

# KỸ THUẬT SINH THIẾT PHÔI

KHOA HIỂM MUỘN BV TỪ DŨ

**CNXN NGUYỄN THIỆN THỰC**

**Team IVFLab Từ Dũ**



# NỘI DUNG TRÌNH BÀY

- 1 ĐẶT VẤN ĐỀ
- 2 QUY TRÌNH SINH THIẾT
- 3 CÁC VẤN ĐỀ LƯU Ý
- 4 KẾT LUẬN



# I. ĐẶT VẤN ĐỀ

**PGT** (Preimplantation Genetic Testing)

Kỹ thuật phân tích di truyền tiền làm tổ

**PGS** : (Preimplantation Genetic Screening)

Sàng lọc: Sảy thai liên tiếp  $\geq 3$  lần, Vợ lớn tuổi ( $\geq 36$  tuổi) - IVF thất bại nhiều lần ( $\geq 3$  lần) - Chồng vô sinh nặng (mất đoạn AZF)

**PGD** : (Preimplantation Genetic Diagnosis)

Chẩn đoán: nguy cơ di truyền từ Cha – Mẹ Hoặc cả Cha và Mẹ





# I. ĐẶT VẤN ĐỀ

- 1967 *Ewards-Gardner* báo cáo thành công sinh thiết phôi và xác định giới tính từ phôi thỏ
- Cùng những năm này *Handyside* và *CS* sinh thiết và chẩn đoán bệnh liên quan đến NST X, bệnh xơ nang. 1990 báo cáo ca thai đầu tiên
- 1992 *Grifo & cs* báo cáo ca thai đầu tiên sau sinh thiết phôi người tại Mỹ



# I. ĐẶT VẤN ĐỀ

## Bệnh viện Từ Dũ

-  2010 *Ths Bs Vũ Bích Thủy & cộng sự* thực nghiệm sinh thiết phôi bào trên phôi hiến tặng (*phương pháp lai huỳnh quang tại chỗ*)
-  12/2017 – 3/2018 khoa Hiếm Muộn Từ Dũ thực hiện sinh thiết tế bào lá nuôi (trophectoderm) từ phôi nang

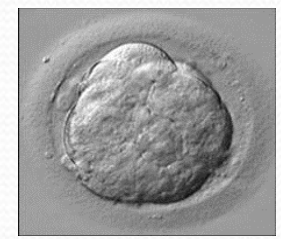
# I. ĐẶT VẤN ĐỀ



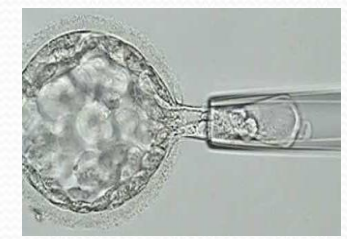
1988 Yury  
1990 Verlinsky



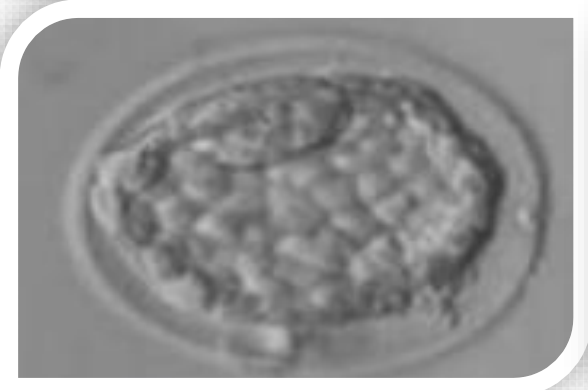
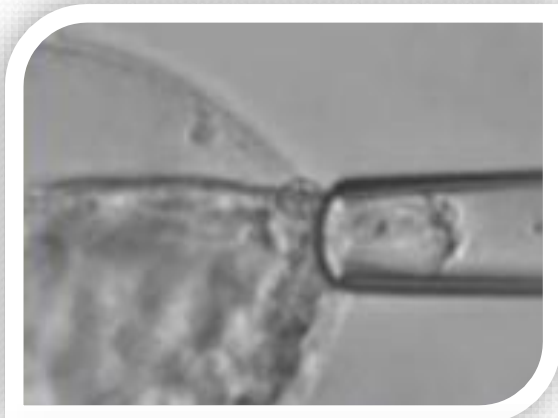
1986 *Leeanda Wilton*,  
1987 Steirteghem, Andre  
van, Handyside and Monk  
2007 Magli et al.,



