

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Phương Anh

**NGHIÊN CỨU TƯƠNG QUAN ĐA HÌNH GEN *TEX15* VỚI
VÔ SINH NAM Ở NGƯỜI VIỆT NAM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ
SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

NGUYỄN PHƯƠNG ANH

SINH HỌC THỰC NGHIỆM

2023

Hà Nội – 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Phương Anh

**NGHIÊN CỨU TƯƠNG QUAN ĐA HÌNH GEN *TEX15* VỚI
VÔ SINH NAM Ở NGƯỜI VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
PGS.TS. Nguyễn Thùy Dương**

Hà Nội – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên

Nguyễn Phương Anh

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn thạc sĩ tại Học viện Khoa học và Công nghệ, em đã nhận được sự giảng dạy và hướng dẫn nhiệt tình của các thầy cô giáo.

Lời đầu tiên, em xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc đến PGS.TS. Nguyễn Thùy Dương, Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, người trực tiếp hướng dẫn luận văn cho em. Cô đã tận tình, chu đáo hướng dẫn em trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu để em có thể hoàn thành đề tài. Cô cũng luôn quan tâm, động viên, nhắc nhở kịp thời để em có thể hoàn thành luận văn đúng tiến độ.

Luận văn được thực hiện bằng kinh phí của Đề tài “Xây dựng cơ sở dữ liệu hệ gen biến thể ty thể và nhiễm sắc thể y của một số dân tộc người Việt Nam” mã số ĐTĐL.CN.60/19, do PGS.TS. Nguyễn Thùy Dương làm chủ nhiệm thuộc đề tài độc lập của Bộ Khoa học và Công nghệ, năm 2019-2022.

Em xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới tất cả những thầy cô giáo tại khoa Công nghệ sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ đã giảng dạy và giúp đỡ em trong suốt khóa học. Em cũng xin cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ đã tạo điều kiện để em hoàn thành được luận văn.

Em cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành đến gia đình, bạn bè, các bạn cùng lớp thạc sĩ, các đồng nghiệp công tác tại phòng Hệ gen học người, Viện Nghiên cứu hệ gen vì đã luôn động viên, quan tâm giúp đỡ em trong quá trình học tập và thực hiện luận văn.

Xin chân thành cảm ơn!

Tác giả luận văn
Nguyễn Phương Anh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	I
LỜI CẢM ƠN	II
MỤC LỤC	III
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	V
DANH MỤC CÁC BẢNG	VII
DANH MỤC CÁC HÌNH	VIII
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	3
1.1. TỔNG QUAN VÔ SINH NAM	3
1.2. NGUYÊN NHÂN GÂY VÔ SINH Ở NAM GIỚI	6
1.2.1. Các yếu tố không di truyền.....	6
1.2.2. Các yếu tố di truyền	7
1.3. GEN <i>TEX15</i> VÀ VÔ SINH NAM.....	10
1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VÔ SINH NAM TRÊN THẾ GIỚI VÀ VIỆT NAM	13
1.4.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới	13
1.4.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam	15
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	17
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	17
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	17
2.1.2. Phạm vi nghiên cứu	18
2.2. HÓA CHẤT, DỤNG CỤ VÀ TRANG THIẾT BỊ.....	18
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.3.1 Tách chiết DNA tổng số từ mẫu máu toàn phần	19
2.3.2. Phương pháp định lượng DNA bằng quang phổ kế	20
2.3.3. Thiết kế môi PCR	20
2.3.4. Khuếch đại vùng DNA chứa đa hình bằng PCR	21
2.3.5. Phương pháp RFLP.....	23
2.3.6. Phương pháp điện di trên gel agarose.....	24
2.3.7. Phương pháp xử lý và phân tích số liệu.....	25
2.4. VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU	26
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	27

3.1. PHÂN TÍCH CÁC ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG Ở HAI NHÓM BỆNH NHÂN VÀ NHÓM ĐỐI CHỨNG	27
3.2. KẾT QUẢ TÁCH CHIẾT DNA TỔNG SỐ	28
3.3. ĐÁNH GIÁ LIÊN QUAN GIỮA <i>TEX15</i> rs323345 VÀ VÔ SINH NAM	30
3.3.1. Xác định thành phần kiểu gen đa hình <i>TEX15</i> rs323345	30
3.3.2. Phân tích sự liên quan giữa đa hình <i>TEX15</i> rs323345 với vô sinh nam.....	32
3.4. ĐÁNH GIÁ LIÊN QUAN GIỮA <i>TEX15</i> rs323346 VÀ VÔ SINH NAM	35
3.4.1. Xác định thành phần kiểu gen đa hình <i>TEX15</i> rs323346	35
3.4.2. Phân tích sự liên quan giữa đa hình <i>TEX15</i> rs323346 với vô sinh nam.....	38
3.5. ĐÁNH GIÁ LIÊN QUAN GIỮA <i>TEX15</i> rs323347 VÀ VÔ SINH NAM	40
3.5.1. Xác định thành phần kiểu gen đa hình <i>TEX15</i> rs323347	40
3.5.2. Phân tích sự liên quan giữa đa hình <i>TEX15</i> rs323347 với vô sinh nam.....	43
3.6. LIÊN QUAN CÁC HAPLOTYPE TRÊN GEN <i>TEX15</i> VÀ VÔ SINH NAM	45
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	50
4.1. KẾT LUẬN.....	50
4.2. KIẾN NGHỊ.....	50
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	51
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	52
PHỤ LỤC.....	60

