

KHẢO SÁT TỶ LỆ PHÁT TRIỂN PHÔI NANG, PHÔI PHÂN CẮT TRONG ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY PHÔI ĐƠN GIỌT PHỤC VỤ CHẨN ĐOÁN DI TRUYỀN TIỀN LÀM TỔ KHÔNG XÂM LẤN

*Hoàng Văn Ái¹, Trịnh Thế Sơn¹, Đặng Tiến Trường²
Nguyễn Thanh Tùng¹, Quản Hoàng Lâm¹
Nguyễn Thực Anh¹, Lê Thanh Huyền¹*

TÓM TẮT

Mục tiêu: Khảo sát tỷ lệ phát triển phôi nang, phôi phân cắt trong điều kiện nuôi cấy phôi đơn giọt phục vụ chẩn đoán di truyền tiền làm tổ không xâm lấn. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu quan sát mô tả cắt ngang trên 14 cặp vợ chồng có chỉ định PGT-A từ 3 - 11/2020 tại Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội. Nuôi cấy phôi theo quy trình nuôi cấy đơn giọt. **Kết quả:** Tuổi trung bình $35,71 \pm 3,17$, AMH trung bình $2,32$ ng/ml, số nang thứ cấp trung bình: $12,07 \pm 4,12$, tổng liều FSH dùng trong chu kỳ kích thích buồng trứng có kiểm soát: $2.578,57 \pm 483,66$ IU, thời gian dùng FSH trung bình trong chu kỳ IVF: $10,14 \pm 1,1$ ngày, số phức hợp noãn nang chọc hút được trung bình: $8,5 \pm 4,55$. Số noãn sau tách trung bình: $8,07 \pm 3,87$, noãn MII: $7,14 \pm 3,63$. Hợp tử 2PN trung bình: $5,21 \pm 2,94$, tỷ lệ noãn MII trung bình: $89,84 \pm 14,73\%$. Tỷ lệ thụ tinh: $73 \pm 18\%$, tỷ lệ phôi phân cắt ngày 3: $98,41 \pm 4,03\%$, tỷ lệ phôi nang: $58,08 \pm 27,8\%$. **Kết luận:** Việc nuôi cấy phôi đơn giọt có thể được tiến hành để phục vụ xét nghiệm di truyền tiền làm tổ không xâm lấn.

* Từ khóa: Nuôi cấy phôi đơn giọt; Thụ tinh ống nghiệm; niPGT; Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ không xâm lấn.

Investigation of Cleavage Rate and Blastulation Rate in Individual Embryo Culture for Non-invasive Pre-implantation Genetic Test

Summary

Objectives: To investigate the embryo's development blastulation rate in individual embryo culture (single-droplet for each embryo) for non-invasive pre-implantation genetic test.

Materials and methods: A cross-sectional descriptive observational study on 14 couples with indication of PGT-A from March 2020 to November 2020 at the Military of Institute Clinical Embryology and Histology. The embryos were cultured using a single-drop culture procedure.

¹Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội, **Học viện Quân y**

²Bộ môn Giải phẫu, **Học viện Quân y**

Người phản hồi: *Trịnh Thế Sơn* (trinhttheson@vmmu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 25/02/2021

Ngày bài báo được đăng: 28/4/2021

Results: Mean age was 35.71 ± 3.17 , mean AMH level was 2.32 ng/mL , mean number of antral follicle count was 12.07 ± 4.12 . Total FSH dose used in controlled ovarian stimulation cycle was $2,578.57 \pm 483.66 \text{ IU}$, mean time of FSH administration was $10.14 \pm 1.1 \text{ days}$, average number of aspirated oocyte corona complexes was 8.5 ± 4.55 . Mean number of oocytes after denudation was 8.07 ± 3.87 . MII oocyte was 7.14 ± 3.63 . Mean 2PN zygote was 5.21 ± 2.94 . Mean MII oocyte rate was $89.84 \pm 14.73\%$. The fertilization rate was $73.0 \pm 18\%$, day-3 cleavage embryo rate was $98.41 \pm 4.03\%$, blastulation rate was $58.08 \pm 27.8\%$. **Conclusion:** Single-drop embryo culture might be performed in non-invasive pre-implantation genetic testing.