1988 *Audrey Muggleton-  
Harris and Marilyn Monk*,  
1997 Veiga cs,  
2005, 2007 Kokkali



# QUY TRÌNH SINH THIẾT PHÔI NANG



## II. QUY TRÌNH SINH THIẾT



Mục tiêu

Thực hiện quy trình sinh thiết phôi nang



Đối tượng

1. Tuổi mẹ > 35
2. Sảy thai liên tiếp. Hoặc có chu kỳ IVF thất bại
3. Vợ chồng hoặc ít nhất 1 đã có bất thường nhiễm sắc thể
4. Chồng OAT nặng cần phải ICSI
5. Có chu kỳ điều trị bằng phương pháp TTTON



# II. QUY TRÌNH SINH THIẾT

## Trang thiết bị cần thiết



MicroPipette



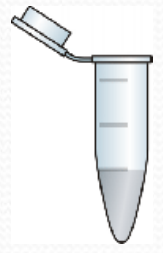
Petri dishes



Marker



Pipettes pasture



Tubes chứa mẫu



Hộp chứa mẫu và tubes



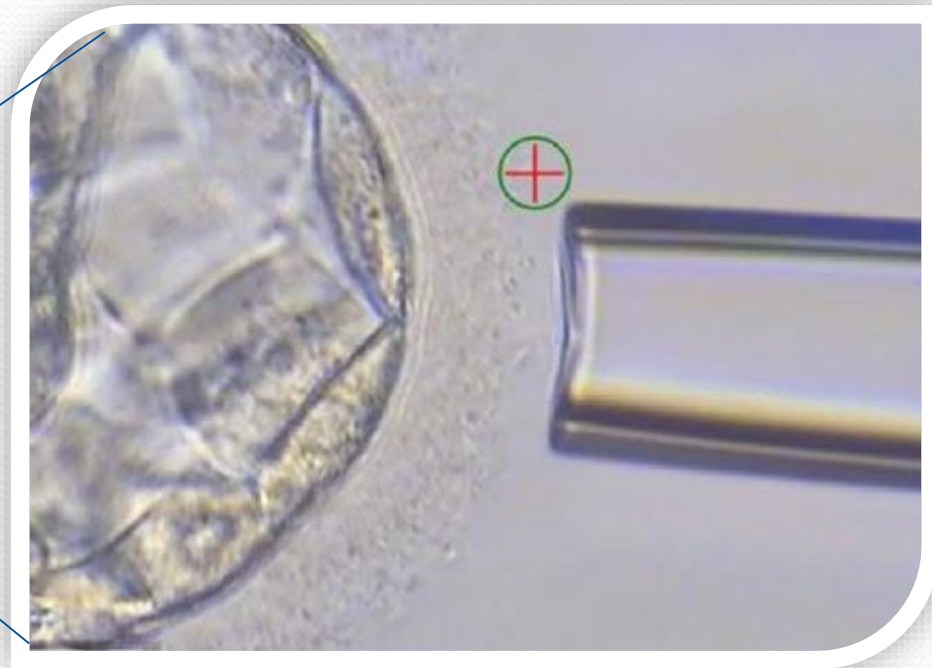
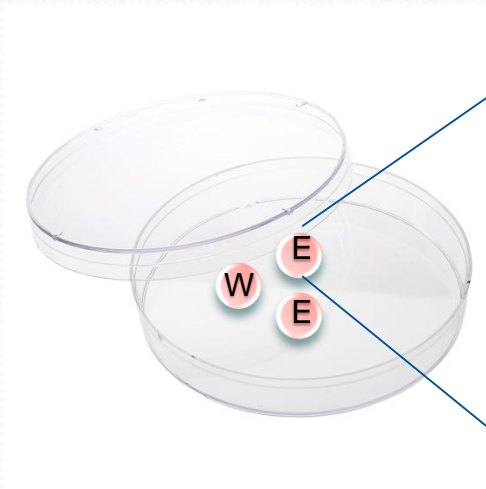
- Thời điểm
- Nhân sự
- Setup và vận hành trước sinh thiết



