

ẢNH HƯỞNG CỦA KỸ THUẬT SINH THIẾT PHÔI LÊN HÌNH THÁI PHÔI NANG XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC LÀM TỔ

Nguyễn Ngọc Diệp^{1}, Lê Thanh Huyền¹, Đỗ Ngọc Lan¹
Nguyễn Minh Phương¹, Nguyễn Linh Chi²*

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá sự thay đổi hình thái, cấu trúc sau sinh thiết và sau rã đông của phôi xét nghiệm di truyền tại Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu tiền cứu, mô tả trên 623 phôi nang xét nghiệm di truyền trước làm tổ (preimplantation genetic testing - PGT). Phôi được chia thành 3 nhóm theo tuổi mẹ: < 30; 30 - 35; > 35. Các phôi được trữ đông sau sinh thiết 3 giờ và rã đông 4 giờ trước khi chuyển phôi. **Kết quả:** Tại thời điểm sau sinh thiết 3 giờ, 605/623 phôi nở lại (97,1%), đường kính phôi trong mỗi nhóm đều nhỏ hơn có ý nghĩa so với thời điểm trước sinh thiết ($p < 0,05$), chưa thấy sự khác biệt rõ ràng về độ dày màng trong suốt ($p = 0,06$). 105 phôi chuẩn bội được rã đông trong các chu kỳ chuyển phôi lưu. Sau rã đông 4 giờ, 100% phôi sống và nở lại. Tại thời điểm sau rã đông 4 giờ, đường kính phôi lớn hơn và độ dày màng trong suốt của phôi mỏng hơn có ý nghĩa so với thời điểm trước sinh thiết ở cả 3 nhóm ($p < 0,001$). **Kết luận:** Ở cả 3 nhóm, so với thời điểm trước sinh thiết: Sau sinh thiết 3 giờ, 97,1% phôi nở lại, đường kính trung bình của phôi nhỏ hơn có ý nghĩa; sau rã đông 4 giờ, 100% phôi nở lại, đường kính phôi lớn hơn và màng trong suốt mỏng đi có ý nghĩa.

Từ khoá: Phôi sinh thiết; Đường kính phôi; Hình thái phôi sinh thiết.

EFFECTS OF BIOPSY TECHNOLOGY ON BLASTOCYST MORPHOLOGY IN PREIMPLANTATION GENETIC TESTING

Abstract

Objectives: To evaluate the changes in the morphology and structure of blastocysts after biopsy and thawing at the Military Institute of Clinical Embryology and Histology.

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

²Trung tâm Hỗ trợ Sinh sản 16A

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Ngọc Diệp (nndiep301@gmail.com)

Ngày nhận bài: 24/9/2024

Ngày được chấp nhận đăng: 03/12/2024

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v50i2.1033>

Methods: A prospective, descriptive study was conducted on 623 blastocysts undergoing biopsy for preimplantation genetic testing (PGT). Based on maternal age, the 623 blastocysts were divided into three groups: < 30, 30 - 35, and > 35 years of age. All blastocysts were frozen three hours after biopsy and thawed four hours before transfer. **Results:** Three hours after the biopsy, 605 of 623 blastocysts re-expanded (97.1%). The average diameter of the blastocysts was significantly smaller than before the biopsy ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference in the thickness of the zona pellucida between the two-time points ($p = 0.06$). 105 euploid blastocysts were thawed. Four hours after warming, 100% of the blastocysts survived and re-expanded. The average diameter of the blastocysts increased, and the thickness of the zona pellucida decreased significantly compared to before the biopsy across all three groups ($p < 0.001$).

