

KẾT QUẢ ÁP DỤNG QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC LÀM TỔ BỆNH HEMOPHILIA A

*Nguyễn Minh Tâm¹, Nguyễn Duy Bắc¹
Nguyễn Thanh Tùng², Đặng Tiến Trường¹*

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá kết quả áp dụng quy trình xét nghiệm di truyền trước làm tổ ở các gia đình mang gen bệnh Hemophilia A. **Đối tượng và phương pháp:** Sử dụng kỹ thuật phân tích di truyền liên kết để xét nghiệm di truyền trước làm tổ ở 16 gia đình mang gen bệnh Hemophilia A được tạo phôi và sinh thiết phôi tại Bệnh viện Nam học và Hiếm muộn Hà Nội, từ tháng 9/2018 - 12/2021. **Kết quả:** Trong 117 phôi túi của 16 cặp vợ chồng được phân loại theo hình thái có 85 phôi tốt (72,65%), 30 phôi trung bình (25,64%), 2 phôi kém (1,71%). Trong 115 phôi thuộc loại tốt và trung bình được sinh thiết và xét nghiệm di truyền có 70 phôi bình thường (60,87%), 26 phôi dị hợp tử mang gen bệnh (22,61%) và 19 phôi bị bệnh (16,52%). **Kết luận:** Chẩn đoán thành công tình trạng mang gen bệnh Hemophilia A của 115 phôi ở 16 cặp vợ chồng tham gia nghiên cứu.

* *Từ khóa:* Xét nghiệm di truyền trước làm tổ; Hemophilia A.

RESULTS OF APPLICATION OF PRE-IMPLANTATION GENETIC TESTING FOR HEMOPHILIA A

Summary

Objectives: To evaluate the results of applying the pre-implantation genetic testing in families carrying the Hemophilia A gene. **Subjects and methods:** Using linkage genetic analysis technique for pre-implantation genetic testing of 16 families with Hemophilia A gene who were performed embryogenation and embryo biopsy at the Andrology and Fertility Hospital of Hanoi, from September 2018 to December 2021. **Results:** 117 blastocysts of 16 couples classified according to morphology included 85 good embryos (72.65%), 30 fair embryos (25.64%),

¹Học viện Quân y

²Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội

Người phản hồi: Nguyễn Duy Bắc (nguyenduybac@vmmu.edu.com)

Ngày nhận bài: 18/5/2022

Ngày được chấp nhận đăng: 31/5/2022

<http://doi.org/10.56535/jmpm.V2022050804>

2 poor embryos (1.71%). Among 115 embryos of a good and fair type which were performed a biopsy and genetic diagnosis, there were 70 normal embryos (60.87%), 26 carried embryos (22.61%), and 19 disease affected embryos (16.52%). **Conclusion:** Hemophilia A gene carrier status was successfully diagnosed in 115 embryos of 16 couples participating in the study.

* *Keywords: Pre-implantation genetic testing; Hemophilia A.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hemophilia A là bệnh rối loạn đông máu di truyền liên kết nhiễm sắc thể X, do đột biến gen *F8*, giảm yếu tố VIII, gây chảy máu khó đông, có thể dẫn tới tử vong. Trên thế giới, tỷ lệ mắc bệnh khoảng 1/5.000 ở nam giới. Điều trị bệnh Hemophilia A chủ yếu bằng truyền máu tươi hoặc yếu tố VIII nên chi phí điều trị rất cao và không giải quyết được nguyên nhân mắc bệnh. Vì vậy, việc dự phòng sinh con không mang bệnh hoặc không mang gen là rất cần thiết.

Kỹ thuật chẩn đoán trước sinh giúp tránh được sinh con bị bệnh bằng việc chọc ối ở thời điểm thai 16 tuần tuổi. Tuy nhiên, cặp vợ chồng mang gen phải đối mặt với nguy cơ đình chỉ thai khi thai nhi bị bệnh. Để khắc phục hạn chế này, xét nghiệm di truyền trước làm tổ (Pre-implantation Genetic Testing - PGT) được ưu tiên sử dụng. Xét nghiệm di truyền trước làm tổ là sự kết hợp giữa kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm (In Vitro Fertilization - IVF) tạo phôi với việc xét nghiệm di truyền nhằm lựa chọn phôi không bị

bệnh. Việc lựa chọn trên nhiều phôi giúp khả năng chọn được phôi và mang thai không bị bệnh cao hơn nhiều việc chỉ lựa chọn trên một thai nhi trong chẩn đoán trước sinh.