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
95% CI	95% Confident interval	Khoảng tin cậy 95%
AIS	Androgen insensitivity syndrome	Hội chứng không nhạy cảm với androgen
Array CGH	Microarray-based comparative genomic hybridization	Lai bộ gen so sánh dựa trên microarray
AZF	Azoospermia factor	Vùng yếu tố không tinh trùng
bp	Base pair	Cặp bazơ
ddNTP	Dideoxynucleotide triphosphate	Dideoxynucleotide triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic axit	Axit deoxyribonucleic
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate	Deoxyribonucleotide triphosphate
DSB	Double-strand breaks	Đứt gãy DNA sợi đôi
EDTA	Etylene diamine tetra acetic axit	Axit etylendiamine
FISH	Fluorescence in situ hybridization	Kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang
HWE	Hardy – Weinberg equilibrium	Trạng thái cân bằng Hardy – Weinberg
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia
NGS	Next generation sequencing	Giải trình tự gen thế hệ mới
NOA	Non- obstructive <i>Azoospermia</i>	Vô tinh không tắc nghẽn
OA	Obstructive <i>Azoospermia</i>	Vô tinh do tắc nghẽn
OAT	Oligoasthenoteratozoospermia	Thiếu nhược quái tinh
OD	Optical density	Mật độ quang học
OR	Odds ratio	Tỷ số odds
PCR	Polemerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
RE	Restriction enzyme	Enzyme cắt giới hạn
RFLP	Restriction fragment length polymorphism	Kỹ thuật đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn

STSs	Sequence-tagged site	Vị trí được gắn thẻ trình tự
SNP	Single-nucleotide polymorphism	Đa hình đơn nucleotide
<i>TEX15</i>	Testis-expressed gene 15	Gen biểu hiện tại tinh hoàn số 15
WES	Whole exome sequencing	Giải trình tự hệ gen mã hóa
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Một số nguyên nhân di truyền chẩn đoán vô sinh ở nam giới	9
Bảng 2.1. Trình tự các cặp môi sử dụng cho phản ứng PCR.....	20
Bảng 2.2. Thành phần các chất trong một mẫu phản ứng PCR.....	22
Bảng 2.3. Số lượng và kích thước đoạn DNA tương đương với các kiểu gen của 3 đa hình trên <i>TEX15</i>	24
Bảng 2.4. Thành phần các chất tham gia phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn	24
Bảng 3.1. Kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ của các đối tượng nghiên cứu	27
Bảng 3.2. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA ở một số mẫu đại diện	29
Bảng 3.3. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele của đa hình <i>TEX15</i> rs323345	31
Bảng 3.4. Đánh giá liên quan giữa đa hình <i>TEX15</i> rs323345 và vô sinh nam	32
Bảng 3.5. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele của đa hình <i>TEX15</i> rs323346	37
Bảng 3.6. Đánh giá liên quan giữa đa hình <i>TEX15</i> rs323346 và vô sinh nam	38
Bảng 3.7. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele của đa hình <i>TEX15</i> rs323347	42
Bảng 3.8. Đánh giá liên quan giữa đa hình <i>TEX15</i> rs323347 và vô sinh nam	43
Bảng 3.9. Đánh giá liên quan haplotype các đa hình trên gen <i>TEX15</i> và vô sinh nam	47

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Minh họa một số dạng bất thường của tinh trùng	5
Hình 1.2. Các gen trên vùng AZF (a,b,c) trên nhiễm sắc thể Y	8
Hình 1.3. Các gen <i>TEX</i> tham gia vào quá trình sinh tinh.....	11
Hình 1.4. Quá trình nghiên cứu các gen chính liên quan đến vô sinh nam	14
Hình 2.1. Sơ đồ các cặp môi trên gen <i>TEX15</i> được thể hiện trên phần mềm SnapGene Viewer.....	21
Hình 2.2. Chu trình chạy phản ứng PCR	23
Hình 2.3. Trình tự nhận biết của enzyme <i>Psp1406I</i> , <i>TasI</i> và <i>MunI</i>	23
Hình 3.1. Kết quả điện di DNA tổng số các mẫu trên gel agarose 1%	28
Hình 3.2. Sản phẩm PCR khuếch đại vùng DNA chứa <i>TEX15</i> rs323345	30
Hình 3.3. Điện di sản phẩm PCR sau khi được xử lý với enzyme <i>Psp1406I</i> .	31
Hình 3.4. Tần số allele C rs323345 ở quần thể người Việt Nam trong nghiên cứu và các quần thể khác.....	35
Hình 3.5. Sản phẩm PCR khuếch đại vùng DNA chứa <i>TEX15</i> rs323346	36
Hình 3.6. Điện di sản phẩm PCR sau khi được xử lý với enzyme <i>TasI</i>	37
Hình 3.7. Tần số allele C rs323346 ở quần thể người Việt Nam trong nghiên cứu và các quần thể khác.....	40
Hình 3.8. Sản phẩm PCR khuếch đại vùng DNA chứa <i>TEX15</i> rs323347	41
Hình 3.9. Điện di sản phẩm PCR sau khi được xử lý với enzyme <i>MunI</i>	42
Hình 3.10. Tần số allele G rs323347 ở quần thể người Việt Nam trong nghiên cứu và các quần thể khác.....	45

