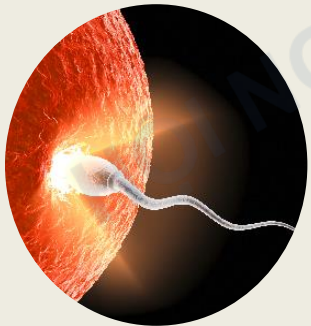
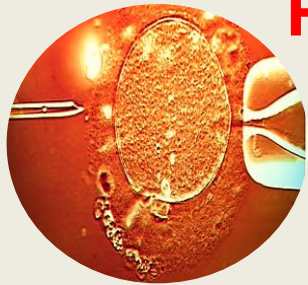


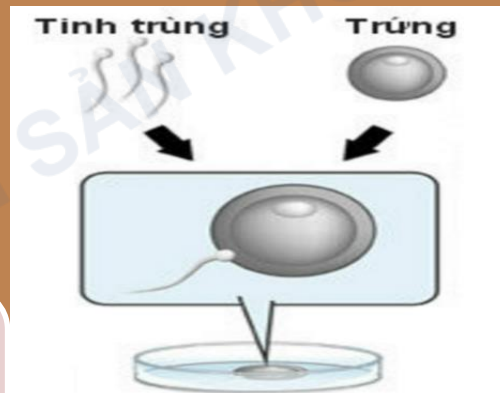
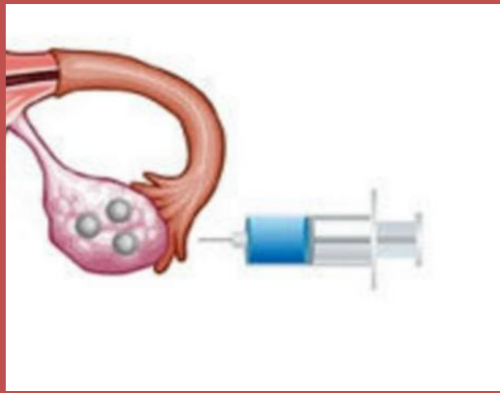
PHÂN TÍCH DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI ỨNG DỤNG TRONG HỖ TRỢ SINH SẢN



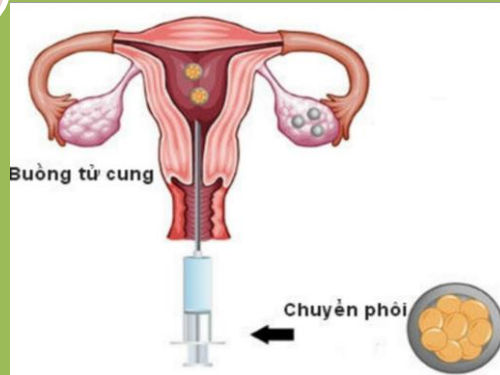
PGS.TS. Nguyễn Duy Ánh
Giám đốc Bệnh viện Phụ sản Hà Nội

GHỊ TỰ VẤN DI TRUYỀN SẴN KHOA 2018

THỤ TINH TRONG ỐNG NGHIỆM (IVF)

