

Ứng dụng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới NGS trong chẩn đoán rối loạn NST trước chuyển phôi trong thụ tinh trong ống nghiệm

Nguyễn Thị Bích Vân¹, Nguyễn Duy Bắc², Lê Hoàng³, Đặng Tiến Trường²

¹ Trường Đại học Y Hà Nội

² Học viện Quân Y

³ Bệnh viện Tâm Anh

doi: 10.46755/vjog.2022.3.1436

Tác giả liên hệ (Corresponding author): Nguyễn Thị Bích Vân; email: bichvan@hmu.edu.vn

Nhận bài (received): 21/8/2022 - Chấp nhận đăng (accepted): 25/9/2022

Tóm tắt

Mục tiêu nghiên cứu: Phân tích kết quả chẩn đoán rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi trong thụ tinh trong ống nghiệm thông qua ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới NGS.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu thực hiện trên 603 phôi của các cặp vợ chồng thực hiện kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm có phôi nang tạo ra bằng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) tại Viện Mô phôi quân đội - Học viện Quân Y.

Kết quả: Tỷ lệ rối loạn NST ở phôi 5 ngày tuổi thụ tinh trong ống nghiệm trong nghiên cứu là 42,7%. Đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể gặp nhiều nhất ở nhiễm sắc thể số 16. Đột biến thêm đoạn thường hay gặp ở NST số 1, 2, 4, 5 và NST X. Tỷ lệ bất thường cấu trúc NST không gặp ở NST số 12, 20 và 22 ở quần thể nghiên cứu.

Kết luận: Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới NGS có giá trị cao trong phân tích tỷ lệ rối loạn NST, lệch bội NST và bất thường trong cấu trúc NST.

Từ khóa: giải trình tự thế hệ mới, rối loạn NST, IVF.

Application of next-generation sequencing (NGS) technique in the diagnosis of chromosomal disorders before embryo transfer in *in vitro* fertilization

Nguyen Thi Bich Van¹, Nguyen Duy Bac², Le Hoang³, Dang Tien Truong²

¹ Hanoi Medical University

² Military Medical Academy

³ Tam Anh Hospital

Abstract

Objectives: To analyze the diagnostic results of chromosomal disorders before embryo transfer in *in vitro* fertilization through the application of the next-generation sequencing technique (NGS).

Subjects and methods: The study was performed on 603 embryos of couples underwent *in vitro* fertilization with blastocysts created by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) at the Military Embryology Institute - Military Medical Academy.

Results: The rate of chromosomal disorders in 5-day-old embryos fertilized *in vitro* in the study was 42.7%. Structural mutations are most common on chromosome 16. Insertion mutations are common on chromosomes 1, 2, 4, 5, and X. The rate of structural abnormalities of chromosomes is not found in chromosomes 12, 20, and 22 in the study samples.

Conclusion: NGS technique has a high value in analyzing the rate of chromosomal disorders, aneuploidy and abnormalities in chromosome structure.

Keywords: next-generation sequencing, chromosomal disorder, IVF.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), tỷ lệ các cặp vợ chồng vô sinh từ 6%-12%. Tỷ lệ này ở Việt Nam là 7,7% [1]. Thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) là một trong những phương pháp điều trị hiệu quả nhất. Tuy

nhìn, mặc dù các phôi trước khi được chuyển đã được sàng lọc hình thái tốt, tỷ lệ có thai lâm sàng của IVF vẫn thấp, chỉ từ 30-35% [2],[3]. Rối loạn nhiễm sắc thể (NST) ở noãn hoặc phôi là nguyên nhân hàng đầu dẫn tới phôi không làm tổ, sảy thai, thai lưu và dị tật thai nhi

[4]. Cùng với sự phát triển của khoa học, sự ra đời của kỹ thuật chẩn đoán di truyền trước làm tổ (Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy - PGT-A) giúp các nhà khoa học có thể chọn được tương đối chính xác các phôi không có các rối loạn cấu trúc và số lượng NST trước khi chuyển vào tử cung người mẹ. Ở Việt Nam, kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (NGS) trong sàng lọc 24 NST ở phôi bước đầu được thực hiện tại một số trung tâm nhưng chưa có nhiều nghiên cứu nhằm đánh giá kết quả sàng lọc bất thường nhiễm sắc thể ở phôi, đặc biệt các bất thường cấu trúc NST. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu phân tích kết quả chẩn đoán rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi trong thụ tinh trong ống nghiệm thông qua ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

Đối tượng bao gồm các phôi của các cặp vợ chồng thực hiện sàng lọc phôi tại các trung tâm IVF.