MỞ ĐẦU

Vô sinh là một vấn đề sức khỏe toàn cầu ảnh hưởng đến hàng triệu người trong độ tuổi sinh sản trên khắp thế giới. Ở Việt Nam, đây cũng là một vấn đề cấp bách cần giải quyết khi tỷ lệ vô sinh của các cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh đẻ trên toàn quốc lên tới 7,7%. Ở nam giới, các nguyên nhân như số lượng tinh trùng thấp, tắc ống dẫn tinh, hình thái và chức năng tinh trùng bất thường gây ra khoảng một phần ba số ca vô sinh nam. Sự hình thành tinh trùng là một quá trình rất phức tạp, trong đó tinh nguyên bào trải qua qua các giai đoạn nguyên phân, giảm phân và biến đổi hình thái tạo ra tinh trùng trưởng thành. Quá trình sinh tinh này được kiểm soát bởi ít nhất 2000 gen với bất kỳ bất thường nào trong biểu hiện hoặc chức năng đều có thể dẫn đến suy sinh tinh và vô sinh nam. Theo thống kê các yếu tố di truyền gây ra khoảng 15 – 30% trường hợp vô sinh ở nam giới. Trên thế giới, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để tìm các gen gây vô sinh và tìm hiểu mối liên quan của đa hình di truyền với vô sinh nam. Hiện nay, họ gen *TEX* là một họ gen rất được quan tâm và nghiên cứu nhiều về vô sinh nam. Hầu hết các gen trong họ này được biểu hiện trong tinh hoàn và đóng vai trò quan trọng trong các giai đoạn khác nhau của quá trình sinh tinh. Trong đó, biến đổi trên gen *TEX15* đã tìm thấy là có liên quan tới vô sinh nam ở nhiều quần thể trên thế giới. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về liên quan đa hình gen với vô sinh nam được thực hiện khá nhiều tuy nhiên chưa có một nghiên cứu về liên quan giữa gen *TEX15* với vô sinh nam được thực hiện. Do đó, chúng tôi tiến hành thực hiện luận văn “**Nghiên cứu tương quan đa hình gen *TEX15* với vô sinh nam ở người Việt Nam**” nhằm xác định kiểu gen và tần số allele của các đa hình rs323345, rs323346, rs323347 trên gen *TEX15* tiềm năng liên quan đến vô sinh nam, từ đó đánh giá sự ảnh hưởng của đa hình đơn nucleotide đối với vô sinh nam ở người Việt Nam, làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng trong chẩn đoán, điều trị bệnh vô sinh nam.

Mục tiêu của đề tài

Nghiên cứu xác định thành phần kiểu gen và tần suất các allele của các đa hình trên gen *TEX15* ở nhóm bệnh nhân vô sinh nam và nhóm đối chứng khỏe mạnh từ đó khảo sát mối liên quan giữa kiểu gen các SNP và tình trạng vô sinh nam trên quần thể người Việt Nam.

Nội dung nghiên cứu

1. Phân tích các yếu tố lâm sàng ở nhóm bệnh nhân vô sinh nam và nhóm đối chứng;
2. Thu thập mẫu máu và tách chiết DNA tổng số của 402 mẫu gồm 202 bệnh nhân vô sinh nam và 200 mẫu đối chứng;
3. Xác định kiểu gen và tần số allele ba đa hình rs323345, rs323346, rs323347 trên gen *TEX15* trên nhóm bệnh, nhóm đối chứng và cả quần thể nghiên cứu;
4. Đánh giá mối liên quan giữa các đa hình trên với nguy cơ mắc vô sinh nam trên quần thể người Việt Nam.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TỔNG QUAN VÔ SINH NAM

Vô sinh là một vấn đề sức khỏe toàn cầu ảnh hưởng đến hàng triệu người trong độ tuổi sinh sản trên khắp thế giới. Theo tổ chức Y tế thế giới WHO, vô sinh là một bệnh của hệ thống sinh sản nam hoặc nữ được xác định khi một cặp vợ chồng không thể có thai sau khi quan hệ tình dục thường xuyên không sử dụng các biện pháp bảo vệ từ 12 tháng trở lên [1]. Theo dữ liệu thống kê cho thấy có khoảng 48 triệu cặp vợ chồng và 186 triệu cá nhân bị vô sinh trên toàn cầu [2], trong đó vô sinh nam ảnh hưởng đến khoảng 7% nam giới [3]. Vô sinh nam có thể được chia thành vô sinh nguyên phát và vô sinh thứ phát, trong đó vô sinh nguyên phát dùng để nói đến những người đàn ông vô sinh chưa bao giờ có con theo cách tự nhiên thành công, còn vô sinh thứ phát dùng để chỉ những người đàn ông không thể có con sau khi đã từng có 1 hoặc nhiều con theo cách tự nhiên trước đó.

Để đánh giá khả năng sinh sản ở nam giới, các bác sĩ dựa trên kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ, một xét nghiệm tiến hành trên mẫu tinh dịch nhằm để đánh giá chất lượng của tinh trùng, thông qua các chỉ số như: số lượng và nồng độ tinh trùng trong tinh dịch, hình dạng, khả năng vận động,...[4]. Xét nghiệm tinh dịch đồ là chỉ số đáng tin cậy để xem xét các vấn đề về nam học lâm sàng, vô sinh nam, các vấn đề sinh sản, dịch tễ học và để đánh giá khả năng mang thai với độ nhạy gần 89,6%, nghĩa là nó có thể phát hiện các vấn đề của 9 trên 10 người đàn ông [5]. Việc đánh giá này được tiến hành theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO). Năm 2010, Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đưa ra giới hạn tham chiếu cho các đặc điểm của tinh dịch nam giới bằng cách tiến hành phân tích các mẫu tinh dịch của 4500 người đàn ông đến từ 14 quốc gia, có khả năng sinh sản bình thường khi vợ của họ có con trong vòng 12 tháng [6]. Bình thường, tinh dịch sẽ có màu trắng sữa hoặc trong, đặc và dính (nhót), có độ pH khoảng 7,2 đến 8,0 và có thể chứa các tế bào bạch cầu với các chỉ số bình thường như: thể tích tinh dịch nhiều hơn 1,4ml (1,3ml – 1,5ml); nồng độ tinh trùng lớn hơn 15 triệu/ml; hình thái của tinh trùng có khoảng nhiều hơn 4% số lượng tinh trùng có hình thái bình thường; khả năng di động lớn hơn 40%, trong đó di động tiến tới lớn hơn 32% tổng số tinh trùng [7]; số lượng bạch cầu nhỏ hơn 1 triệu/ml; tỉ lệ tinh trùng còn sống trong mẫu tinh dịch khoảng hơn 58% tổng số lượng tinh trùng; các