Gen *F8* lớn, tổn thương trong bệnh Hemophilia A phức tạp nên khó có một kỹ thuật xác định trực tiếp các đột biến gen *F8* trên tế bào phôi. Các trình tự lặp ngắn (Short Tandem Repeat - STR) phục vụ xét nghiệm di truyền trước làm tổ phải có tính dị hợp tử cao và nằm gần gen tổn thương để đảm bảo tính liên kết. Ở Việt Nam, có rất ít nghiên cứu về xây dựng và áp dụng quy trình xét nghiệm di truyền trước làm tổ bệnh Hemophilia A dựa trên phân tích liên kết gen. Chúng tôi đã thiết kế thành công bộ chỉ thị STR và xây dựng kỹ thuật Multiplex - PCR khuếch đại 13 chỉ thị STR trên các mẫu tế bào phôi ứng dụng trong xét nghiệm di truyền trước làm tổ bệnh Hemophilia A [1]. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm: *Đánh giá kết quả áp dụng quy trình xét nghiệm di truyền trước làm tổ ở các gia đình mang gen bệnh Hemophilia A.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

16 gia đình mang gen bệnh Hemophilia A tình nguyện tham gia điều trị tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Nam học và Hiếm muộn Hà Nội từ tháng 9/2018 - 12/2021.

Mẫu máu của các thành viên trong gia đình (bố, mẹ, con hoặc người thân) và mẫu phôi sử dụng cho xét nghiệm được cung cấp tại Bệnh viện.

Các cặp vợ chồng tham gia nghiên cứu cần thỏa mãn tiêu chuẩn sau:

** Tiêu chuẩn lựa chọn:*

- Mang gen F8 bị tổn thương.
- Cơ quan sinh sản bình thường về giải phẫu và chức năng.
- Người vợ trong độ tuổi sinh đẻ.
- Khi thực hiện IVF có ít nhất 1 phôi ngày 5 sinh thiết được.
- Tình nguyện tham gia nghiên cứu.

** Tiêu chuẩn loại trừ:*

- Không thực hiện theo hướng dẫn của bác sĩ và nghiên cứu.
- Không đủ hồ sơ nghiên cứu hỗ trợ sinh sản.

2. Phương pháp nghiên cứu

** Thiết kế nghiên cứu:* Phương pháp nghiên cứu mô tả.

** Quy trình xét nghiệm di truyền trước làm tổ:*

- Tiến hành IVF: Kích thích buồng trứng sử dụng phác đồ Antagonist, chọc hút noãn, tạo phôi, nuôi phôi đến giai đoạn phôi túi, sinh thiết phôi, đông lạnh phôi túi bằng kỹ thuật thủy tinh hóa theo phương pháp Cryotop của Massashige Kuwayama (2005).

- Tiến hành quy trình xét nghiệm di truyền trước làm tổ ở các gia đình mang gen bệnh Hemophilia A: Khuếch đại bộ chỉ thị gồm 13 STR theo quy trình đã thiết lập [1] và thực hiện phân tích di truyền liên kết để chẩn đoán tình trạng mang gen bệnh của phôi.

** Chỉ tiêu nghiên cứu:*

- Một số đặc điểm lâm sàng và điều trị của người vợ: Nồng độ Anti-Mullerian Hormone - AMH (ng/mL); số lượng nang noãn thứ cấp siêu âm ngày 2 chu kỳ kinh (Antral Follicle Count - AFC); liều hormone kích thích tạo nang trứng (Follicle Stimulating Hormone - FSH (IU/ngày); số ngày sử dụng FSH kích thích buồng trứng; nồng độ estradiol - E2 (pg/mL) ngày cho thuốc gây trưởng thành noãn và rụng trứng; Tỷ lệ quá kích buồng trứng.