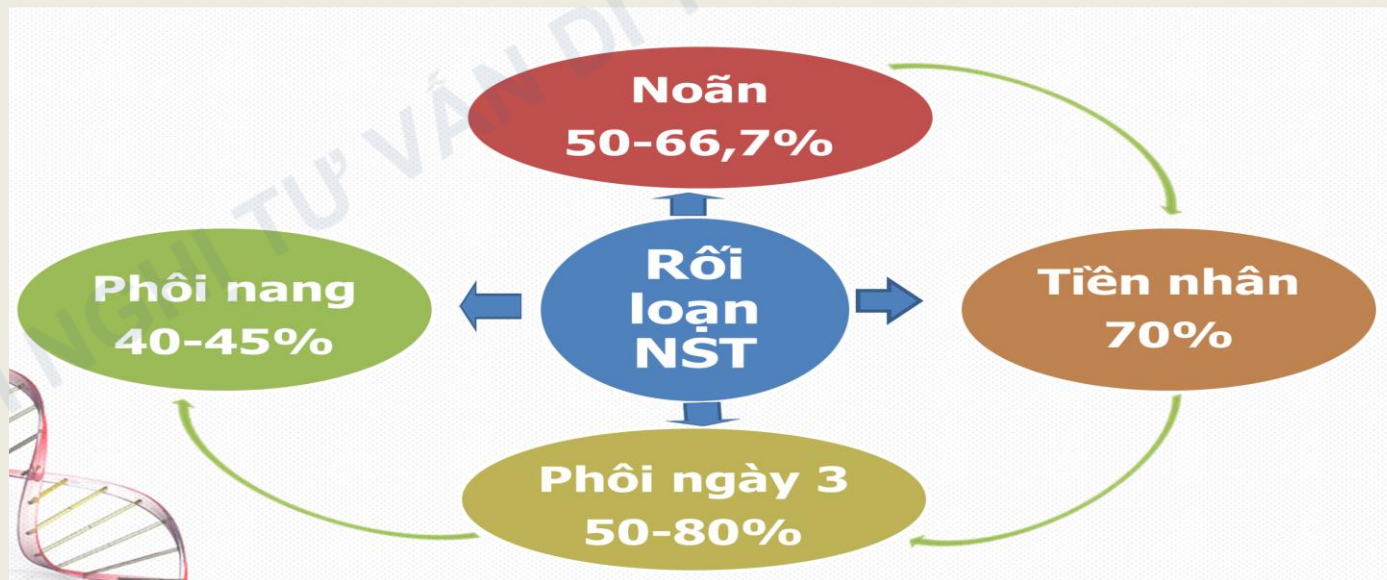


IVF



THỤ TINH TRONG ỒNG NGHIỆM (IVF)

- Phương pháp điều trị vô sinh hiệu quả (1978)
- Tỷ lệ thành công vẫn chỉ $\leq 50\%$
- Nguyên nhân chính do bất thường NST