* **Keywords:** Single-drop embryo culture; Individual embryo culture; In vitro fertilization; niPGT; Non-invasive pre-implantation genetic testing.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, xét nghiệm di truyền tiền làm tổ là xu hướng mới trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản. Đây là kỹ thuật chẩn đoán di truyền nhằm loại trừ những phôi bất thường về mặt di truyền trước khi cấy vào buồng tử cung người mẹ mà không cần sinh thiết. Các phương pháp thu thập mẫu xét nghiệm di truyền tiền làm tổ bao gồm: Sinh thiết thể cực, sinh thiết tế bào phôi của phôi phân cắt, sinh thiết tế bào lá nuôi của phôi nang. Để thu thập được các mẫu này, cần có một tác động cơ học (dùng kim đục thủng, hút và kéo), hoặc tác động hóa học (sử dụng acid tyrode làm thủng màng trong suốt), hoặc tác động vật lý (sử dụng laser hồng ngoại). Một số nghiên cứu cho rằng các tác động này gây ảnh hưởng đến sự phát triển phôi, tỷ lệ làm tổ và tỷ lệ trẻ sinh sống. Nghiên cứu của Kim (2012) cho thấy acid tyrode làm tỷ lệ thai lâm sàng, thai diễn tiến, tỷ lệ làm tổ thấp hơn đáng kể so với phương pháp cơ học [1]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh sinh thiết phôi bào ảnh hưởng tới sự phát triển phôi, sự làm tổ của phôi thai. Nghiên cứu của Scott (2013) cho thấy sinh thiết phôi bào người làm giảm tiềm năng của phôi, giảm 39% tỷ lệ thai lâm sàng so với nhóm không sinh thiết [2]. Các nghiên cứu hiện nay trên người mới chỉ đánh giá được biến

chứng gần mà chưa đánh giá được biến chứng xa.

Xét nghiệm di truyền tiền làm tổ không xâm lấn là một kỹ thuật chẩn đoán di truyền nhằm loại trừ những phôi bất thường về mặt di truyền trước khi cấy vào buồng tử cung người mẹ mà không cần sinh thiết.

Năm 2013, Palini nghiên cứu lấy dịch nang của phôi trong quá trình thủy tinh hóa phôi và tiến hành Realtime PCR, thấy 90% mẫu phôi có chứa DNA, mục đích để sàng lọc bệnh liên kết với nhiễm sắc thể giới tính qua phát hiện gen TSPY và TBC13 [3]. Ngoài ra, Assou và CS nghiên cứu xác định cfDNA tồn tại trong dịch nuôi cấy (SCM) đủ lớn để xét nghiệm di truyền trước chuyển phôi [4]. Có 3 phương thức chính để thu thập DNA tự do bao gồm: Thu dịch phôi nang (BF); thu dịch nuôi cấy (SCM) và kết hợp thu dịch phôi nang và dịch nuôi cấy (BF + SCM). Thu dịch phôi nang được một số tác giả xem như là phương pháp xét nghiệm di truyền trước chuyển phôi ít xâm lấn (mini-invasive PGT). So với nuôi ghép phôi, sinh thiết phôi không xâm lấn cũng cần phải nuôi cấy phôi đơn giọt (1 phôi trong 1 giọt môi trường). Chúng tôi tiến hành nghiên cứu với mục tiêu: Khảo sát tỷ lệ phát triển phôi nang, phôi phân cắt trong điều kiện nuôi cấy phôi đơn giọt phục vụ chẩn đoán di truyền tiền làm tổ không xâm lấn.

**ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP
NGHIÊN CỨU**

1. Đối tượng nghiên cứu

75 phôi từ 14 cặp vợ chồng được tuyển chọn theo phương pháp lấy mẫu thuận tiện, có chỉ định PGT-A, thời gian từ tháng 3 - 11/2020 tại Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội.

* *Tiêu chuẩn lựa chọn:* Bệnh nhân có chỉ định làm PGT-A, có đủ hồ sơ và đồng ý tham gia nghiên cứu.

* *Tiêu chuẩn loại trừ:* Bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu; quá trình thực hiện không tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Thiết kế nghiên cứu:* Quan sát mô tả cắt ngang.

* *Quy trình nuôi cấy đơn giọt:*

- Hoàn thiện hồ sơ bệnh án, kích thích buồng trứng có kiểm soát bằng phác đồ GnRH/Antagonist, chọc hút noãn.

- Tìm phức hợp noãn - nang, ủ noãn, loại bỏ tế bào nang bằng enzyme hyaluronidase.

- Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn, theo dõi thụ tinh.

- Đánh giá sự phát triển, hình thái phôi phân cắt tại ngày 3, rửa phôi, chuyển phôi sang môi trường nuôi cấy đơn giọt (15 µl), hỗ trợ thoát màng bằng laser.

- Đánh giá sự phát triển phôi nang và hình thái phôi (blastocyst) tại ngày 5 hoặc ngày 6.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm chung về mẫu nghiên cứu

Tuổi trung bình của vợ là 35,71 ± 3,17, trẻ nhất 30 tuổi, lớn nhất 40 tuổi. Tuổi trung bình của chồng là 42,71 ± 5,06, trẻ nhất 34 tuổi, lớn nhất 52 tuổi. Thời gian vô sinh trung bình 4,86 ± 3,37 năm, ngắn nhất 1 năm, dài nhất 15 năm. Vô sinh nguyên phát gặp 2 trường hợp (14,29%), vô sinh thứ phát chiếm phần lớn (85,71%).