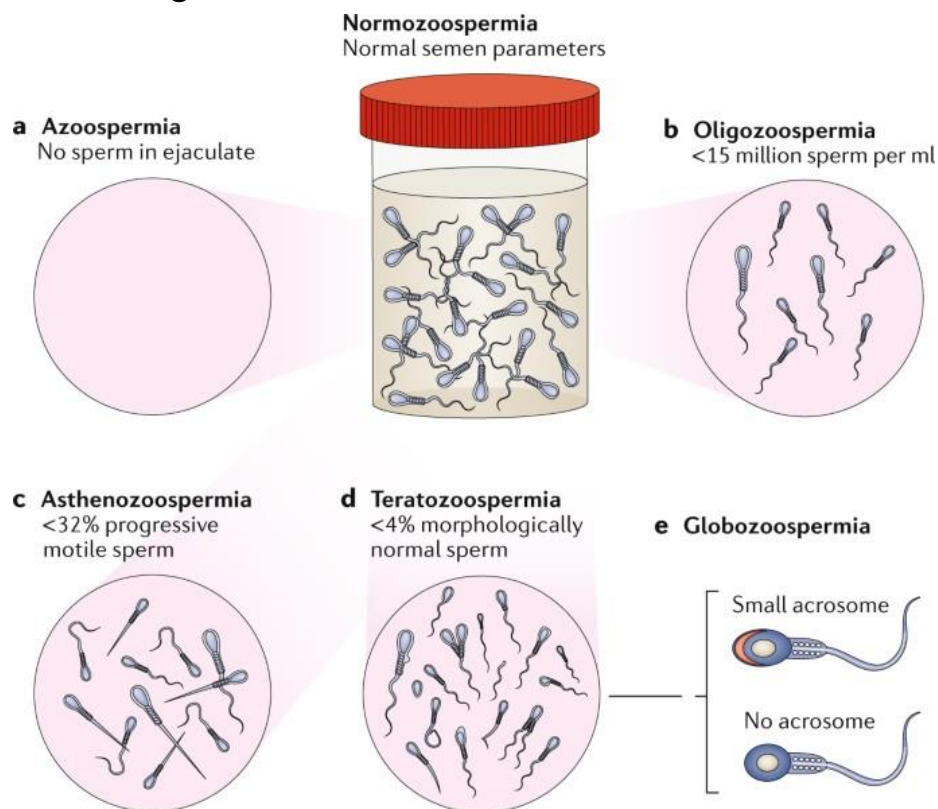
tế bào lạ hay các kháng thể trong tinh trùng chiếm khoảng 1 triệu/ml. WHO khuyến nghị sử dụng các giới hạn tham chiếu này kết hợp với đánh giá lâm sàng bao gồm khả năng sinh sản của người phụ nữ để xác định khả năng sinh sản cho một cặp vợ chồng [8].

Với các tinh dịch đồ có kết quả không bình thường, tinh trùng có thể bị bất thường về một trong các yếu tố gồm số lượng, hình thái hoặc khả năng di chuyển, hoặc bao gồm tất cả các yếu tố này. Khi tinh trùng có những bất thường như đầu to, đầu không tròn, đuôi không thẳng, đuôi kép... đều khó xâm nhập vào trứng, ảnh hưởng đến quá trình thụ thai. Thuật ngữ “Azoospermia - vô tinh” (Azoospermia) là hiện tượng không có tinh trùng khi xuất tinh [9]. Đây là một dạng vô sinh nam nghiêm trọng, không thể nhận biết thông qua các phương pháp khám lâm sàng và được chẩn đoán chủ yếu qua kết quả phân tích tinh dịch. Trong một số trường hợp bệnh nhân mắc vô tinh, quá trình sinh tinh vẫn diễn ra bình thường nhưng quá trình vận chuyển tinh trùng từ các ống sinh tinh ra ngoài lại bị tắc nghẽn khiến cho tinh dịch không có tinh trùng. Vì vậy, vô tinh được phân loại thành “Obstructive azoospermia (OA) - vô tinh do tắc nghẽn” để phân biệt với “Non-obstructive azoospermia (NOA) - vô tinh không do tắc nghẽn”, trong đó vô tinh không phải do bất kỳ tổn thương nào ở hệ thống cơ quan mà là do quá trình sản xuất tinh trùng bị giảm sút [10].

Thuật ngữ “Oligospermia - mật độ tinh trùng thấp” là tình trạng số lượng tinh trùng thấp hơn bình thường, theo nhiều mức độ như nhẹ (10-15 triệu tinh trùng/ml), trung bình (5-10 triệu tinh trùng/ml), nặng (<5 triệu tinh trùng/ml), hoặc nghiêm trọng (<100000 tinh trùng/ml) [11]. Chứng giảm số lượng tinh trùng nghiêm trọng này đôi khi còn được gọi là thiếu tinh (Cyrptozoospermia). Thông thường, khi số lượng tinh trùng thấp, các vấn đề khác liên quan đến sức khỏe của tinh trùng cũng xuất hiện, cụ thể như tinh trùng có các vấn đề về khả năng di chuyển, hình dạng không bình thường. “Asthenozoospermia - tinh trùng kém di động” hay tinh trùng suy nhược là một thuật ngữ chỉ tình trạng một tỷ lệ lớn tinh trùng di chuyển không bình thường với ít hơn 40% tinh trùng đang di chuyển và ít hơn 32% di chuyển theo đường thẳng hoặc hình vòng tròn [12]. Tình trạng tinh trùng kém di động thường đi kèm với số lượng tinh trùng thấp.