THỤ TINH TRONG ống NGHIỆM

Quy trình kỹ thuật IVF

Bước 1: Chuẩn bị noãn



Bước 2: Cho noãn thụ tinh với tinh trùng



Bước 3: Chọn lựa phôi

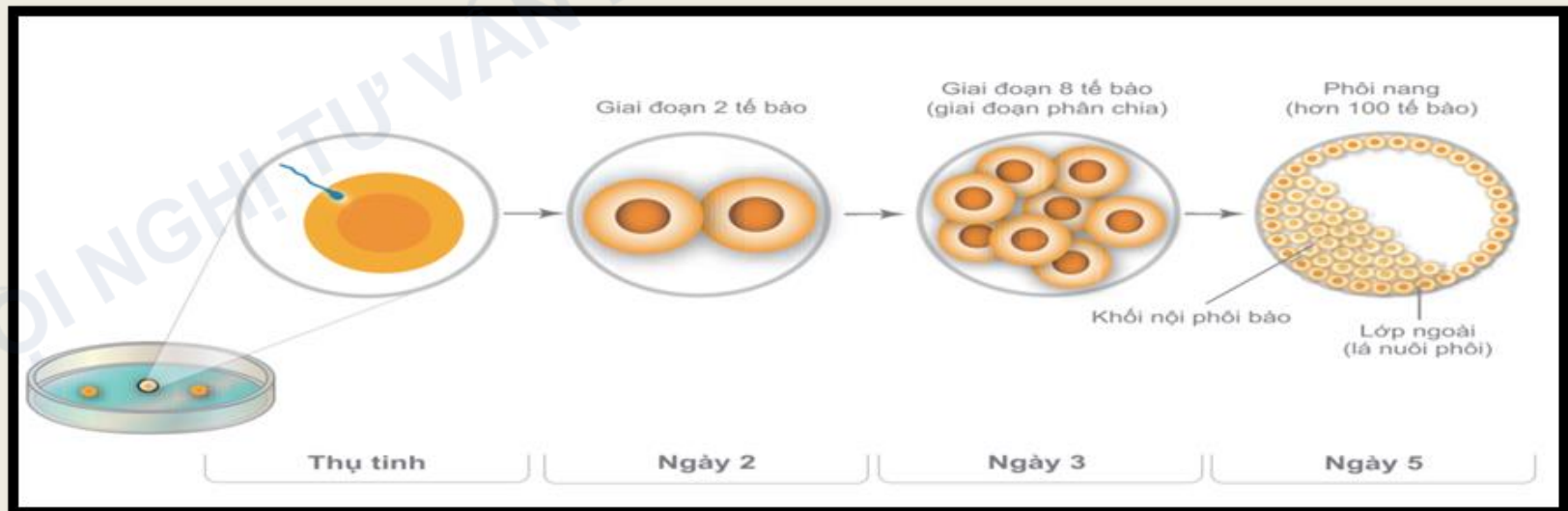


Bước 4: Chuyển phôi vào buồng tử cung

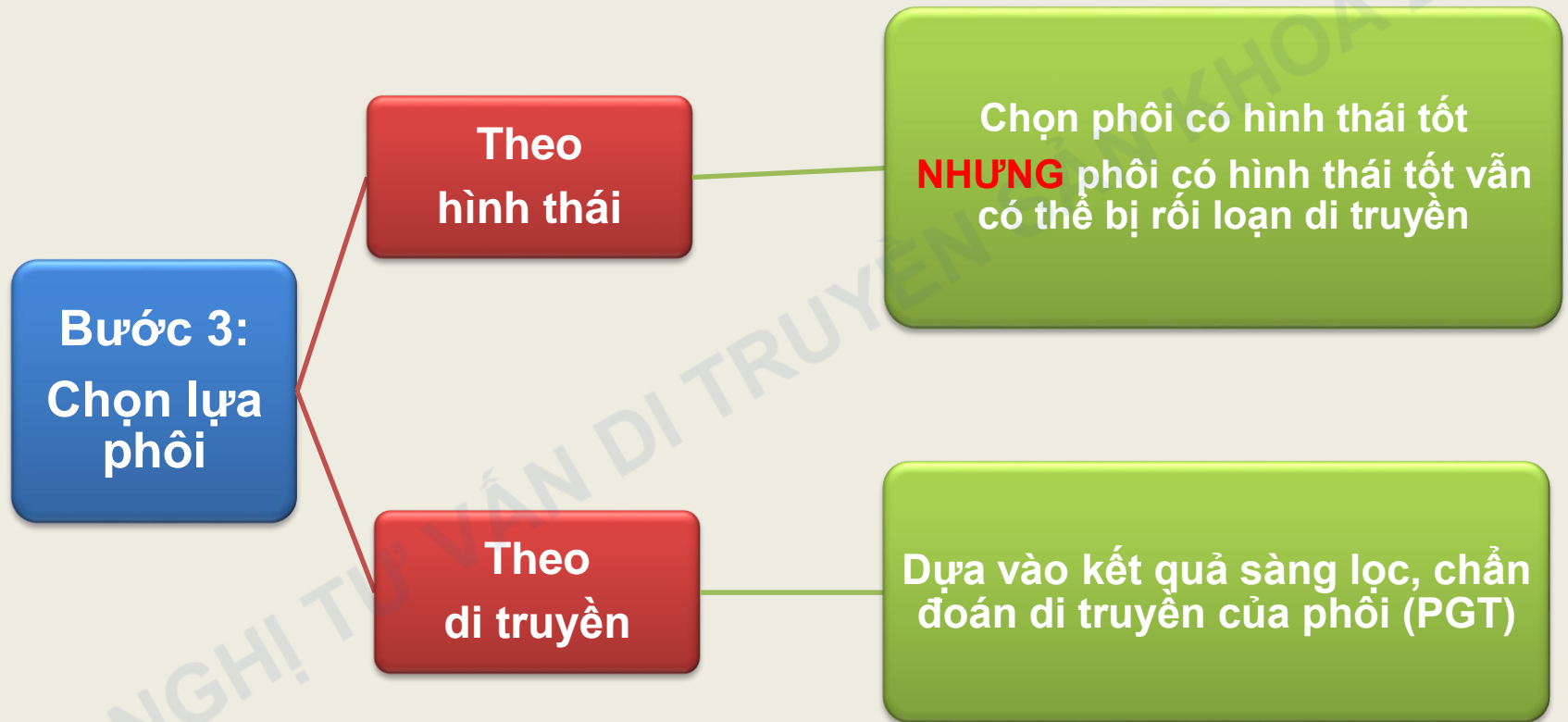


THỤ TINH TRONG ỐNG NGHIỆM

- Sau khi thụ tinh, hợp tử bắt đầu quá trình phân chia, tạo thành các tế bào nhỏ gọi là phôi bào:
 - Phôi ở giai đoạn tiền nhân (ngày 1).
 - Phôi ở giai đoạn phân chia (ngày 2-3).
 - Phôi dâu (phôi ngày 4).
 - Phôi nang (phôi ngày 5-6).



THỤ TINH TRONG ỒNG NGHIỆM



HỘI NGHỊ THƯỜNG NIÊN DI TRUYỀN HỌC 2018

PHÂN TÍCH DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI (Preimplantation Genetic Testing-PGT)

Khái niệm: kỹ thuật phân tích ADN của noãn (thể cực) hoặc phôi, xác định sự phù hợp HLA hoặc bất thường di truyền, gồm¹:

- PGT-A (PGS): phân tích dị bội.
- PGT-M (PGD): phân tích trước chuyển phôi bệnh đơn gen.
- PGT-SR: phân tích trước chuyển phôi rối loạn cấu trúc NST.