Keywords: Blastocyst biopsy; Diameter of blastocyst; Morphology of biopsied blastocyst.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản, thụ tinh trong ống nghiệm là phương pháp mang lại hiệu quả cao nhất. Tuy nhiên cho tới nay, tỷ lệ thành công của phương pháp này vẫn còn hạn chế; có nhiều nguyên nhân dẫn đến tình trạng này, trong đó, một trong những nguyên nhân hàng đầu là do phôi mang bất thường nhiễm sắc thể (NST). Sự ra đời của PGT là bước đột phá của lĩnh vực hỗ trợ sinh sản kết hợp với công nghệ sinh học phân tử, giúp chẩn đoán phôi mang các đột biến đơn gen, đa gen gây bệnh hoặc/và giúp kiểm soát các phôi mang bất thường NST, từ đó, hỗ trợ cải thiện tỷ lệ trẻ sinh sống khỏe mạnh ở

những cặp vợ chồng mang gen bệnh hoặc mang các yếu tố nguy cơ cao tạo phôi bất thường về mặt di truyền. Tuy nhiên, để xét nghiệm được NST phôi, cần thực hiện kỹ thuật sinh thiết phôi thu mẫu phân tích di truyền, đây là một kỹ thuật xâm lấn, do đó, các nhà khoa học rất quan tâm về tính an toàn của kỹ thuật này đối với sự phát triển của phôi. Mặc dù nhiều nghiên cứu đã được tiến hành cho thấy tính an toàn của sinh thiết đối với sức sống cũng như tiềm năng làm tổ của phôi, tuy nhiên, kỹ thuật này tác động tới sự phát triển của phôi đánh giá thông qua hình thái của phôi như thế nào chưa có nhiều tác giả đề cập tới [1, 2, 3]. Vì vậy, chúng tôi tiến hành

nguyên cứu này nhằm: *Đánh giá sự thay đổi hình thái, cấu trúc trước sinh thiết, sau sinh thiết 3 giờ và sau rã đông 4 giờ của phôi xét nghiệm di truyền trước làm tổ.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

623 phôi nang của 186 bệnh nhân (BN) vô sinh có chỉ định làm thụ tinh trong ống nghiệm kết hợp xét nghiệm di truyền trước làm tổ (preimplantation genetic testing for aneuploidies - PGT-A) từ tháng 10/2017 - 01/2021 tại Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội, Học viện Quân y.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Thiết kế nghiên cứu:* Nghiên cứu tiến cứu, mô tả.

Đối tượng là phôi nang của BN vô sinh có chỉ định điều trị thụ tinh trong ống nghiệm kết hợp PGT-A. Dựa vào tuổi của người mẹ, chúng tôi chia 623 phôi thành 3 nhóm: Nhóm I (phôi của BN tuổi < 30); nhóm II (phôi của BN tuổi 30 - 35); nhóm III (phôi của BN tuổi > 35).

* *Chỉ tiêu nghiên cứu:* Đường kính phôi, độ dày màng trong suốt, tỷ lệ phôi

sống, mức độ nở lại của phôi sau sinh thiết, sau rã đông.

* *Xử lý số liệu:* Số liệu được thu thập từ tháng 10/2017 - 01/2021 tại Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội, tổng hợp kết quả phân tích, đánh giá sự khác biệt về đường kính, độ dày màng trong suốt của phôi xét nghiệm di truyền giữa các thời điểm trước sinh thiết, sau sinh thiết 3 giờ, sau rã đông 4 giờ; tỷ lệ phôi sống sót và tỷ lệ phôi nở lại sau sinh thiết 3 giờ, sau rã đông 4 giờ. Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 26.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ theo quy trình điều trị của Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội, không gây bất cứ ảnh hưởng nào tới quá trình điều trị của BN. Nghiên cứu được sự chấp thuận của BN, thông tin BN được bảo mật. Nghiên cứu được chấp thuận của chỉ huy Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội, danh sách BN được xác nhận bởi Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội. Số liệu nghiên cứu được Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội cho phép sử dụng và công bố. Nghiên cứu được xây dựng, hoàn thiện và công bố dựa trên sự đồng thuận của tất cả thành viên trong nhóm nghiên cứu, chúng tôi cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Đặc điểm hình thái phôi xét nghiệm di truyền trước sinh thiết

Phân tích số liệu đường kính phôi, độ dày màng trong suốt, chúng tôi thu được kết quả như sau:

Bảng 1. Độ dày màng trong suốt, đường kính của phôi trước sinh thiết.