Tiêu chuẩn lựa chọn phôi từ các cặp vợ chồng:

Lựa chọn đối tượng nghiên cứu gồm các phôi của

các cặp vợ chồng thực hiện kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm có phôi nang tạo ra bằng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI)

2.3. Thời gian nghiên cứu và địa điểm nghiên cứu:

Thời gian nghiên cứu từ tháng 12 năm 2018 đến tháng 6 năm 2019 tại viện Mô phôi lâm sàng Quân đội – Học viện Quân Y

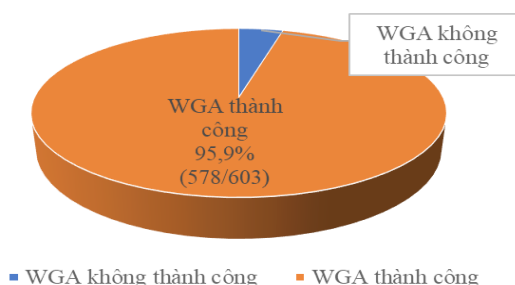
2.4. Phương tiện và quy trình nghiên cứu:

Nghiên cứu tiến hành thu thập các thông tin lựa chọn bệnh nhân vào mẫu nghiên cứu đúng tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ, đồng thời thu nhập các biến số nghiên cứu: tuổi, tính chất kinh nguyệt, tình trạng vô sinh, loại vô sinh, thời gian vô sinh, tiền sử sảy thai, tiền sử IUH thất bại, tiền sử thất bại làm tổ thụ tinh ống nghiệm. Kết quả giải trình tự gen các phôi được làm thụ tinh ống nghiệm từ các cặp vợ chồng sẽ được thu thập và phân tích.

2.5. Đạo đức nghiên cứu: nghiên cứu đã được chấp thuận bởi Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Học Viện Quân Y số 3985/QĐ-HVQY ngày 06/4/2017. Nghiên cứu này sử dụng một phần số liệu trong đề tài nghiên cứu cấp Nhà nước: “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trong sàng lọc rối loạn nhiễm sắc thể trước chuyển phôi”.

3. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả khuếch đại được DNA từ mẫu phôi bào



Biểu đồ 1. Kết quả khuếch đại toàn bộ hệ gen của 603 mẫu nghiên cứu

Tất cả 578 sản phẩm khuếch đại toàn bộ gen (WGA- whole genome amplification) đủ điều kiện thực hiện trong các bước tiếp theo (bước chuẩn bị thư viện và giải trình tự). Các dữ liệu giải trình tự đáng tin cậy (> Q30) mới được sử dụng cho các bước phân tích tiếp theo.

3.2. Tỷ lệ bất thường NST ở phôi ngày 5

Bảng 1. Tỷ lệ bất thường NST của 578 mẫu nghiên cứu

NST	Thông số	Số phôi (n)	Tỷ lệ (%)	Sai số chuẩn	95% khoảng tin cậy
Bất thường NST		247	42,7	2,1	39,7 - 47,8
Không bất thường NST		331	57,3	2,1	53,2 - 61,3
Tổng số		578	100		

Trong tổng số 578 mẫu được phân tích, phát hiện có 331 mẫu phôi không phát hiện bất thường NST (chiếm 57,3%) và 247 mẫu phôi phát hiện bất thường NST (chiếm 42,7% tổng số phôi).

Bảng 2. Đặc điểm bất thường NST của phôi 5 ngày tuổi IVF

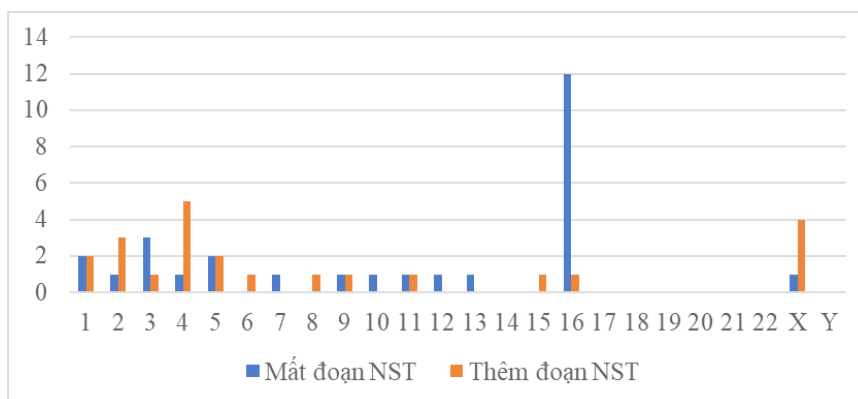
Bất thường NST	Số phôi	Tỷ lệ %
Chỉ bất thường số lượng NST	173	70,0
Chỉ bất thường cấu trúc NST	28	11,3
Phôi thể khảm	36	14,6
Bất thường cả số lượng và cấu trúc NST	8	3,2
Dạng thể khảm có kèm bất thường số lượng NST	2	0,8
Tổng số	247	100,0