Mục đích:

- Em bé khỏe mạnh, tránh tổn thương gen sang thế hệ sau.
- Tăng tỷ lệ thành công thụ tinh ống nghiệm
- Chuyển cấy phôi đơn, tránh các rủi ro và biến chứng liên quan đến trường hợp đa thai.

¹Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. Human Reproduction (Oxford, England). 2017;32(9):1786-1801.

PHÂN TÍCH DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI (PGT)

Chỉ định PGT

- Có tiền sử sảy thai nhiều lần
- Đã làm IVF nhiều lần nhưng không thành công
- Phụ nữ lớn tuổi
- Cặp vợ chồng có bệnh lý di truyền: Bệnh Thalassemia, Hemophilia, bệnh Tay-sach, bệnh loạn dưỡng cơ Duchen, Lựa chọn giới tính cho các gia đình có bệnh di truyền liên quan đến NST giới tính...
- TH cần HLA phù hợp

PHÂN TÍCH DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI (PGT)

PGT-A: sàng lọc dị bội

- Sàng lọc rối loạn 23 cặp nhiễm sắc thể.
- Cải thiện thành công của IVF.
- Không cần cá thể hóa kỹ thuật trước (sử dụng kit có sẵn).

PGT-M: chẩn đoán bệnh đơn gen, đã xác định ở 1 cá thể trong gia đình

- Tránh truyền gen bệnh sang thế hệ tiếp theo.
- Cần cá thể hóa kỹ thuật xét nghiệm trước.

PHÂN TÍCH DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI-PGT

Quy trình IVF/PGT



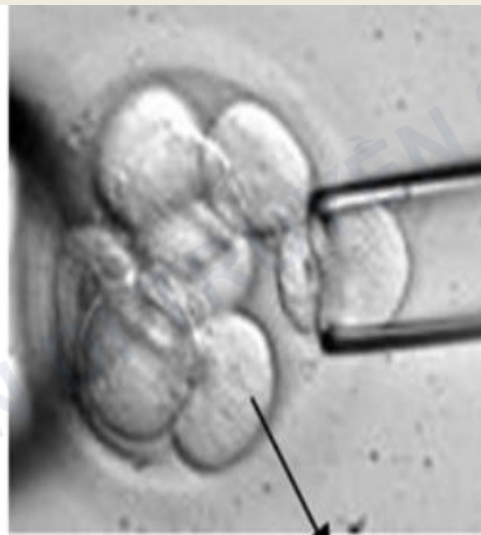
HỘI NGHỊ TỰ LẬP ANH DI TRUYỀN SẢN KHOA 2018

KỸ THUẬT SINH THIẾT PHÔI

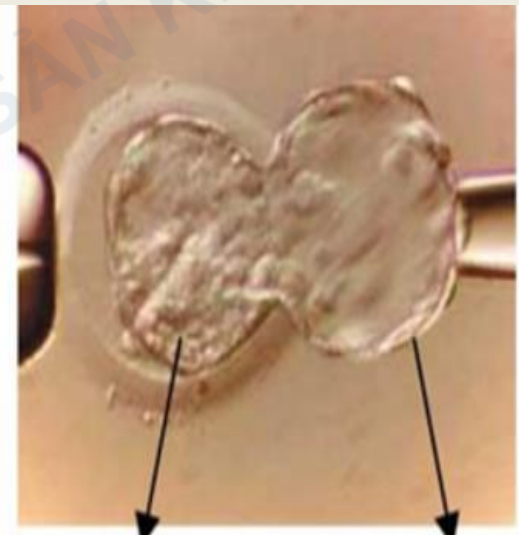
3 giai đoạn thực hiện sinh thiết phôi



Thể cực



Phôi bào



Khối phôi bào
(inner cell mass)

Tế bào ngoài phôi
(trophoblast)

CÁC KỸ THUẬT PHÂN TÍCH DI TRUYỀN PHÔI

- Từ năm 1992 đến nay, đã có nhiều kỹ thuật di truyền được ứng dụng để phát hiện các rối loạn NST, các bệnh lý đơn gen cho phôi IVF:



- Mỗi kỹ thuật đều có ưu và nhược điểm khác nhau, các kỹ thuật ra đời sau khắc phục những hạn chế của kỹ thuật ra đời trước đó.



Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ-FISH

- Nguyên lý kỹ thuật:

- KT di truyền tế bào - phân tử.
- Số lượng giới hạn NST (tối đa là 12 cặp NST).
- Chỉ kiểm tra được từ 1 tế bào phôi > âm tính giả cao.
- FISH không làm tăng hiệu PGS.
- **Hiện nay FISH ít được ứng dụng trong PGS.**

Kỹ thuật lai so sánh bộ gen-CGH

❖ Nguyên lý kỹ thuật:

- Là kỹ thuật di truyền tế bào phân tử.
- Năm 2000, Voullaire tiên phong ứng dụng kỹ thuật CGH.
- Phát hiện ra bất thường trên 23 cặp NST.
- CGH cho phép phát hiện thể khảm.