## II. QUY TRÌNH SINH THIẾT



Thực hiện dưới sự kiểm tra và ghi nhận đủ thông tin quản lí từng phôi

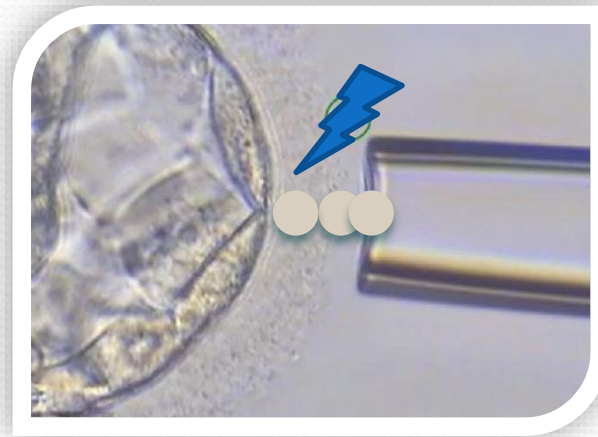
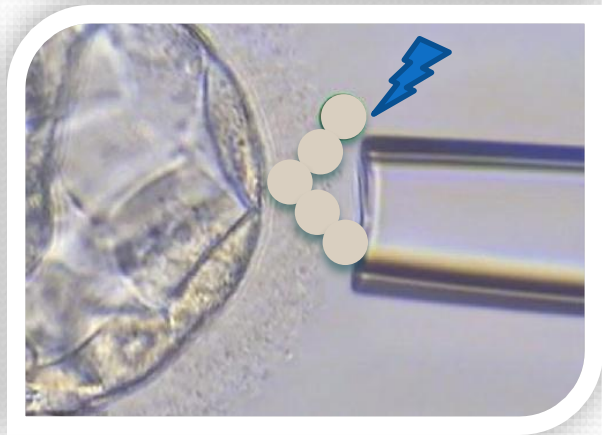


Định hướng các tế bào TE mục tiêu

## II. QUY TRÌNH SINH THIẾT



Thực hiện dưới sự kiểm tra và ghi nhận đủ thông tin quản lí từng phôi

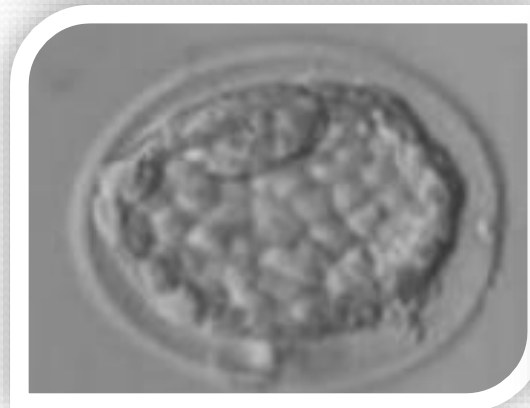
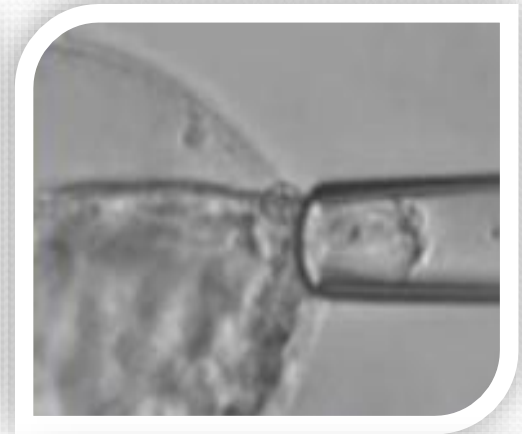
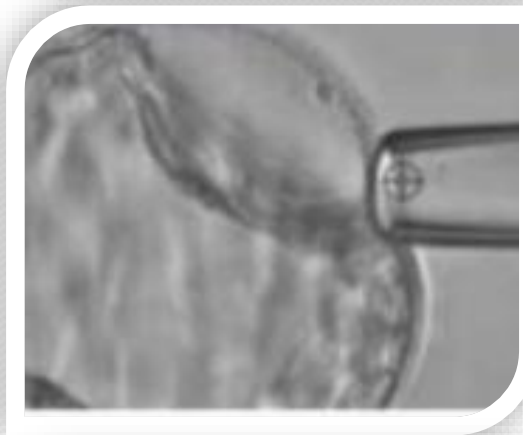


Cắt màng zona pellucida (ZP)