- Số noãn chọc hút được; số noãn trưởng thành, tỷ lệ noãn trưởng thành (MII); số noãn thụ tinh; tỷ lệ thụ tinh; số phôi túi tạo được; tỷ lệ phôi túi tạo được.

- Phân loại phôi túi dựa trên tiêu chuẩn đồng thuận Alpha của Hiệp hội ESHRE (2011) [2]:

Bảng 1: Phân loại phôi túi.

Phân loại	Mô tả
Tốt	Phôi có mức độ giãn rộng ≥ 3 , phân loại nụ phôi và tế bào lá nuôi: AA, AB, BA
Trung bình	Phôi có mức độ giãn rộng ≥ 3 , phân loại nụ phôi và tế bào lá nuôi: BB, AC, BC
Xấu	Phôi có mức độ giãn rộng < 3 hoặc ≥ 3 , phân loại nụ phôi và tế bào lá nuôi: CB, CC

(* Nguồn: ESHRE 2011 [2])

- Phân loại phôi theo tình trạng tổn thương gen F8: Phôi bình thường; phôi mang gen; phôi bị bệnh.

* *Xử lý số liệu*: Dựa trên phần mềm SPSS 16.0.

* *Đạo đức trong nghiên cứu*: Nghiên cứu được chấp thuận bởi Hội đồng Y đức trong nghiên cứu y sinh học - Học viện Quân y. Đối tượng nghiên cứu có nhu cầu điều trị, xét nghiệm hoàn toàn tự nguyện, được cung cấp đầy đủ thông tin và tư vấn di truyền trước khi tham gia. Các nguyên tắc về y đức được đảm bảo thực hiện nghiêm túc.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Bảng 1: Một số đặc điểm lâm sàng và điều trị của người vợ.

Một số đặc điểm lâm sàng và điều trị của người vợ	$\bar{X} \pm SD$ (n = 16)	Min - max
AMH (ng/mL)	3,06 \pm 2,21	0,65 - 8,51
AFC (nang thứ cấp siêu âm ngày 2 chu kỳ)	10,31 \pm 6,99	3 - 26
Liều FSH (IU/ngày)	260,94 \pm 46,52	150 - 300
Số ngày sử dụng FSH kích thích buồng trứng	9,56 \pm 0,63	9 - 11
E2 (pg/mL) ngày cho thuốc gây trưởng thành noãn và rụng trứng	3.902,75 \pm 2001,04	1.107 - 9.057
Tỷ lệ quá kích buồng trứng	Không có trường hợp nào	

Nồng độ AMH trung bình $3,06 \pm 2,21$ ng/mL và AFC trung bình $10,31 \pm 6,99$ nang. Liều FSH trung bình kích thích buồng trứng $260,94 \pm 46,52$ IU/ngày với số ngày sử dụng là $9,56 \pm 0,63$ ngày. Nồng độ estrogen trong huyết thanh tại ngày tiêm thuốc gây trưởng thành noãn và rụng trứng là $3.902,75 \pm 2001,04$ pg/mL. Không có trường hợp xuất hiện quá kích buồng trứng.

Bảng 2: Kết quả thu nhận phôi từ bệnh nhân.

Kết quả thu nhận phôi	Trung bình/tỷ lệ	Min - max
Số noãn chọc hút được (244 noãn)	$15,25 \pm 8,69$	6 - 34
Tỷ lệ noãn trưởng thành (MII)	210/244 (86,07%)	
Noãn trưởng thành (MII) (210 noãn)	$13,13 \pm 7,54$	5 - 28
Số noãn thụ tinh trung bình (155 noãn thụ tinh bình thường)	$9,69 \pm 5,78$	3 - 19
Tỷ lệ thụ tinh (%)	155/210 (73,81%)	
Số phôi túi trung bình (86 phôi túi)	$7,31 \pm 4,69$	2 - 17
Tỷ lệ phôi túi tạo được (%)	117/155 (75,48%)	

Sau khi thực hiện kích trứng, tổng số noãn thu được từ bệnh nhân tham gia nghiên cứu là 244, trong đó có 210 noãn (86,07%) tới được giai đoạn trưởng thành, trung bình mỗi bệnh nhân có số noãn trưởng thành là $13,13 \pm 7,54$. Trong số 210 noãn trưởng thành, có 155 noãn (73,81%) thụ tinh thành công, trung bình mỗi bệnh nhân có noãn được thụ tinh $9,69 \pm 5,78$. Số phôi túi trung bình là $7,31 \pm 4,69$, tỷ lệ phôi túi tạo được là 75,48%.