❖ Hạn chế:

- CGH không thể phát hiện rối loạn cấu trúc cân bằng, chuyển đoạn NST cân bằng và hoặc NST vòng.
- Không thể phát hiện bất thường tổn thương nhỏ hơn 5-10 Mb.
- Thời gian phân tích kết quả lâu khoảng 3-4 ngày.



Kỹ thuật lai so sánh bộ gen dùng chíp DNA (aCGH)

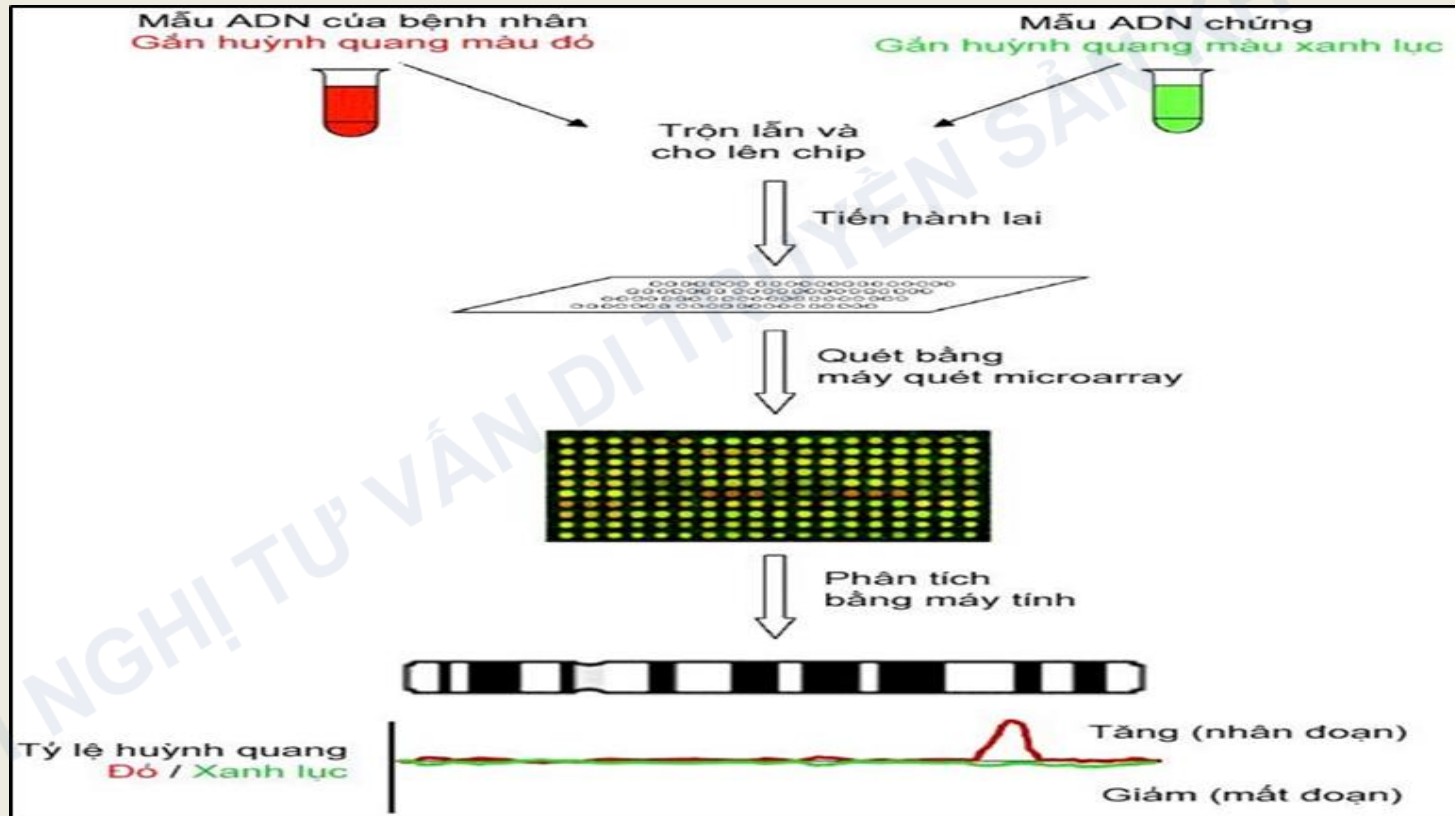
- Nguyên lý kỹ thuật:

- Phát triển từ kỹ thuật CGH
- a-CGH thực hiện việc so sánh mẫu ADN cần phân tích với mẫu ADN chứng và thông qua sự khác biệt giữa 2 ADN này để phát hiện các trường hợp mất đoạn hoặc nhân đoạn nếu có trên ADN.
- a-CGH được dựa trên khả năng bắt cặp hoặc còn được gọi một cách khác là lai giữa một mạch đơn của ADN này và một mạch đơn của ADN khác theo nguyên tắc bổ sung giữa các bazơ adenin (A) và Tymin (T), Guanin (G) và Cytôzin (C) của các nuclêotit.



KT lai so sánh bộ gen dùng chip DNA-aCGH

Quy trình thực hiện



KT lai so sánh bộ gen dùng chip DNA-aCGH

Ứng dụng aCGH trong PGT

- Năm 2004.
- Năm 2010, ứng dụng rộng rãi ở Hoa kỳ và Châu Âu = tiêu chuẩn vàng.
- ❖ **Ưu điểm:**
 - + a-CGH phân tích một cách toàn diện bộ NST.
 - + Xác định chính xác các bất thường không cân bằng của NST
 - + Thể khám tỷ lệ cao.
- ❖ **Hạn chế:**
 - + Không phát hiện được chuyển đoạn cân bằng và đảo đoạn.
 - + a-CGH không phân biệt được các trường hợp thể tam nhiễm với các trường hợp chuyển đoạn Robertson không cân bằng.

Kỹ thuật KaryoLite BoBs

❖ Nguyên lý kỹ thuật:

- Công nghệ mới được gọi là KaryoLite™ trên Beads (KL-BoBs).
- Được phát triển trên nguyên lý của lai bộ gen so sánh để phát hiện số lượng bản sao DNA.

❖ Ưu điểm:

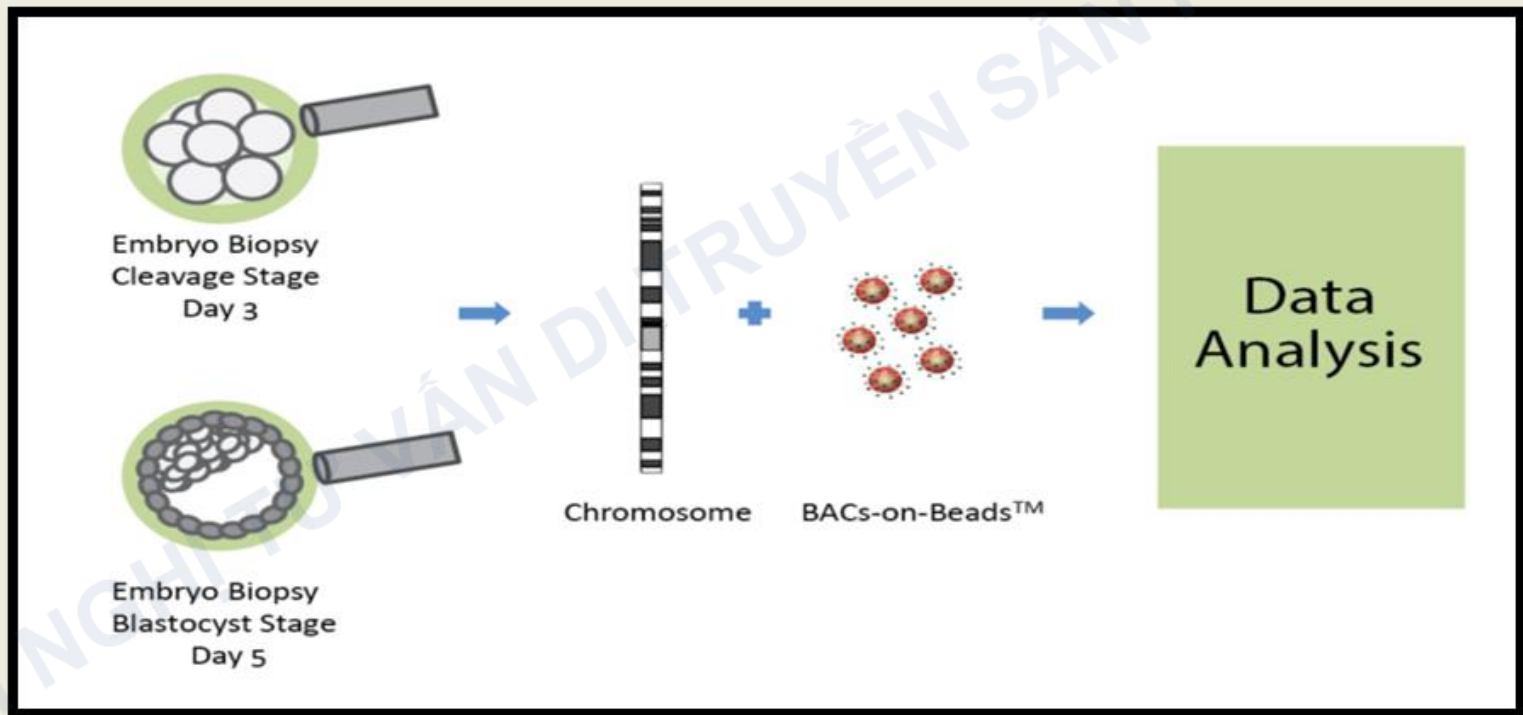
- Phát hiện bất thường 23 cặp NST.
- Nhanh 24h.
- Chỉ cần 50ng DNA.
- Không cần nuôi cấy để tăng sinh số lượng tế bào.