Phôi trước sinh thiết	Nhóm 1 (n = 92)	Nhóm 2 (n = 279)	Nhóm 3 (n = 252)	Tổng (n = 623)
Đường kính phôi (μm)	$138,17 \pm 11,9$	$137,12 \pm 11,22$	$135,96 \pm 11,81$	$136,81 \pm 11,57$
$\bar{X} \pm \text{SD}$ (min - max)	(113,9 - 162,2)	(114,9 - 160,2)	(113 - 161,3)	(113 - 162,2)
p*	$p_{(1-2-3)} = 0,243$			
Độ dày màng trong suốt (μm)	$16,69 \pm 2,47$	$16,16 \pm 2,41$	$16,63 \pm 2,31$	$16,43 \pm 2,39$
$\bar{X} \pm \text{SD}$ (min - max)	(11,8 - 21,6)	(11,4 - 21,7)	(11,6 - 21,4)	(11,4 - 21,7)
p*	$p_{(1-2-3)} = 0,038$; $p_{(1-2)} = 0,069$; $p_{(1-3)} = 0,837$; $p_{(2-3)} = 0,022$			

(*Kiểm định ANOVA)

Tại Việt Nam, nghiên cứu của Đoàn Thị Hằng (2013) trên phôi nang không hỗ trợ thoát màng, không sinh thiết cho thấy đường kính phôi trung bình trước trữ đông là $153,50 \pm 9,4\mu\text{m}$ [4]. Nghiên cứu của Dương Đình Hiếu (2016) đánh giá chi tiết hơn đưa ra kết quả đường kính trung bình phôi nang chất lượng tốt, trung bình, xấu lần lượt là $181,7 \pm 8,5\mu\text{m}$; $178,2 \pm 10,3\mu\text{m}$; $168,1 \pm 7,2\mu\text{m}$ [5]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, đường kính phôi trung bình là $136,81 \pm 11,57\mu\text{m}$. Đường kính phôi trung bình trong nghiên cứu của chúng tôi nhỏ hơn

so với các nghiên cứu khác. Nguyên nhân của sự khác biệt: Thứ nhất là khi đo đường kính phôi trong các nghiên cứu trước đây, các tác giả đo toàn bộ độ rộng của phôi tính cả màng trong suốt, nghiên cứu của chúng tôi đường kính phôi chỉ được tính là đường kính khối phôi bên trong không bao gồm màng trong suốt; thứ hai là trong các nghiên cứu kể trên, phôi nghiên cứu là phôi không sinh thiết, không có đục lỗ màng trong suốt hỗ trợ thoát màng, phôi trong nghiên cứu của chúng tôi là phôi được đục lỗ màng trong suốt chủ động vào

giai đoạn ngày 3 của tuổi phôi. Do vậy, mức độ nở rộng của khoang phôi cũng như đường kính phôi chúng tôi đánh giá không đạt được tới ngưỡng phôi nở rộng tối đa như phôi nang tự thoát màng theo sinh lý thông thường. Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Kirkegaard K và CS (2012), nghiên cứu này cho thấy phôi được đục lỗ màng

trong suốt hỗ trợ thoát màng từ giai đoạn phôi phân cắt, tại thời điểm thoát màng, kích thước của những phôi này sẽ nhỏ hơn có ý nghĩa so với những phôi phát triển tự nhiên [6]. Phân tích theo nhóm, chúng tôi chưa nhận thấy sự khác biệt có ý nghĩa về đường kính trung bình của phôi tại thời điểm trước sinh thiết giữa các nhóm tuổi mẹ ($p > 0,05$).



Hình 1. Ảnh đo phôi nang H1 trước sinh thiết của BN N. T. H.