2. Đặc điểm về chu kỳ kích thích buồng trứng có kiểm soát cơ bản

Bảng 1: Đặc điểm về chu kỳ kích thích buồng trứng có kiểm soát.

Chỉ tiêu nghiên cứu	$\bar{x} \pm SD$	Nhỏ nhất	Lớn nhất
FSH ngày 2 CKK (mIU/ml)	7,41 ± 2,3	3,45	11,70
LH ngày 2 CKK (mIU/ml)	6,49 ± 3,1	3,00	13,30
AMH ngày 2 CKK (ng/ml)	2,32 ± 1,04	1,18	5,09
Số nang AFC ngày 2 CKK	12,07 ± 4,12	8	23
Tổng liều FSH sử dụng (IU)	2.578,57 ± 483,66	1.800	3.600
Số ngày dùng FSH (ngày)	10,14 ± 1,1	8	12
Nội tiết E2 ngày 8 CKK (pg/ml)	2.031,85 ± 756,83	840,9	2.918

(CKK: Chu kỳ kinh, FSH: Follicle stimulating hormone, LH: Luteinizing hormone, E2: Estradiol, IU: International unit)

Nồng độ FSH, LH trung bình trong ngưỡng bình thường của tham chiếu xét nghiệm.

3. Kết quả noãn, phôi của đối tượng nghiên cứu

Bảng 2: Kết quả noãn, phôi của đối tượng nghiên cứu.

Chỉ tiêu nghiên cứu	$\bar{X} \pm SD$	Nhỏ nhất	Lớn nhất
Số phức hợp noãn nang chọc được	8,5 ± 4,55	1	17
Số noãn sau tách	8,07 ± 3,87	1	14
Noãn GV	0,14 ± 0,53	0	2
Noãn MI	0,5 ± 1,09	0	4
Noãn M2	7,14 ± 3,63	1	12
Noãn thoái hóa	0,36 ± 0,74	0	2
Tỷ lệ noãn GV (%)	1,02 ± 3,82	0	14,28
Tỷ lệ noãn MI (%)	5,37 ± 12,10	0	44,44
Tỷ lệ noãn MII (%)	89,84 ± 14,73	55,55	100,00
Tỷ lệ noãn thoái hóa (%)	4,56 ± 10,31	0	33,33
Số noãn ICSI	7,21 ± 3,72	1	12
Hợp tử 2PN	5,21 ± 2,94	1	10
Số phôi phân cắt ngày 3	5,29 ± 2,70	1	10
Số phôi nang	2,93 ± 1,69	0	6
Tỷ lệ thụ tinh (%)	73,0 ± 18,0	42,85	100
Tỷ lệ phôi phân cắt ngày 3 (%)	98,41 ± 4,03	88,88	100
Tỷ lệ tạo phôi nang (%)	58,08 ± 27,80	0	100

(GV: Noãn túi nhân, MI: Noãn gian kỳ I, MII: Noãn gian kỳ II, ICSI: Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn, 2PN: Hợp tử 2 tiền nhân)

BÀN LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tỷ lệ thụ tinh trung bình là 73 ± 18%. Ebner và CS (2010) ghi nhận tỷ lệ thụ tinh ở nhóm ICSI là 80,7%, ở nhóm IVF là 69%. Tuổi trung bình trong nghiên cứu của chúng tôi là 35,71 ± 3,17, cao hơn nghiên cứu của Ebner và CS (31,6 năm). Trong khi đó, chỉ số AMH (2,32 ± 1,04 ng/ml) thấp hơn nghiên cứu của Ebner (6,0

ng/ml) [5]. Ngoài ra, Ebner chỉ lựa chọn những đối tượng có ít nhất 9 hợp tử.

Tỷ lệ noãn trưởng thành trong nghiên cứu của Ebner (2020) là 89,3%, tương đương nghiên cứu của chúng tôi (89,84%) [5]. Tỷ lệ phôi phân cắt ngày 3 của chúng tôi là 98,41 ± 4,03%, của Ebner là 95 - 96%. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nuôi phôi đơn giọt có tỷ lệ phôi nang là 58,08 ± 27,8%, tỷ lệ phôi nang khi nuôi