❖ Nhược điểm:

- Không phát hiện được **thể đa bội** do phụ thuộc số lượng probe được lai.

Kỹ thuật KaryoLite BoBs

Quy trình thực hiện



Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới - NGS

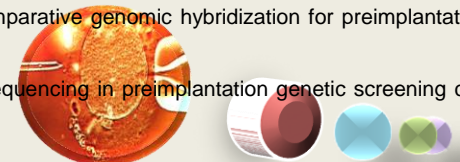
- PGT/ NGS: dựa trên việc giải trình tự toàn bộ hệ gen.
- Phát hiện dị bội của cả 23 cặp nhiễm sắc thể.
- Có độ phân giải cao hơn, phát hiện NST lỗi đoạn, lặp đoạn hoặc mất đoạn một cách chính xác (99.9%) , độ nhạy 100%^{1, 2}.
- Có thể phát hiện các trường hợp thể khảm với độ nhạy cao hơn ³.
- PGT/ NGS và PGT/ a-CGH: tỷ lệ có thai ở **NGS (73,3%)** vs **aCGH (60,5%)** ⁴.

¹ Wells D, Kaur K, Grifo J, Glassner M, Taylor JC, Fragouli E, et al. Clinical utilisation of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation. J Med Genet. 2014;51:553–62

² Fiorentino F, Biricik A, Bono S, Spizzichino L, Cotroneo E, Cottone G, et al. Development and validation of a next-generation sequencing (NGS)-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. Fertil Steril. 2014;101:1375–82.