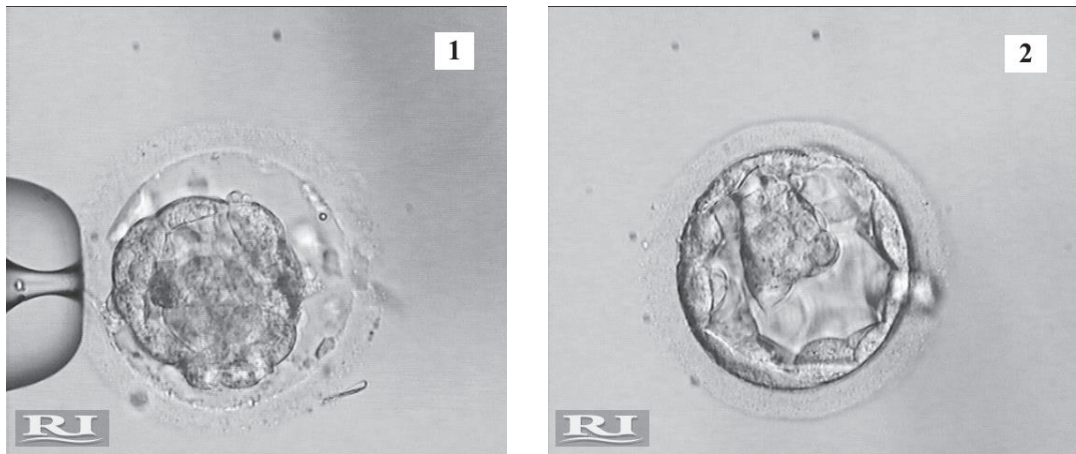
(Kính hiển vi đảo ngược x 200)

Nguồn: BN nghiên cứu tại Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội.

Độ dày màng trong suốt trung bình thu được trong nghiên cứu thể hiện ở bảng 1 là $16,43 \pm 2,39\mu\text{m}$. Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của Coello A và CS (2017). Theo nghiên cứu của nhóm tác giả này, độ dày màng trong suốt của phôi nang dao động trung bình từ 12 - $19\mu\text{m}$ [7].

2. Đặc điểm hình thái phôi xét nghiệm di truyền sau sinh thiết 3 giờ

Quan sát 623 phôi, chúng tôi nhận thấy: Sau sinh thiết, 97,1% phôi nở lại, 100% phôi sống, không có phôi nào bị thoái hóa. Kết quả này của chúng tôi phù hợp với kết quả nhiều nghiên cứu đã thực hiện trước đây cho thấy kỹ thuật sinh thiết không ảnh hưởng tới sức sống cũng như tiềm năng phát triển của phôi [8, 2, 9].



Hình 2. Phôi nang T2 nở lại sau sinh thiết 3 giờ của BN Đ. T. P. T.
(Kính hiển vi đảo ngược x 200)

(1: Hình ảnh phôi ngay sau sinh thiết. 2: Hình ảnh phôi sau sinh thiết 3 giờ)
Nguồn: BN nghiên cứu tại Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội.

Bảng 2. Độ dày màng trong suốt, đường kính của phôi nang giữa hai thời điểm trước sinh thiết và sau sinh thiết 3 giờ ở mỗi nhóm tuổi mẹ.

Nhóm	Độ dày màng trong suốt (μm)		Đường kính phôi (μm)	
	$\bar{X} \pm SD$ (min - max)		$\bar{X} \pm SD$ (min - max)	
	Trước sinh thiết	Sau sinh thiết 3 giờ	Trước sinh thiết	Sau sinh thiết 3 giờ
Nhóm 1 (n = 92)	16,69 ± 2,47 (11,8 - 21,6)	16,66 ± 2,46 (11,9 - 21,5)	138,17 ± 11,9 (113,9 - 162,2)	137,97 ± 12,52 (111,1 - 163,7)
p*	p ₍₁₋₂₎ = 0,137		p ₍₃₋₄₎ = 0,001	
Nhóm 2 (n = 279)	16,16 ± 2,41 (11,4 - 21,7)	16,17 ± 2,43 (11,3 - 21,8)	137,12 ± 11,22 (114,9 - 160,2)	136,72 ± 11,87 (102,8 - 160,9)
p*	p ₍₁₋₂₎ = 0,579		p ₍₃₋₄₎ < 0,001	
Nhóm 3 (n = 252)	16,63 ± 2,31 (11,6 - 21,4)	16,6 ± 2,32 (11,5 - 21,5)	135,96 ± 11,81 (113 - 161,3)	135,75 ± 12,37 (108,9 - 162,2)
p*	p ₍₁₋₂₎ = 0,009		p ₍₃₋₄₎ < 0,001	
Tổng (n = 623)	16,43 ± 2,39 (11,4 - 21,7)	16,42 ± 2,39 (11,3 - 21,8)	136,81 ± 11,57 (113 - 162,2)	136,51 ± 12,17 (102,8 - 163,7)
p*	p ₍₁₋₂₎ = 0,060		p ₍₃₋₄₎ < 0,001	