đơn giọt trong nghiên cứu của Ebner là 45,2%, khi nuôi gộp là 55,8%. Mặc dù có những quan điểm cho rằng nuôi phôi gộp làm cho phôi có những yếu tố tự tiết (autocrine) và cận tiết (paracrine), góp phần làm cho các phôi nang phát triển. Tuy nhiên, một số nhược điểm khi nuôi phôi gộp bao gồm: Tích lũy nhiều hơn các yếu tố có thể gây độc cho phôi (embryo toxic), từ đó làm giảm sức sống, năng lực của phôi trong giọt nuôi gộp, cạnh kiệt một số chất thiết yếu với phôi do chuyển hóa của các phôi khác nhau, một số chất chuyển hóa trung gian của phôi có thể là độc tố với phôi khác, không thể theo dõi động học của phôi mặc dù động học phôi là một yếu tố quan trọng để đánh giá chất lượng phôi. Rebollar-Lazaro và Matson (2010) báo cáo việc nuôi cấy phôi gộp từ ngày 1 - 3 không tác động đến tỷ lệ có thai và tỷ lệ làm tổ so với những phôi được nuôi cấy đơn giọt [6].

Thể tích nuôi phôi đơn giọt ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi và yêu cầu của nuôi cấy phôi đơn giọt phục vụ chẩn đoán di truyền tiền làm tổ không xâm lấn. Nuôi cấy phôi thể tích lớn dẫn tới tình trạng nồng độ sản phẩm DNA của phôi thấp hơn, từ đó hiệu quả khuếch đại gen giảm. Yeung (2016) tiến hành nuôi cấy phôi đơn giọt với thể tích 30 μ l thấy tỷ lệ khuếch đại thành công là 89% [7]. Rubio (2020) nuôi cấy phôi đơn giọt với thể tích 10 μ l, tỷ lệ khuếch đại gen là 97,4% [8]. Năm 2015, Minasi tiến hành so sánh nuôi phôi đơn giọt ở các thể tích khác nhau (35 μ l, 15 μ l và 7 μ l). Kết quả cho thấy sự phát triển phôi giữa các nhóm không khác biệt,

tuy nhiên tỷ lệ blastocyst ở nhóm nuôi phôi 7 μ l cao hơn so với nhóm 35 μ l. Tác giả nhận định việc nuôi phôi thể tích thấp làm tăng nồng độ các yếu tố cận tiết của phôi [9].

Hiện nay, với những tiến bộ mới trong labo hỗ trợ sinh sản, việc nuôi đơn phôi có tỷ lệ tạo phôi nang cao. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng môi trường nuôi cấy phôi kín, có phủ dầu, do đó tránh được tạp nhiễm DNA từ môi trường cũng như sự bốc hơi nước của dịch nuôi cấy. Việc nuôi phôi đơn giọt có thể được tiến hành để phục vụ xét nghiệm di truyền tiền làm tổ không xâm lấn.

KẾT LUẬN

Tỷ lệ phôi phân cắt ngày 3 là $98,41 \pm 4,03\%$, tỷ lệ tạo phôi nang khi nuôi cấy đơn giọt là $58,08 \pm 27,8\%$. Việc nuôi cấy phôi đơn giọt có thể được tiến hành để phục vụ xét nghiệm di truyền tiền làm tổ không xâm lấn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kim HJ, Kim CH, Lee SM, et al. Outcomes of preimplantation genetic diagnosis using either zona drilling with acidified Tyrode's solution or partial zona dissection. Clin Exp Reprod Med 2012; 39(3):118-124.
2. Scott RT, Upham KM, Forman EJ, et al. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: A randomized and paired clinical trial. Fertil Steril 2013; 100(3):624-630.
3. Palini S, Galluzzi L, De Stefani S, et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. Reprod Biomed Online 2013; 26(6):603-610.

4. Assou S, Aït-Ahmed O, El Messaoudi S, et al. Non-invasive pre-implantation genetic diagnosis of X-linked disorders. *Med Hypotheses* 2014; 83(4):506-508.
5. Ebner T, Shebl O, Moser M, et al. Group culture of human zygotes is superior to individual culture in terms of blastulation, implantation and life birth. *Reproductive BioMedicine Online* 2010; 21(6):62-768.
6. Rebollar-Lazaro I, Matson P. The culture of human cleavage stage embryos alone or in groups: Effect upon blastocyst utilization rates and implantation. *Reprod Biol* 2010; 10(3): 227-234.
7. Yeung QSY, Zhang YX, Chung JPW, et al. A prospective study of non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies (NiPGT-A) using next-generation sequencing (NGS) on spent culture media (SCM). *J Assist Reprod Genet* 2019; 36(8):609-1621.
8. Rubio C, Navarro-Sánchez L, García-Pascual CM, et al. Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophectoderm biopsies from 1,301 human blastocysts. *Am J Obstet Gynecol* 2020.
9. Minasi MG, Fabozzi G, Casciani V, et al. Improved blastocyst formation with reduced culture volume: Comparison of three different culture conditions on 1,128 sibling human zygotes. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32(2): 215-220.