“Teratozoospermia - quái tinh” là thuật ngữ dùng để chỉ tình trạng khi

một phần lớn tinh trùng của đàn ông có hình dạng bất thường (trên 85% tinh trùng có hình dạng bất thường) [13]. Tinh trùng bình thường sẽ có đầu hình bầu dục, đuôi dài trong khi tinh trùng bất thường có thể có hình dạng đầu kỳ lạ, có thêm đầu hoặc thêm đuôi. Hình dạng tinh trùng sẽ ảnh hưởng đến khả năng di chuyển của tinh trùng, do đó, khi hình thái tinh trùng bất thường thì khả năng di chuyển cũng sẽ kém đi, điều này ảnh hưởng đến khả năng thụ tinh. “Oligoasthenoteratozoospermia (OAT) – thiếu nhược quái tinh” là thuật ngữ để chỉ khi tất cả các thông số của tinh trùng gồm số lượng, khả năng di chuyển và hình dạng đều bất thường [14]. Đây là nguyên nhân phổ biến nhất của vô sinh nam, bệnh có 3 thể nhẹ, trung bình và nặng. “Necrozoospermia - tinh trùng hoại tử” là thuật ngữ để chỉ tinh trùng hoại tử hay tinh trùng có mũ là nguyên nhân hiếm gặp của vô sinh nam, khi đó tất cả tinh trùng đều bị chết [15]. “Leukocytospermia - tăng bạch cầu trong tinh dịch” là thuật ngữ chỉ tình trạng một số lượng lớn các tế bào bạch cầu xuất hiện trong tinh dịch (1×10^6 bạch cầu/mL tinh dịch) [16], đây còn được gọi là tình trạng mũ tinh dịch (pyospermia). Số lượng tế bào bạch cầu cao có thể dẫn đến tổn thương tinh trùng và làm giảm khả năng sinh sản. Đây là dấu hiệu cho thấy người bệnh đang bị nhiễm trùng hoặc mắc một bệnh tự miễn nào đó.



Hình 1.1. Minh họa một số dạng bất thường của tinh trùng [17]

1.2. NGUYÊN NHÂN GÂY VÔ SINH Ở NAM GIỚI

Vô sinh nam là một tình trạng bệnh lý gây ra bởi đa yếu tố, và có thể được chia thành các yếu tố không di truyền và di truyền [18].

1.2.1. Các yếu tố không di truyền

Trong quá trình sinh sống, các yếu tố không di truyền tiếp xúc với bệnh nhân, có thể ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp đến khả năng sinh sản. Có thể kể đến một số yếu tố như sau:

- Các nhân tố môi trường, mà ở đó nam giới tiếp xúc với nhiều yếu tố ngoại sinh cũng như hóa chất môi trường độc hại (ví dụ thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, mỹ phẩm, chất bảo quản, vật liệu tẩy rửa, chất thải đô thị và tư nhân, dược phẩm và phụ phẩm công nghiệp...), sau đó các chất này xâm nhập vào cơ thể thông qua các hình thức khác nhau. Hệ thống sinh sản của nam giới rất nhạy cảm với các yếu tố môi trường, các hóa chất từ môi trường có thể gây rối loạn nội tiết, giảm số lượng và chất lượng của tinh trùng, được cho là một trong những yếu tố có thể góp phần làm gia tăng tình trạng vô sinh ở nam giới [19, 20].

- Những người có lối sống không lành mạnh như thiếu vận động, bị béo phì, dùng nhiều thức ăn nhanh, sử dụng ma túy, uống rượu, hút thuốc lá... hoặc thường xuyên sử dụng phòng xông hơi khô, bồn tắm nước nóng cũng có thể không thể sản xuất được những tinh trùng chất lượng tốt nên rất dễ bị vô sinh [21].

- Một số bệnh lý cũng có khả năng ảnh hưởng đến vô sinh nam như: giãn tĩnh mạch thừng tinh Varicocele, là tình trạng những tĩnh mạch của tinh hoàn bị giãn to bất thường và có thể liên quan tới sự điều hòa nhiệt độ tinh hoàn, dẫn đến giảm chất lượng tinh trùng [22]. Bên cạnh đó, các bệnh lý nhiễm trùng gồm cả những bệnh lây lan qua đường tình dục như bệnh lậu,... có thể cản trở khả năng sản xuất tinh trùng, suy giảm sức khỏe tinh trùng hay gây ra tắc đường dẫn tinh khiến sự di chuyển của tinh trùng bị cản trở [23].

- Tổn thương, tắc nghẽn đường dẫn tinh do chấn thương, tai nạn, sau phẫu thuật, nhiễm trùng hay những phát triển bất thường như trong bệnh xơ nang. Sự tắc nghẽn có thể xảy ra ở bất cứ khu vực nào, từ trong tinh hoàn, mào tinh, ống dẫn tinh, ống phóng tinh cho tới niệu đạo. Các khối u lành tính, ung thư cũng ảnh hưởng đến khả năng sinh sản của nam giới và các phương

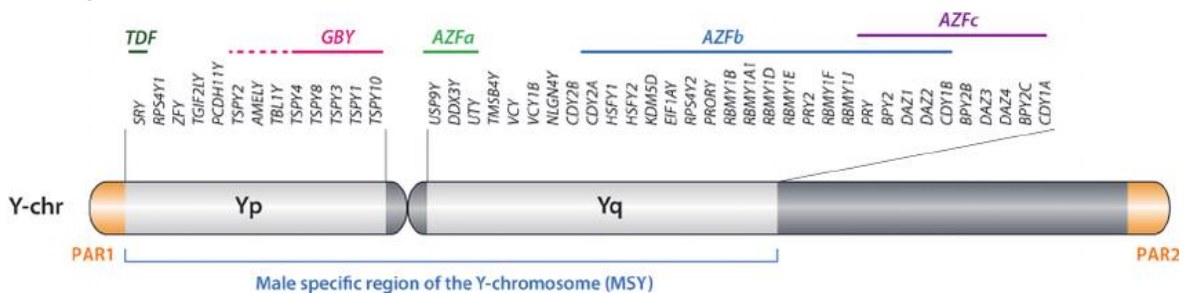
pháp điều trị ung thư như phẫu thuật, hóa trị, xạ trị cũng có thể gây vô sinh tạm thời tại thời điểm điều trị hoặc vĩnh viễn đối với bệnh nhân [24].