Bảng 3: Phân loại chất lượng phôi túi dựa trên tiêu chuẩn đồng thuận Alpha.

Chất lượng phôi túi	Số lượng phôi	Tỷ lệ (%)
Phôi tốt	85	72,65
Phôi trung bình	30	25,64
Phôi kém	2	1,71
Tổng	117	100

Trong 117 phôi túi tạo được, có 85 phôi loại tốt (72,65%), 30 phôi trung bình (25,64%), 2 phôi kém (1,71%). 115 phôi loại tốt và trung bình được tiến hành sinh thiết để xét nghiệm di truyền.

16 cặp vợ chồng có tất cả 117 phôi túi. Tuy nhiên, 2 phôi túi không có nụ phôi nên không đủ tiêu chuẩn sinh thiết để sàng lọc phôi. Do đó, chỉ có 115 phôi được sinh thiết để chẩn đoán tổn thương gen *F8*.

Bảng 4: Phân loại phôi theo tổn thương di truyền.

Phân loại	Số lượng phôi	Tỷ lệ so với tổng số phôi (%)	Tỷ lệ chẩn đoán thành công (%)
Số phôi bị bệnh	19	16,52	100
Số phôi mang gen bệnh	26	22,61	100
Số phôi bình thường	70	60,87	100
Tổng	115	100	100

Trong 115 phôi được xét nghiệm di truyền, có 70 phôi không tổn thương gen *F8* (60,87%), 26 phôi dị hợp tử có tổn thương gen *F8* (22,61%) và 19 phôi bị bệnh do có tổn thương gen *F8* (16,52%).

BÀN LUẬN

Các trường hợp Hemophilia A là do hơn 2.000 đột biến khác nhau gây ra. Có khoảng 45 - 50% trường hợp Hemophilia A nặng do đảo đoạn intron 22 hoặc intron 1 của gen *F8* [3]. Hiện tại không thể phát hiện trực tiếp các đột biến đảo đoạn từ một số tế bào nên xét nghiệm bằng phương pháp gián tiếp thông qua phân tích di truyền liên kết là lựa chọn khả thi duy nhất khi tiến hành PGT-M cho loại đột biến này. Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào sử dụng bộ chỉ thị 13 STR có chỉ số dị hợp tử cao (> 0,5) [4] và nằm gần gen *F8* (khoảng cách tới gen *F8* < 1 Mb), đảm bảo di truyền liên kết chặt chẽ -

theo khuyến cáo của ESHRE [5] để tiến hành PGT-M ở các gia đình mang gen Hemophilia A như trong nghiên cứu của chúng tôi. Phương pháp chúng tôi sử dụng có nhiều ưu điểm như có thể giúp kiểm soát tốt hiện tượng khuếch đại hỏng alen (Allele Dropout) và hiện tượng ngoại nhiễm vật liệu di truyền.

Khác với nghiên cứu của Bùi Thị Minh Phượng (2019) [6], ngoài việc phân tích liên kết gen dựa trên mẫu mẹ, mẫu con, mẫu phôi để đối chiếu sự di truyền của các alen bệnh, chúng tôi phân tích đồng thời thêm mẫu bố. Việc phân tích này giúp tăng cường khả năng kiểm soát ngoại nhiễm và ADO.