(*Kiểm định Paired samples T-test)

So sánh giữa 2 thời điểm trước sinh thiết và sau sinh thiết, phân tích cho thấy tại thời điểm sau sinh thiết 3 giờ, đường kính phôi nói chung và trong từng nhóm nói riêng vẫn nhỏ hơn rõ rệt so với thời điểm trước sinh thiết ($p < 0,01$). Trong khi đó, độ dày màng trong suốt trung bình nói chung không có sự khác biệt giữa 2 thời điểm. Đường kính phôi và độ dày màng trong suốt phản ánh mức độ hồi phục của phôi về mặt kích thước. Tại thời điểm 3 giờ sau sinh thiết, số phôi nở lại hoàn toàn hoặc gần hoàn toàn so với trạng thái ban đầu (trạng thái trước sinh thiết) đạt 97,1%. Do vậy, kết quả đường kính phôi trung bình sau sinh thiết 3 giờ nhỏ hơn so với thời điểm trước sinh thiết là phù hợp, đây cũng là

lý do tạo nên sự thay đổi không đáng kể của độ dày màng trong suốt sau sinh thiết do màng trong suốt sẽ chỉ mỏng đi khi phôi phát triển mạnh mẽ với sự tăng thể tích rõ rệt của khoang phôi.

3. Đặc điểm hình thái phôi xét nghiệm di truyền sau rã đông 4 giờ

Trong 623 phôi sinh thiết có kết quả xét nghiệm NST rõ ràng được trữ đông, có 105 phôi chuẩn bội được rã đông và chuyển phôi cho BN. Sau rã đông 4 giờ, 100% phôi sống sót và nở lại. Kết quả của chúng tôi tương tự với kết quả nghiên cứu của Chen HH và CS (2017) trên 357 phôi sinh thiết hay nghiên cứu của Allen M và CS (2022) trên 196 phôi nang chuẩn bội cũng chỉ ra sau rã đông, 100% phôi sống và nở lại.

Bảng 3. Độ dày màng trong suốt và đường kính phôi tại thời điểm trước sinh thiết và sau rã đông 4 giờ theo ba nhóm tuổi mẹ.

Nhóm	Độ dày màng trong suốt (μm)		Đường kính phôi (μm)	
	$\bar{X} \pm \text{SD}$ (min - max)		$\bar{X} \pm \text{SD}$ (min - max)	
	Trước sinh thiết	Sau rã đông 4 giờ	Trước sinh thiết	Sau rã đông 4 giờ
Nhóm 1 (n = 18)	16,57 $\pm$ 2,47 (11,8 - 20,1)	16,31 $\pm$ 2,43 (11,7 - 20,1)	142,76 $\pm$ 11,74 (117,9 - 158,3)	144,11 $\pm$ 11,9 (119 - 160,5)
p*	p ₍₁₋₂₎ = 0,018		p ₍₃₋₄₎ < 0,001	
Nhóm 2 (n = 52)	15,83 $\pm$ 2,44 (12 - 21,3)	15,69 $\pm$ 2,43 (12,1 - 21,4)	137,43 $\pm$ 11,1 (121,4 - 160)	138,94 $\pm$ 11,24 (122,9 - 162,2)
p*	p ₍₁₋₂₎ = 0,001		p ₍₃₋₄₎ < 0,001	
Nhóm 3 (n = 35)	16,83 $\pm$ 2,07 (12,5 - 20,9)	16,59 $\pm$ 2,12 (12,5 - 20,9)	140,13 $\pm$ 10,74 (120,2 - 158,8)	141,65 $\pm$ 10,95 (122 - 159,4)
p*	p ₍₁₋₂₎ < 0,001		p ₍₃₋₄₎ < 0,001	
Tổng (n = 105)	16,29 $\pm$ 2,35 (11,8 - 21,3)	16,1 $\pm$ 2,34 (11,7 - 21,4)	139,24 $\pm$ 11,17 (117,9 - 160)	140,73 $\pm$ 11,32 (119 - 162,2)
p*	p ₍₁₋₂₎ < 0,001		p ₍₃₋₄₎ < 0,001	