Trong 247 mẫu phôi mang rối loạn NST có 173 mẫu có bất thường về số lượng, 28 mẫu có bất thường về cấu trúc NST, 36 mẫu dạng thể khảm NST, 8 mẫu vừa có bất thường về cấu trúc vừa có bất thường về số lượng NST và 2 mẫu phôi dạng thể khảm mang bất thường số lượng NST.

Bảng 3. Đặc điểm bất thường cấu trúc NST ở phôi IVF 5 ngày tuổi

Số phôi có bất thường cấu trúc NST	Số mẫu phôi	Tỷ lệ %
Rối loạn 1 NST	33	91,67
Rối loạn 2 NST	2	5,56
Rối loạn 3 NST	1	2,77
Tổng số	36	100

Trong các bất thường cấu trúc phát hiện, có 91,67% là đơn bất thường, tức chỉ xuất hiện một loại hoặc thêm hoặc mất trên chỉ 1 NST. Do vậy, những bất thường này hiếm gặp do phôi nghiên cứu là mẫu phôi 5 ngày tuổi, nên chỉ chiếm dưới 6% các phôi có hơn 1 bất thường trên ≥ 2 NST khác nhau.

**Biểu đồ 2.** Tần suất bất thường cấu trúc NST của 578 mẫu phôi IVF

Bất thường cấu trúc NST xảy ra tại các NST không có quy luật rõ ràng ở phôi IVF ngày 5.

4. BÀN LUẬN

Trong thụ tinh ống nghiệm, việc tìm kiếm và chọn lựa được những phôi có cơ hội thụ thai cao là rất quan trọng. Nhiều phôi bào có điểm hình thái cao nhưng phôi không làm tổ được, trong khi những phôi có điểm hình thái thấp lại cho ra đời những em bé khỏe mạnh. Trong nhiều trường hợp sẩy thai, thai lưu, chúng ta đã xác định được có tình trạng rối loạn NST ở phôi [4].

Trong tổng số 603 mẫu phôi của nghiên cứu này có 578 mẫu phôi (chiếm 95,9%) đã khuếch đại thành công hệ gen và được phân tích sự rối loạn ở cả 24 NST sử dụng phương pháp NGS. Các mẫu không khuếch đại được hệ gen sẽ không được tiếp tục phân tích trong các bước sau đó. Nguyên nhân của việc khuếch đại không thành công toàn bộ hệ gen có thể do quá trình vận chuyển phôi từ các Trung tâm Hỗ trợ sinh sản về

phòng thí nghiệm di truyền làm bản các mẫu lên nắp ống nghiệm mà ly tâm không thể thu được mẫu nghiên cứu. Tất cả 578 sản phẩm WGA đủ điều kiện thực hiện trong các bước tiếp theo.

Trong nghiên cứu này phát hiện có 331 mẫu phôi không phát hiện rối loạn NST (chiếm 57,3%) và 247 mẫu phôi phát hiện rối loạn NST (Bảng 1). Chúng tôi nhận thấy tỷ lệ rối loạn NST chiếm 42,7% 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 ông phát hiện trong 28 đối tượng nghiên cứu có 45,1% phôi có rối loạn NST [5]. Một số nghiên cứu khác đều cho thấy các phôi được tạo ra trong ống nghiệm có mang rối loạn NST rất cao (khoảng trên 50%) [6].

Dạng bất thường số lượng NST là dạng phổ biến nhất ở các mẫu phôi IVF 5 ngày tuổi (chiếm 70%). Các trường

hợp về bất thường cấu trúc hoặc thể khảm thì ít gặp hơn. Các dạng như bất thường kết hợp như bất thường số lượng và cấu trúc cùng trong 1 phôi hoặc dạng thể khảm có kèm theo bất thường số lượng thì hiếm khi gặp, chỉ chiếm lần lượt là 3,2 % và 0,8% trong tổng số 578 trường hợp được đánh giá. Do đó, có thể trong một số nghiên cứu trước đó khi chỉ phân tích đơn lẻ một vài NST, với những đặc điểm ảnh hưởng đến NST chưa được kiểm chứng, đã được phân loại sai thành loại phôi bình thường. Trong nghiên cứu này, phân tích PGT-A-NGS đã được sử dụng, cho phép tất cả các NST được đánh giá một cách toàn diện và chính xác. Hơn nữa, thử nghiệm dựa trên sự phân tích của một vài tế bào chứ không chỉ là một tế bào, về mặt lý thuyết giúp làm giảm nguy cơ phân loại sai do phôi thể khảm [7].