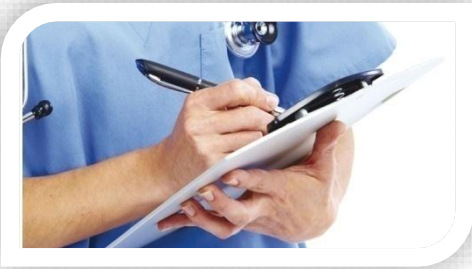
## II. QUY TRÌNH SINH THIẾT



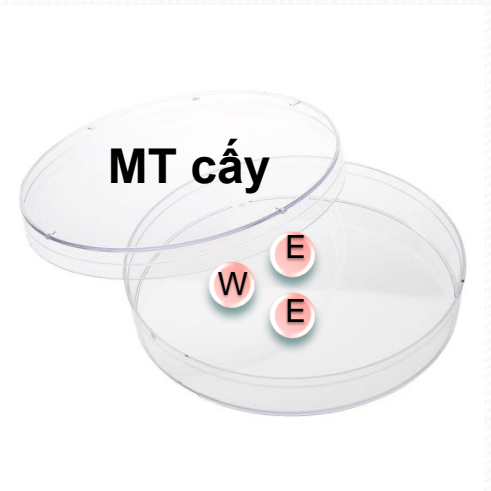
Thực hiện dưới sự kiểm tra và ghi nhận đủ thông tin quản lí từng phôi



# II. QUY TRÌNH SINH THIẾT



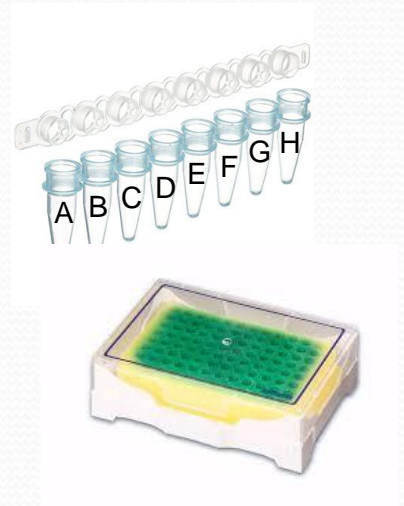
Thực hiện dưới sự kiểm tra và ghi nhận đủ thông tin quản lí từng phôi



Tê bào TE sau sinh thiết



Rửa phôi



Phân tích và kết quả



# II. QUY TRÌNH SINH THIẾT



HỌ TÊN	MÃ PHÔI	KẾT QUẢ	KẾT LUẬN
Bệnh nhân số 1	1A (3AA)	Gain 11q	Bất thường
	1B (3AB)	Loss 11q, Gain 22q	Bất thường
	1C (3BC)	Gain 22q	Bất thường
	1D (4BB)	Bình thường	Bình thường
	1E (3BB)	Bình thường	Bình thường
	1F (2CC)	Gain 11q, Loss 22q	Bất thường
Bệnh nhân số 2	2A (3BB)	Gain X, Gain Y	Bất thường
	2B (3BC)	Gain X, Gain Y	Bất thường
	2C (3BC)	Gain 11	Bất thường
	2D (3BB)	Bình thường	Bình thường
	2E (3BC)	Gain 22	Bất thường
Bệnh nhân số 3	3A (3BC)	Không có kết quả vì ít tế bào	
Bệnh nhân số 4	4A (4AB)	Bình thường	Bình thường
	4C (3CB)	Loss 1, 7, Gain 14	Bất thường



# III. NHỮNG VẤN ĐỀ CẦN LƯU Ý

## Điều kiện thực hiện

- ⊗ Tỷ lệ thụ tinh và nuôi cấy phôi ổn định (Magli và cộng sự, 2008)
- ⊗ Kỹ năng nhân sự cần được đào tạo (Harton và cộng sự, 2010a)

Human Reproduction, Vol.26, No.1 pp. 41–46, 2011

Advanced Access publication on October 21, 2010 doi:10.1093/humrep/deq265

human  
reproduction

ESHRE PAGES

## ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group—best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS)<sup>†</sup>

G.L. Harton<sup>1,\*</sup>, M.C. Magli<sup>2</sup>, K. Lundin<sup>3,4</sup>, M. Montag<sup>5</sup>, J. Lemmen<sup>6</sup>, and J.C. Harper<sup>7,8</sup>