Hơn nữa, mẫu bố được đưa vào phân tích di truyền liên kết có thể mở rộng khả năng thực hiện PGT-M cho những cặp vợ chồng chưa có con đầu lòng, hoặc con đầu lòng không bị bệnh, con đầu lòng là nữ mang gen hoặc con đầu lòng là nữ khỏe mạnh.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, trong 117 phôi túi tạo được có 85 phôi loại tốt (72,65%), 30 phôi trung bình (25,64%), 2 phôi kém (1,71%). 115 phôi loại tốt và trung bình được tiến hành sinh thiết để xét nghiệm di truyền. Chúng tôi không tiến hành PGT-M trên những phôi có chất lượng thấp để tránh tổn kém cho bệnh nhân do kết quả chuyển phôi của những phôi có chất lượng kém là rất thấp. Trong 115 phôi được xét nghiệm di truyền, có 70 phôi (60,87%) không tổn thương gen *F8*, 26 phôi (22,61%) dị hợp tử có tổn thương gen *F8* và 19 phôi (16,52%) bị bệnh do có tổn thương gen *F8*. Như vậy, có 60,87% phôi nang không mang gen bệnh có thể chuyển phôi.

Kết quả nghiên cứu của Bùi Thị Minh Phượng ghi nhận tổng số 75 phôi ngày 3 được sinh thiết làm xét nghiệm di truyền, trong đó 26 phôi (34,7%) phát hiện mang đột biến gen gây bệnh Hemophilia A; 49 phôi (65,3%) có kiểu hình bình thường; gồm phôi nam,

nữ bình thường và phôi nữ mang gen. 49 phôi này tiếp tục được nuôi cấy đến giai đoạn phôi nang để đánh giá sự phát triển phôi sau sinh thiết và lựa chọn cấy vào tử cung của mẹ. Trong đó, 35 phôi (46,7%) phát triển đến giai đoạn phôi nang, 14 phôi (18,6%) không tiếp tục phát triển thành phôi nang [6].

Như vậy, tỷ lệ phôi nang không mang gen bệnh có thể chuyển trong nghiên cứu của chúng tôi (60,87%) cao hơn nghiên cứu của Bùi Thị Minh Phượng (46,7%) [6]. Sự khác nhau này được giải thích do trong nghiên cứu của tác giả, phôi được sinh thiết chẩn đoán là phôi ngày 3, còn trong nghiên cứu của chúng tôi là phôi nang ngày 5. Phôi ngày 3 sau sinh thiết có khả năng sống thấp hơn phôi ngày 3 không sinh thiết, nên tỷ lệ phát triển từ phôi ngày 3 đến phôi ngày 5 thấp hơn so với tỷ lệ phôi để đến ngày 5 mới sinh thiết. Sinh thiết phôi ngày 5 còn có ưu điểm là có nhiều tế bào có thể sinh thiết hơn để phục vụ chẩn đoán.

Qua kết quả thu được, nghiên cứu của chúng tôi đã giúp lựa chọn các phôi không mang gen bệnh để chuyển vào tử cung của mẹ, từ đó giảm nguy cơ đình chỉ thai, giảm gánh nặng về tâm lý, bảo vệ sức khỏe của phụ nữ và giảm gánh nặng cho y tế.

KẾT LUẬN

Chẩn đoán thành công tình trạng mang gen bệnh Hemophilia A của 115 phôi ở 16 cặp vợ chồng tham gia nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyen Minh Tam, Nguyen Duy Bac, Nguyen Thanh Tung, Dang Tien Truong (2021). Establishment of multiplex PCR of 13 STR markers on embryonic cell samples for PGT-M Hemophilia A. *Journal of Military Pharmaco - Medicine*; 9: 206-212.

2. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryo (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment proceedings of an expert

meeting. *Human Reproduction*; 26(6): 1270-1283.

3. Konkle B.A., Huston H., Nakaya Fletcher S. Hemophilia A [cited 1993-2022; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1404/>].

4. Zhao M., et al. (2017). Single-tube tetradecaplex panel of highly polymorphic microsatellite markers < 1 Mb from F8 for simplified preimplantation genetic diagnosis of hemophilia A. *J Thromb Haemost*; 15(7): 1473-1483.

5. Carvalho F., Coonen E., Goossens V. et al. (2020). ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT. *Human Reproduction Open*. p. hoaa021.