Lệch bội NST ở các phôi thụ tinh trong ống nghiệm ngày 5 xảy ra ở tất cả các NST với tỷ lệ khác nhau, các NST của phôi ngày 5 đều có nguy cơ bị lệch bội NST, sự rối loạn này 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 (Bảng 3). Kết quả này khá tương đồng với kết quả trong nghiên cứu của Traversa và cộng sự năm 2011, khi đánh giá mức độ lệch bội nhiễm sắc thể thì họ thấy lệch bội ở một nhiễm sắc thể là cao nhất (55%) sau đó là lệch bội 2 nhiễm sắc thể (41%), lệch bội ở 3 nhiễm sắc thể trở lên chỉ chiếm 7% [8].

Nhìn chung, bất thường cấu trúc NST xảy ra tại các NST không có quy luật rõ ràng ở phôi IVF ngày 5. Tuy nhiên, đối với đột biến mất đoạn NST, xảy ra nhiều nhất là ở NST số 16 (12 trường hợp) sau đó tới các NST số 3, 5 và NST số 1. Đột biến thêm đoạn thường hay gặp ở NST số 1, 2, 4, 5 và NST X. Xét tổng thể, NST 4, 16 là các NST có tỷ lệ gặp bất thường cấu trúc NST dạng thêm và mất đoạn nhiều nhất. Trong hai NST giới tính, thì NST X phát hiện nhiều bất thường về cấu trúc hơn NST Y. Nhóm các NST không phát hiện bất thường nào trong tổng số 578 mẫu nghiên cứu là NST 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22. Biểu đồ 2 cho thấy NST có kích thước lớn cũng phát hiện có bất thường số lượng NST dạng đơn nhiễm, tam nhiễm nhưng lại không được phát hiện ở các nghiên cứu trong giai đoạn mang thai. Điều này cho thấy những bất thường "nghiêm trọng" này gây tử vong cho phôi thai trước khi kết thúc tam cá nguyệt đầu tiên của thai kỳ, mặc dù điểm chính xác mà tại đó các phôi bị ảnh hưởng vẫn chưa được xác định.

5. KẾT LUẬN

Ứng dụng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới NGS trong chẩn đoán rối loạn NST trước chuyển phôi trong thụ tinh trong ống nghiệm cho thấy: tỷ lệ rối loạn NST ở phôi ngày 5 thụ tinh trong ống nghiệm trong nghiên cứu là 42,7%. Đột biến mất đoạn NST xảy ra nhiều nhất là ở NST số 16 sau đó tới các NST số 3, 5 và NST số 1. Tỷ lệ bất thường cấu trúc NST không gặp ở NST số 12, 20 và 22 ở quần thể nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Xuân Hợi. Đặc điểm lâm sàng và tinh dịch đồ của bệnh nhân vô sinh nam do tinh trùng ít và yếu đến khám tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương. Tạp chí Y học Việt Nam. 2016;444(2).
2. Nguyễn Xuân Hợi. Các yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ có thai lâm sàng và tỷ lệ làm tổ trong hỗ trợ sinh sản. Tạp chí Nghiên cứu Y học. 2010;69(4):4.
3. Nguyễn Thị Minh Khai. Đánh giá hiệu quả chuyển phôi trữ đông cho bệnh nhân thụ tinh ống nghiệm tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương giai đoạn 2012-2014. Hà Nội: Đại học Y Hà Nội; 2017.
4. Lathi RB, Westphal LM, Milki AA. Aneuploidy in the miscarriages of infertile women and the potential benefit of preimplantation genetic diagnosis. Fertility and sterility. 2008;89(2):353-7.
5. Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohí J, et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. Human reproduction (Oxford, England). 2003;18(1): 182-8.
6. Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. Fertility and sterility. 2010;94(5):1700-6.
7. Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft W, Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. Human reproduction. 2008;23(11):2596-608.
8. Traversa MV, Marshall J, McArthur S, Leigh D. The genetic screening of preimplantation embryos by comparative genomic hybridisation. Reprod Biol. 2011;11(Suppl 3):51-60.