1.2.2. Các yếu tố di truyền

Bên cạnh các nguyên nhân đến từ yếu tố không di truyền, các yếu tố di truyền là nguyên nhân chiếm khoảng hơn 15% các trường hợp vô sinh nam, bao gồm cả bất thường nhiễm sắc thể và các thay đổi đơn gen [25]. Yếu tố di truyền góp phần vào cả 4 nhóm nguyên nhân chính gây vô sinh nam: khiếm khuyết về số lượng tinh trùng; tắc nghẽn hoặc rối loạn chức năng ống dẫn tinh; rối loạn trục dưới đồi-tuyến yên; và khiếm khuyết về chất lượng tinh trùng [3, 26]. Những thay đổi di truyền chính dẫn đến vô sinh nam là bất thường nhiễm sắc thể, trong đó bất thường nhiễm sắc thể phổ biến nhất liên quan đến vô sinh nam là hội chứng Klinefelter. Hội chứng Klinefelter (47 XXY) là rối loạn di truyền nhiễm sắc thể giới tính thường gặp nhất ở nam giới [27], được gây ra bởi sự xuất hiện thêm của một nhiễm sắc thể X nữa ở các tế bào, và thường chỉ được phát hiện khi đến độ tuổi trưởng thành. Biểu hiện thường thấy ở các bé trai là tinh hoàn teo nhỏ, dáng người mềm mại gần giống nữ, tay chân dài không cân đối, vú to, nồng độ FSH tăng cao và bệnh nhân thường không có tinh trùng. Những bệnh nhân thể khảm (chiếm khoảng 15%) vẫn có thể sinh sản do tinh hoàn vẫn sinh tinh nhưng thường là bị thiếu tinh [28]. Ngoài rối loạn nhiễm sắc thể giới tính, rối loạn nhiễm sắc thể thường cũng có thể gây ra thiếu tinh, vô sinh. Các rối loạn thường gặp liên quan đến chuyển đoạn nhiễm sắc thể, ví dụ như chuyển đoạn Robertson, chuyển đoạn tương hỗ, chuyển đoạn hòa nhập tâm, có thể làm giảm kích thước tinh hoàn và mức testosterone, ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh, dẫn đến tình trạng vô tinh hoặc thiếu tinh và vô sinh nam. Tỷ lệ mắc chuyển đoạn nhiễm sắc thể này ở nam giới vô sinh cao gấp 10 lần so với nam giới có khả năng sinh sản [29].

Các nghiên cứu về tế bào học ở nam giới vô sinh đã phát hiện ra một gen kiểm soát quá trình sinh tinh, được gọi là yếu tố azoospermia (AZF), nằm trên nhánh dài của nhiễm sắc thể Y [30]. Có 4 vùng trong AZF (AZFa, AZFb, AZFc và AZFd) trên nhiễm sắc thể Y, và sự mất đoạn gen ở những vùng này đã được chứng minh là có liên quan đến bệnh lý gây vô sinh nam liên quan đến azoospermia hoặc oligozoospermia nghiêm trọng. Vùng AZFa nằm ở nhánh dài gần tâm NST Y và chứa hai gen quan trọng có liên quan đến quá

trình sinh tinh là *USP9Y* và *DDX3Y*. Các mất đoạn trong vùng AZFa thường dẫn đến vô tinh và hội chứng Sertoli đơn thuần (SCOS) [31]. Vùng AZFb chứa 7 gen (*EIF1AY*, *RPS4Y2*, *SMCY*, *HSFY*, *XKRY*, *PRY*, và *RBMY*) mã hóa cho các protein có liên quan đến quá trình sinh tinh. Mất đoạn vùng AZFb là một mất đoạn lớn, có thể gây ra bất thường trong sinh tinh như sinh tinh nửa chừng (tiền tinh trùng không thể phát triển thành tinh trùng trưởng thành), hội chứng SCOS hay vô tinh. Vùng AZFc nằm ở vùng xa nhất trên nhánh dài của nhiễm sắc thể Y, rất quan trọng đối với khả năng sinh sản của nam giới vì nó chứa nhiều họ gen cần thiết cho quá trình sinh tinh bình thường. Mất đoạn ở vùng này là nguyên nhân di truyền thường gặp nhất gây vô sinh nghiêm trọng, được quan sát thấy xuất hiện 5–10% trong các trường hợp không có tinh trùng và ít tinh trùng nghiêm trọng [30]. Năm 1999, xác định được vùng AZF thứ tư có liên quan đến vô sinh nam, AZFd và vị trí vùng này lần đầu tiên được xác định bằng cách sử dụng phản ứng PCR đa thành phần và được cho là tồn tại giữa AZFb và AZFc, tuy nhiên, các nghiên cứu về vùng AZFd vẫn còn gây tranh cãi. Mất đoạn vùng AZFd có thể gây ra vô tinh, thiếu tinh nặng hoặc bất thường về hình thái tinh trùng. Ngoài ra còn một số trường hợp khác là mất vùng AZF kết hợp, bệnh nhân sẽ mất vùng AZF (a+b+c) hoặc mất vùng AZF (b+c). Ở vô sinh nam, đột biến mất đoạn ở vùng AZF trên nhiễm sắc thể Y là nguyên nhân di truyền cao thứ hai sau hội chứng Klinefelter [30, 32].



Hình 1.2. Các gen trên vùng AZF (a,b,c) trên nhiễm sắc thể Y [33]

Mặc dù nhiều nghiên cứu về sự di truyền của vô sinh nam tập trung vào nhiễm sắc thể Y, nhưng vẫn còn nhiều gen sinh tinh khác có trong bộ gen của con người. Quá trình sinh tinh này được kiểm soát bởi rất nhiều gen, mà với bất kỳ sự thay đổi nào trong biểu hiện hoặc chức năng của các gen này đều có thể dẫn đến suy sinh tinh và vô sinh nam [3]. Tất cả những gen này là những ứng cử viên tiềm năng cho vô sinh nam và cần nghiên cứu thêm để làm sáng tỏ chức năng chính xác của chúng. Một số yếu tố di truyền được đưa vào quá

trình lâm sàng để chẩn đoán vô sinh ở nam giới được thể hiện ở Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Một số nguyên nhân di truyền chẩn đoán vô sinh ở nam giới [3]