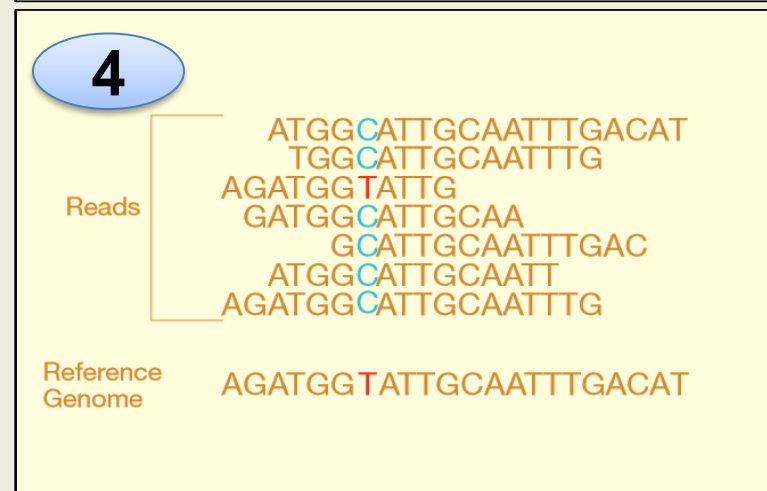
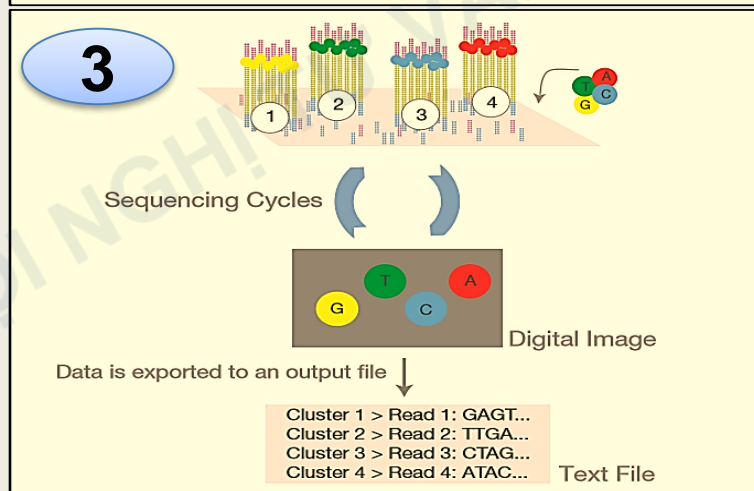
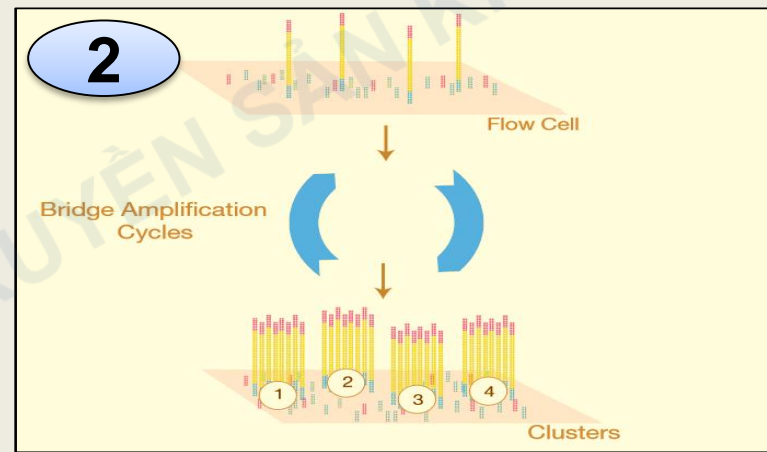
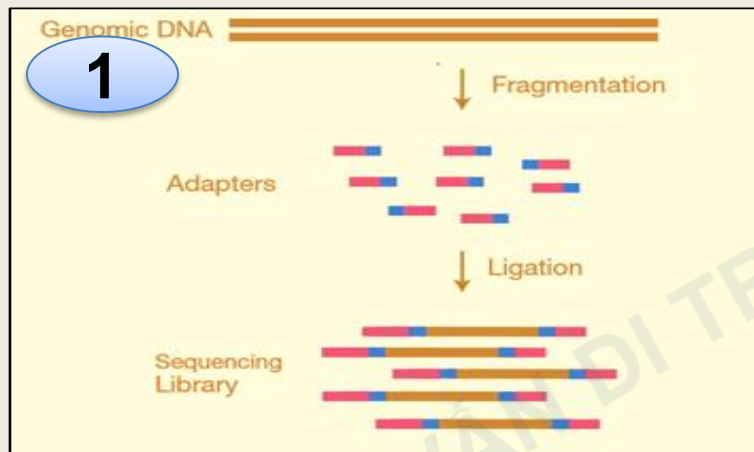
³ Yang Z, Lin J, Zhang J, Fong WI, Li P, Zhao R et al. Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: a pilot study. BMC Med Genomics 2015

⁴ Lai H.-H., Chuang T.-H., Wong L.-K., et al. (2017) Identification of mosaic and segmental aneuploidies by next-generation sequencing in preimplantation genetic screening can improve clinical outcomes compared to array-comparative genomic hybridization. Molecular Cytogenetics, 10 (1), 14.



Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới - NGS

Quy trình thực hiện



MỘT SỐ ỨNG DỤNG PGT TẠI VIỆT NAM

- **PGT-A:** sàng lọc rối loạn nhiễm sắc thể bằng kỹ thuật giải trình tự thể hệ mới.
- **PGT-M: Chẩn đoán trước chuyển phôi bệnh.**
 - + Anpha Thalasemia.
 - + Beta Thalasemia.
 - + Bệnh teo cơ tủy.
 - + Hemophilia
 - ...

KẾT LUẬN

- PGT là yêu cầu cấp thiết và thực tiễn, giúp cho IVF đạt kết quả cao đảm bảo cho ra đời một thể hệ khỏe mạnh về thể lực, sáng suốt về tinh thần, góp phần nâng cao chất lượng dân số.
- PGT-A/ NGS là kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới giúp sàng lọc rối loạn của cả cặp 23 NST (số lượng + cấu trúc) và có tiềm năng kết hợp với chẩn đoán các bệnh lý đơn gen khác.
- PGT-M: kiểm tra trước và cá thể hóa kỹ thuật chẩn đoán là yêu cầu bắt buộc > đảm bảo độ chính xác của kết quả.



Trân trọng cảm ơn!