<sup>1</sup>Reprogenetics LLC, Molecular Genetics, Livingston, NJ 07039, USA, formerly Genetics and IVF Institute, Preimplantation Genetic Diagnosis Laboratory, Fairfax, VA 22031, USA <sup>2</sup>SISMER, Reproductive Medicine Unit, V. Mazzini 12, 40138 Bologna, Italy <sup>3</sup>Reproductive Medicine, Sahlgrenska University Hospital, 413 45 Gothenburg, Sweden <sup>4</sup>Institute for Clinical Sciences, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden <sup>5</sup>Department of Endocrinology and Reproductive Medicine, University of Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, D-53127 Bonn, Germany <sup>6</sup>Fertility Clinic, Rigshospitalet Section 4071, 2100 Copenhagen, Denmark <sup>7</sup>UCL Centre for PG and D, Institute for Women's Health, University College London, London, UK <sup>8</sup>Centre for Reproductive and Genetic Health, UCL Hospital, Institute for Women's Health, London, UK

\*Correspondence address. E-mail: gharton@reprogenetics.com

Submitted on August 31, 2010; resubmitted on August 31, 2010; accepted on September 1, 2010

**ABSTRACT:** In 2005, the European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium published a set of Guidelines for Best Practice to give information, support and guidance to potential, existing and fledgling PGD programmes (Thornhill AR, De Die-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, Moutou C, Robinson MD, Schmutzler AG, Scriven PN *et al.* ESHRE PGD Consortium best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS). *Hum Reprod* 2005;**20**:35–48.). The subsequent years have seen the introduction of a number of new technologies as well as the evolution of current techniques. Additionally, in light of ESHRE's recent advice on how practice guidelines should be written and formulated, the Consortium believed it was timely to revise and update the PGD guidelines. Rather than one document that covers all of PGD as in the original publication, these guidelines are separated into four new documents that apply to different aspects of a PGD programme: Organization of a PGD centre, fluorescence *in situ* hybridization-based testing, amplification-based testing and polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). [Here we have updated the sections that pertain to embryology \(including cryopreservation\) and biopsy of embryos prior to PGD or PGS. Topics covered in this guideline include uses of embryo bio-](#) laboratory issues relating to biopsy, timing of biopsy, biopsy procedure and cryopreserving biopsied embryos.

# III. NHỮNG VẤN ĐỀ CẦN LƯU Ý

Sinh thiết thể cực ( Polar body)

Ưu điểm:

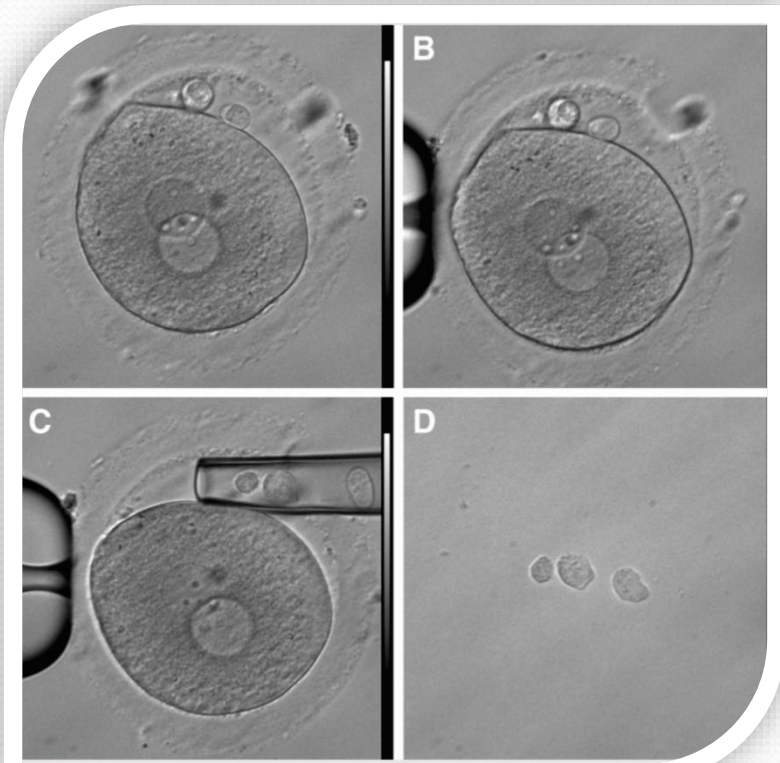
Ít ảnh hưởng quá trình phát triển phôi

Nhiều thời gian cho quy trình TTTON

Nhược điểm:

Chỉ biểu hiện gen từ mẹ

Cực cầu dễ vỡ trong lúc sinh thiết

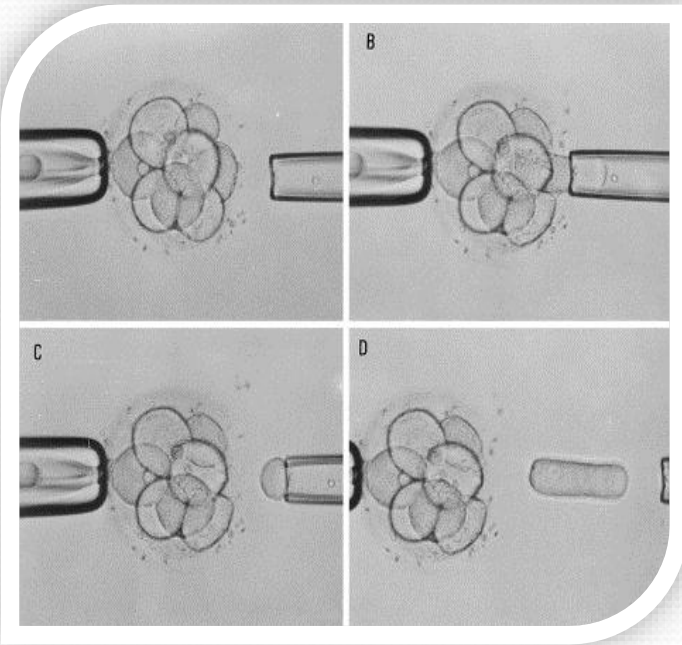


Montag. Polar body biopsy. Fertil Steril 2013.



### III. NHỮNG VẤN ĐỀ CẦN LƯU Ý

Sinh thiết phôi ngày 3



Ưu điểm:

Thể hiện tình trạng di truyền cả cha và mẹ

Phôi có thể phát triển bình thường sau sinh thiết

Nhược điểm:

Số lượng phôi bào ít



### III. NHỮNG VẤN ĐỀ CẦN LƯU Ý

Sinh thiết phôi nang

Ưu điểm:

- Nhiều tế bào -> tăng độ chính xác
- Thể khảm giảm ở giai đoạn phôi nang

Nhược điểm:

- Trữ lạnh phôi sau sinh thiết ( trừ khi các xét nghiệm có thể được hoàn thành trong vòng 24 giờ )
- Yêu cầu chuyển phôi D6



### III. NHỮNG VẤN ĐỀ CẦN LƯU Ý

#### Cắt màng ZP

Có thể thực hiện bằng cơ học, hóa học hoặc laser zona (Gianaroli et al., 2002. Harper và cộng sự, 2010 khuyến khích bằng laser ).

A. Tyrodes hoặc laser không được khuyến khích khi cắt màng ZP trứng trước thụ tinh (Malter và Cohen, 1989; Montag và cộng sự, 2004)

Kích thước khoảng cắt 25 – 30  $\mu\text{m}$  (*Embryo Biopsy - M. Boada and A. Veiga* )



### III. NHỮNG VẤN ĐỀ CẦN LƯU Ý

#### Số lượng tế bào sinh thiết tối thiểu

1- 2 phôi bào phôi ngày 3 (Goossens và cộng sự, 2008; De Vos và cộng sự, 2009).

5-6 tế bào hay nhiều tế bào TE phôi ngày 5 (Van de Velde et al., 2000; Goossens và cộng sự, 2008).



### III. NHỮNG VẤN ĐỀ CẦN LƯU Ý

#### Môi trường sinh thiết

Môi trường sinh thiết có hiện diện ion  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$

(Dumoulin et al., 1998), nhưng một số báo cáo không

khuyến khích sử dụng nó (McArthur et al., 2005).



