4 cặp nhiễm sắc thể nói trên, xuất hiện nhiều nhất ở nhiễm sắc thể 21, sau đó là nhiễm sắc thể 18 và ít xuất hiện hơn ở nhiễm sắc thể 13 và nhiễm sắc thể giới tính. Trong nghiên cứu này có một phôi có thể xuất hiện nhiều đột biến dị bội ở các cặp nhiễm sắc thể khác nhau và các cặp nhiễm sắc thể đó có thể ở dạng tam bội hoặc đơn bội.

Bảng 3. Tỷ lệ bất thường dị bội ở các cặp nhiễm sắc thể

Cặp nhiễm sắc thể	Số lượng	Tỷ lệ
Cặp nhiễm sắc thể 13	3	13,63 %
Cặp nhiễm sắc thể 18	7	31,81 %
Cặp nhiễm sắc thể 21	9	40,93 %
Cặp nhiễm sắc thể giới tính	3	13,63 %
Tổng	22	100 %

Tỷ lệ phôi phát triển thành phôi nang trong số các phôi bình thường trong nghiên cứu chúng tôi tương đối cao chiếm 86,49% tổng số phôi

Bảng 4. Tỷ lệ phôi phát triển thành phôi nang

Hình thái phôi	Chỉ số
Phôi nang	32 (86,49 %)
Phôi không hình thành phôi nang	5 (13,51 %)
Tổng	37 (100 %)

Trong số 11 bệnh nhân được chẩn đoán PGD, có 2 bệnh nhân phôi bất thường hoàn toàn do đó không chuyển phôi. Tỷ lệ thai lâm sàng trong nghiên cứu này đạt 66,7%, tỷ lệ làm tổ đạt 40,9%

Bảng 5. Tỷ lệ có thai và làm tổ

Chỉ số	Số lượng	Tổng
Số phôi chuyển trung bình	2,4	22
βhCG dương tính	7 (77,78 %)	9 (100 %)
Có thai lâm sàng	6 (66,67 %)	9 (100 %)
Làm tổ	9 (40,9 %)	22 (100 %)

4. Bàn luận

Tổng số 11 bệnh nhân thực hiện kỹ thuật PGD tại trung tâm chúng tôi, các bệnh nhân này đều có tiền sử sảy thai, thai lưu nhiều lần không rõ nguyên nhân hoặc bệnh nhân lớn tuổi. Đặc điểm của các bệnh nhân được trình bày theo bảng 1.

Tổng số có 37 phôi của 11 bệnh nhân tiến hành làm PGD, phân tích di truyền bằng kỹ thuật FISH với 5 nhiễm sắc thể 13,18, 21 X và Y. Chúng tôi nhận thấy tỷ lệ phôi lệch bội khá cao chiếm tới 45,9% trong tổng số các phôi được chẩn đoán (Bảng 2). Kết quả nghiên cứu này tương đương với nghiên cứu của Munné và cộng sự năm 2007 thực hiện trên 6000 phôi cho thấy tỷ lệ các phôi có hình thái tốt ở giai đoạn phân chia có tỷ lệ bất thường về nhiễm sắc thể 56% đối với bệnh nhân nữ dưới 35 tuổi. Tác giả cũng nhận thấy tỷ lệ phôi bất thường tăng dần theo độ tuổi của người phụ nữ [5].

Trong 17 phôi bất thường dị bội về 4 cặp nhiễm sắc thể nói trên, xuất hiện nhiều nhất ở nhiễm sắc thể 21, sau đó là nhiễm sắc thể 18 và ít xuất hiện hơn ở nhiễm sắc thể 13 và nhiễm sắc thể giới tính. Trong nghiên cứu này chúng tôi thấy một phôi có thể xuất hiện nhiều đột biến dị bội ở các cặp nhiễm sắc thể khác nhau và các

cặp nhiễm sắc thể đó có thể ở dạng tam bội hoặc đơn bội (Bảng 3). Theo nghiên cứu của Munne, Sandalinas và Cohen thực hiện trên 1600 phôi cho thấy hầu hết các dị bội nhiễm sắc thể thường xuất hiện ở các cặp nhiễm sắc thể 21, 22, 16, 15 trong khi các cặp nhiễm sắc thể giới tính, 13, 18 ít gặp hơn [6].

Tỷ lệ phôi phát triển thành phôi nang trong số các phôi bình thường trong nghiên cứu chúng tôi tương đối cao chiếm 86,49% tổng số phôi (Bảng 3). Tuy nhiên cỡ mẫu còn ít nên cần tiến hành nghiên cứu thêm để có số liệu đánh giá chính xác hơn. Theo Jones và cộng sự, tỷ lệ phát triển thành phôi nang là 51% khi nghiên cứu các bệnh nhân dưới 40 tuổi [7].

Trong số 11 bệnh nhân được chẩn đoán PGD, có 2 bệnh nhân phôi bất thường hoàn toàn do đó không chuyển phôi. Tỷ lệ thai lâm sàng trong nghiên cứu này đạt 66,7%, tỷ lệ làm tổ đạt 40,9% (bảng 4). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với nghiên cứu của Jones [7]. Theo Munne và cộng sự năm 2003 cho thấy tỷ lệ làm tổ trong nhóm bệnh nhân PGD tăng có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng [8].

5. Kết luận

Bước đầu nghiên cứu 37 phôi của 11 bệnh nhân có tiền sử hướng tới nguy cơ bất thường nhiễm sắc thể chúng tôi đưa ra một số kết luận sau:

- Tỷ lệ bất thường phôi khá cao (45,9%) trong số các phôi được chẩn đoán
- Tỷ lệ βhCG, tỷ lệ làm tổ và tỷ lệ có thai đạt được khá cao khi chuyển các phôi bình thường.

Tài liệu tham khảo

1. Brian Dale and Kay Elder. Preface. In text book of Invitro Fertilization, printed in the United Kingdom at the University Press. Cambridge Typeset in 11/14 Monotype Times. 1997;
2. Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ et al. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. N. Engl. J. Med. 1992; 327 (13): 905–9.
3. Chen, MD, Harold. Introduction to Trisomy 18. EMedicine. Retrieved , 2008; 07- 24.
4. Opitz John M., Gilbert-Barness Enid F. Reflections on the Pathogenesis of Down Syndrome". American Journal of Medical Genetics 7: 38–51
5. Munné, SerenaC, CollsP, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities

in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online*; 2007; 14 : 628–34.

6. Munne, Sandalinas M and Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. In textbook of Assisted Reproductive Techniques Laboratory and Clinical Perspectives (Eds) Gardner DK, Weissman A, Howles CM and Shoham Z. 2001; pp 297-318. London: Martin Dunitz Ltd

7. Jones GM, Trounson AO, Lolatgis N et al. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. 1998;

8. Munne, Sandalinas M, Escudero T et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* in press. 2003 ;