(*Kiểm định Paired samples T-test)

Đánh giá đường kính phôi và độ dày màng trong suốt của phôi theo nhóm tuổi mẹ tại thời điểm sau rã đông 4 giờ so với thời điểm trước sinh thiết, chúng tôi nhận thấy dù ở nhóm tuổi < 30, 30 - 35 hay > 35, phôi sau rã đông đều phát triển tốt, thể hiện bằng sự tăng đường kính trung bình phôi rõ rệt và màng trong suốt mỏng đi đáng kể so với thời điểm phôi trước sinh thiết ($p < 0,05$). Sự phát triển phôi tốt ở cả 3 nhóm tuổi như vậy có thể do tất cả các phôi được rã đông đều là phôi chuẩn bội. Qua đó, cho thấy tiềm năng phát triển rất tốt của các phôi sinh thiết xét nghiệm di truyền sau rã đông.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu, đánh giá sự thay đổi hình thái, cấu trúc phôi nang dưới tác động của kỹ thuật sinh thiết, chúng tôi nhận thấy:

Sau sinh thiết 3 giờ: 97,1% phôi nở lại, 100% phôi sống, không có phôi nào bị thoái hóa, tuy nhiên, đường kính phôi nói chung và trong từng nhóm tuổi mẹ nói riêng đều nhỏ hơn có ý nghĩa so với thời điểm trước sinh thiết.

Sau rã đông 4 giờ: 100% phôi sống và nở lại. Đường kính phôi lớn hơn đáng kể và màng trong suốt mỏng đi có ý nghĩa thống kê ở cả 3 nhóm so với thời điểm trước sinh thiết.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn BN đã đồng thuận tham

gia nghiên cứu, cảm ơn Đảng uỷ, Ban Giám đốc Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội cùng tập thể chuyên viên phôi học của viện đã hỗ trợ tận tình giúp đỡ chúng tôi hoàn thành được nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen HH, Huang CC, Cheng EH, et al. Optimal timing of blastocyst vitrification after trophectoderm biopsy for preimplantation genetic screening. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0185747.
2. Cimadomo D, Capalbo A, Levi-Setti PE, et al. Associations of blastocyst features, trophectoderm biopsy and other laboratory practice with post-warming behavior and implantation. *Hum Reprod*. 2018; 33(11):1992-2001.
3. Zhao H, Tao W, Li M, et al. Comparison of two protocols of blastocyst biopsy submitted to preimplantation genetic testing for aneuploidies: A randomized controlled trial. *Arch Gynecol Obstet*. 2019; 299(5):1487-1493.
4. Đoàn Thị Hằng. Nghiên cứu biến đổi hình thái cấu trúc phôi người ngày 3, ngày 5 trước đông lạnh và sau rã đông bằng kỹ thuật thủy tinh hoá. *Luận án Tiến sĩ Y học*, Học viện Quân y. 2013.
5. Dương Đình Hiếu. Nghiên cứu hình thái và đánh giá liên tục phôi 3 và 5 ngày tuổi của bệnh nhân thụ tinh trong ống nghiệm. *Luận án Tiến sĩ Y học*, Học viện Quân y. 2016.

6. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Human embryonic development after blastomere removal: A time-lapse analysis. *Hum Reprod.* 2012; 27(1):97-105.
7. Coello A, Meseguer M, Galán A, et al. Analysis of the morphological dynamics of blastocysts after vitrification/warming: Defining new predictive variables of implantation. *Fertil Steril.* 2017; 108(4):659-666.e654.
8. Scott RT Jr, 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.
9. Capalbo A, Ubaldi FM, Cimadomo D, et al. Consistent and reproducible outcomes of blastocyst biopsy and aneuploidy screening across different biopsy practitioners: A multicentre study involving 2586 embryo biopsies. *Hum Reprod.* 2016; 31(1):199-208.