## III. NHỮNG VẤN ĐỀ CẦN LƯU Ý

Trữ đông sau sinh thiết

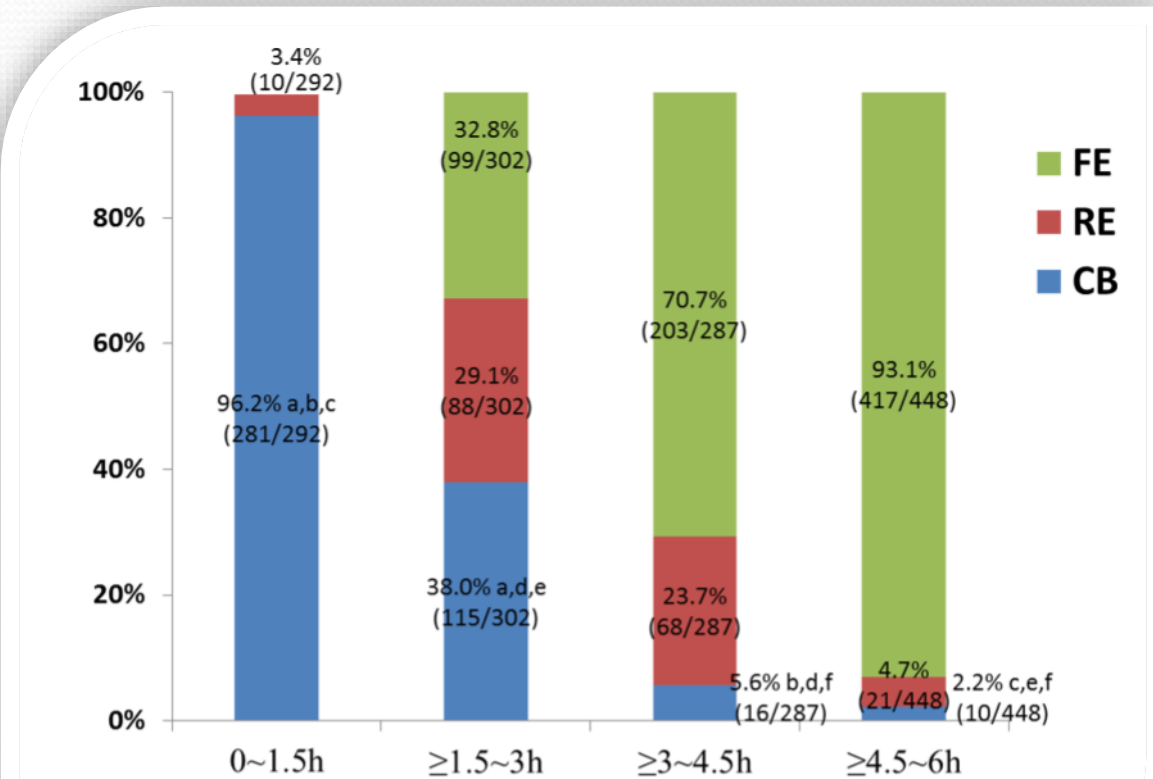
Optimal timing of blastocyst vitrification after trophectoderm biopsy for preimplantation genetic screening

Hsiu-Hui Chen<sup>1,2☉</sup>, Chun-Chia Huang<sup>1☉</sup>, En-Hui Cheng<sup>1</sup>, Tsung-Hsien Lee<sup>1,3,4,5</sup>, Lee-Feng Chien<sup>2\*</sup>, Maw-Sheng Lee<sup>1,3,4\*</sup>

1 Division of Infertility, Lee Women's Hospital, Taichung, Taiwan, 2 Department of Life Sciences, College of Life Sciences, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, 3 Institute of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan, 4 Department of Obstetrics and Gynecology, Chung Shan Medical University Hospital, Taichung, Taiwan, 5 Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

# III. NHỮNG VẤN ĐỀ CẦN LƯU Ý

## Trữ đông sau sinh thiết



**Fig 3. The expansion status of biopsied blastocysts cultivated *in vitro* for 0.5 to 6 h prior to cryopreservation.** Abbreviation: CB, collapsed blastocyst; RE, re-expansion but not full expansion; FE, full re-expansion or hatching. <sup>a, b, c, d, e, f</sup> Same superscript in the figure indicates statistical significance,  $p < 0.05$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185747.g003>





### III. NHỮNG VẤN ĐỀ CẦN LƯU Ý

#### Trữ đông sau sinh thiết

**Table 2. Clinical outcomes after embryo transfer of euploid blastocysts with different culture intervals before vitrification.**

	< 3h	≥ 3h	P value
Cycles (n)	44	179	-
Female age	32.6 ± 4.0	32.6 ± 4.3	0.859
ET no.	1.5 ± 0.5	1.6 ± 0.5	0.303
IR (%)	47.8 (32/67)	63.1 (183/290)	0.021
Clinical PR (%)	54.5 (24/44)	73.7 (132/179)	0.013
Ongoing PR (%)	50.0 (22/44)	67.0 (120/179)	0.035
Abortion rate (%)	8.3 (2/24)	9.2 (12/131)	0.134

In the table, percentages are used to describe categorical data and mean ± SD used to describe a set of continuous data.