Các nhóm căn nguyên	Các nguyên nhân chính	Các yếu tố di truyền nhằm đến
Khiếm khuyết về số lượng tinh trùng	Vô tinh (Azoospermia)	Bất thường nhiễm sắc thể (số lượng hoặc cấu trúc)
		Mất đoạn nhiễm sắc thể Y (Vùng AZFa, AZFb, và AZFc)
	Gen <i>TEX11</i>	
	Mật độ tinh trùng thấp (Oligozoospermia)	Mất đoạn gr/gr trên nhiễm sắc thể Y
Tắc nghẽn hoặc rối loạn chức năng ống dẫn tinh	Thiếu ống dẫn tinh 2 bên bẩm sinh (CBAVD: congenital bilateral absence of the vas deferens)	Gen <i>CFTR</i>
Các rối loạn tuyến yên ở vùng dưới đồi	Hội chứng Kallman và suy tuyến sinh dục	25 – 30 gen ứng viên [26, 34]. Ví dụ: <i>FGFR1, ANOS1, TAC3, GNRH1, GNRHR</i>
	Thiếu gonadotropin	Hormone FSH và LH
Khiếm khuyết về chất lượng tinh trùng	Tinh trùng đầu tròn (Globozoospermia)	Gen <i>DPY19L2</i>
	Tinh trùng đầu khổng lồ (Sperm macrocephaly)	Gen <i>AURKC</i>
	Hội chứng đa dạng bất thường hình thái đuôi của tinh trùng (MMAF)	Gen <i>DNAH1</i>

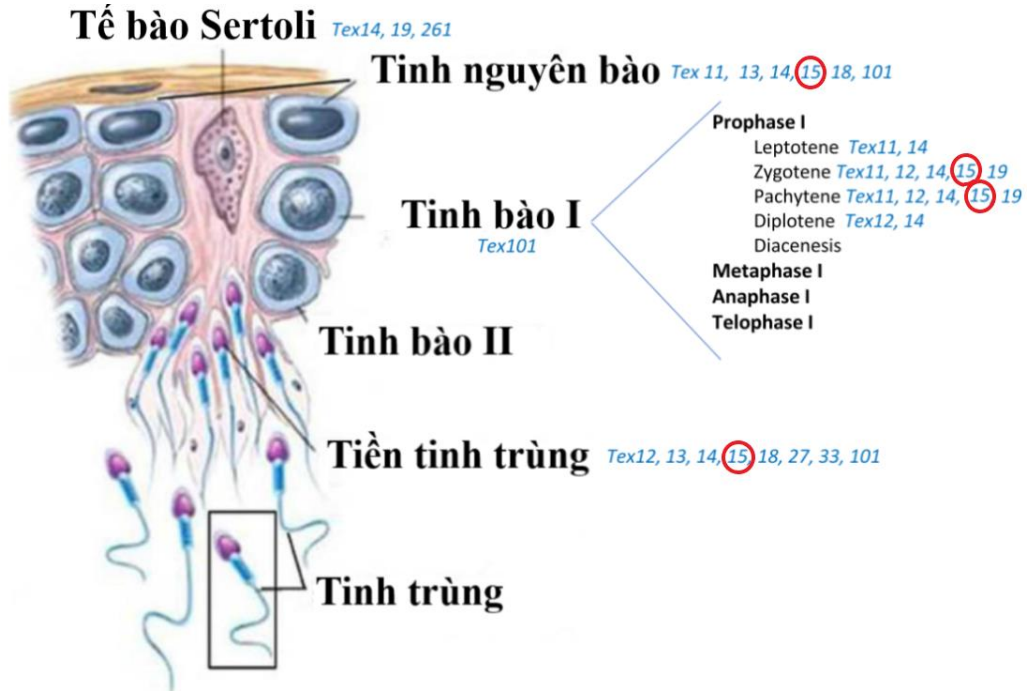
	Hội chứng rối loạn vận động nhung mao nguyên phát (PCD)	26 gen ứng viên [35]. Ví dụ: <i>DNAH1, DNAH11, DNAH5</i>
--	---	--

Cho đến nay, nguyên nhân của những khiếm khuyết tinh hoàn nguyên phát vẫn chưa được phát hiện ở khoảng 40% ca bệnh vô sinh (còn được gọi là vô sinh vô căn) và các yếu tố di truyền chưa được xác định có khả năng đóng góp một tỷ lệ lớn vào các trường hợp này. Gần đây, các đa hình di truyền trong các gen có chức năng tế bào phổ biến và chức năng sinh tinh cụ thể đã được nghiên cứu để cho thấy mối liên kết với vô sinh nam [25]. Trong số đó, đa hình của họ gen *TEX* và các gen liên quan đến con đường sinh tinh rất được chú ý và đã được nghiên cứu để tìm hiểu về mối liên quan của các gen này đến vô sinh nam.

1.3. GEN *TEX15* VÀ VÔ SINH NAM

Trong quá trình tạo tinh trùng, họ gen *TEX* (Testis Expressed) là họ gen rất đáng chú ý vì vai trò của gen này trong quá trình sinh tinh. Gen *TEX* lần đầu tiên được mô tả bởi Wang và các cộng sự vào năm 2001, với thuật ngữ “*TEX*” (biểu hiện ở tinh hoàn) được nhóm tác giả đặt ra sau khi họ sử dụng phương pháp SSH (suppression subtractive hybridization) để xác định các sản phẩm phiên mã mới chỉ có trong tinh nguyên bào của chuột [36]. Mười trong số hai mươi ba gen mới đặc hiệu của tế bào mầm được biểu hiện cao hoặc chỉ biểu hiện duy nhất ở tinh hoàn (từ *TEX11* đến *TEX20*), chưa từng được tìm hiểu trước đây và các orthologs *TEX* ở người sau đó đã được mô tả [36]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng các thành viên của họ gen *TEX* có vai trò quan trọng trong việc gây vô sinh nam [37, 38] với hầu hết các gen này đã được phát hiện tham gia vào các con đường khác nhau trong quá trình sinh tinh. Quá trình sinh tinh là quá trình sản xuất tinh trùng từ các tế bào mầm nguyên thủy trong các ống sinh tinh ở tinh hoàn. Quá trình này bắt đầu với sự phân chia phân bào của các tế bào gốc, gọi là tinh nguyên bào và có thể được chia thành ba giai đoạn chính: (i) Mỗi tinh nguyên bào tiến hành nguyên phân hình thành nên nhiều tinh bào bậc I; (ii) quá trình giảm phân, mỗi tinh bào bậc I phân chia hai lần, giảm phân lần thứ nhất tạo thành hai tinh bào bậc II và lần giảm phân hai tạo thành bốn tiền tinh trùng (hay tinh tử tròn, không có khả