Abbreviation: ET, embryo transfer; PR, pregnancy rate; IR, implantation rate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185747.t002>





## IV. KẾT LUẬN

- Sinh thiết là kĩ thuật xâm lấn
- Số lượng tế bào sinh thiết có thể ảnh hưởng đến sự phát triển phôi
- Sinh thiết tế bào TE chiếm ưu điểm và phổ biến
- Kết quả PGD/PGS tin cậy 95%



# Tài liệu tham khảo

- (1) Norbert Gleicher, Jacob Metzger<sup>5</sup>, Gist Croft, Vitaly A. Kushnir, David F. Albertini and David H Barad. A single trophectoderm biopsy at blastocyst stage is mathematically unable to determine embryo ploidy accurately enough for clinical use. *Reproductive Biology and Endocrinology* (2017)
- (2) Jonathan D. Kort & Ruth B. Lathi & Kathleen Brookfield & Valerie L. Baker & Qianying Zhao & Barry R. Behr, Aneuploidy rates and blastocyst formation after biopsy of morulae and early blastocysts on day 5, *J Assist Reprod Genet* (2015)
- (3) G.Kokkali, J.Traeger-Synodinos, C.Vrettou, D.Stavrou, G.M.Jones, D.S.Cram, E.Makrakis, A.O.Trounson, E.Kanavakis and K.Pantos, Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of b-thalassaemia: a pilot study, *Human Reproduction* Vol.22, No.5 pp. 1443–1449, 2007
- (4) G.L. Harton, M.C. Magli, K. Lundin, M. Montag, J. Lemmen, and J.C. Harper, ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group—best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS), *Human Reproduction*, Vol.0, No.0 pp. 1–6, 2010



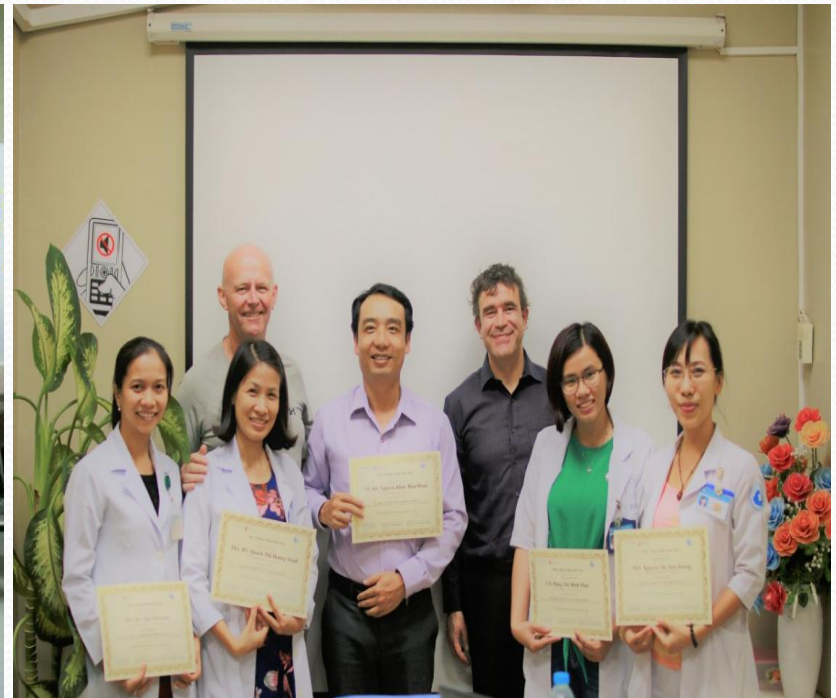
# Tài liệu tham khảo

- (5) *Selmo Geber and Marcos Sampaio*, Blastomere development after embryo biopsy: a new model to predict embryo development and to select for transfe, *Human Reproduction* vol.14 no.3 pp.782–786, 1999.
- (6) *Hsiu-Hui Chen, Chun-Chia Huang, En-Hui Cheng, Tsung-Hsien Lee, LeeFeng Chien, Maw-Sheng Lee*, Optimal timing of blastocyst vitrification after trophectoderm biopsy for preimplantation genetic screenin, *PLOS ONE* | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185747> October 5, 2017
- (7) *Geber et al*, Laser confers less embryo exposure than acid tyrode for embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis cycles: a randomized study, *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011
- (8) *Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology*, The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting, *Human Reproduction*, Vol.26, No.6 pp. 1270–1283, 2011.



# Tập huấn

## KT sinh thiết phôi trong quy trình TTTON





TỰ DÙ

WELCOME

Thank You for Your Attention