năng thụ tinh); (iii) sự biến đổi hình thái thành công của tiền tinh trung thành cấu trúc của tinh trùng trưởng thành [39]. Trung bình, quá trình này mất khoảng 70 ngày để sản xuất tinh trùng một cách hoàn thiện, đồng thời được kiểm soát bởi rất nhiều gen trong họ gen *TEX*, mà với bất kỳ sự thay đổi nào trong biểu hiện hoặc chức năng của các gen này đều có thể dẫn đến suy sinh tinh và vô sinh nam [3]. Vai trò của các gen *TEX* trong các giai đoạn của quá trình sinh tinh được thể hiện ở hình 1.3.



Hình 1.3. Các gen *TEX* tham gia vào quá trình sinh tinh [37]

Gen *TEX15* (Testis Expressed 15) nằm trên nhiễm sắc thể số 8 (8p12), có kích thước khoảng 81,465bp, gồm 12 exon và chỉ được biểu hiện ở tinh hoàn và buồng trứng [36]. Gen này mã hóa cho protein *TEX15* gồm 3172 amino axit (NM_001350162.2) thuộc họ *TEX*, với *TEX15* có orthologs ở động vật có vú (chuột, ngựa, bò...) và cá ngựa vằn. Sản phẩm phiên mã *TEX15* được biểu hiện nhiều trong tế bào mầm sau giảm phân, tế bào tinh nguyên bào và tinh bào I, được điều hòa trong kỳ đầu của giảm phân 1 của quá trình sinh tinh [40, 41], cho thấy gen này có vai trò trong các giai đoạn khác nhau của quá trình sinh tinh [42]. *TEX15* được xác định trong 25 gen chỉ được biểu hiện trong các tế bào mầm đực [36], đồng thời mô hình chuột knock out gen *TEX15* đã tạo ra chuột có tinh hoàn không phát triển và quá trình giảm phân bị ức chế [42]. Mất chức năng protein *TEX15* ở chuột gây ra hiện tượng giảm khả năng sinh sản sớm ở con đực nhưng không xuất hiện ở

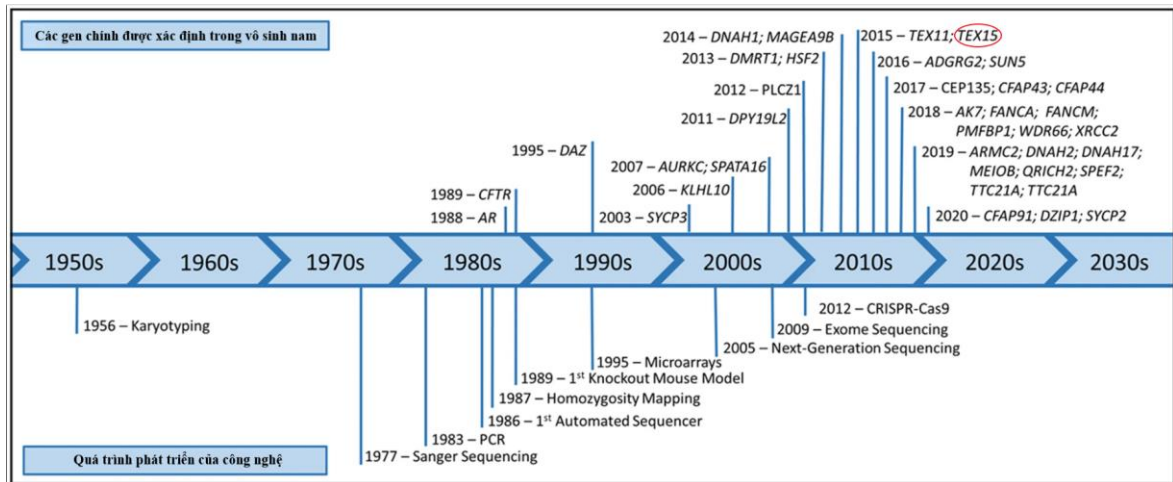
con cái [42]. Bên cạnh đó, các tế bào sinh tinh thiếu protein TEX15 biểu hiện sự thất bại trong quá trình tiếp hợp giữa các nhiễm sắc thể tương đồng trong quá trình giảm phân khi sinh tinh. Tái tổ hợp giảm phân được bắt đầu bằng việc tạo ra các đứt gãy sợi đôi DNA (DNA double-strand breaks) và RAD51 và DMC1 là các protein cần thiết để hỗ trợ sửa chữa các đứt gãy này [42]. Ở các tế bào sinh tinh thiếu protein TEX15, việc xác định RAD51 và DMC1 bị suy giảm nghiêm trọng, từ đó cho thấy gen *TEX15* cần thiết cho quá trình tiếp hợp và tái tổ hợp nhiễm sắc thể, đồng thời sửa chữa đứt gãy DNA trong quá trình giảm phân khi sinh tinh. Gần đây, nghiên cứu đã chỉ ra protein TEX15 liên kết với MILI (một thành viên của phân họ PIWI của protein Argonaute) trong quá trình sinh tinh, cần thiết cho sự biệt hóa tế bào mầm [43]. Có thể thấy, các nghiên cứu đều đã chỉ ra vai trò quan trọng của *TEX15* trong các giai đoạn của quá trình sinh tinh ở nam giới.

Cho đến nay, các đột biến trên gen *TEX15* cũng được nghiên cứu trên nhiều ca vô sinh trên thế giới. Các đột biến vô nghĩa trên gen *TEX15* đã được tìm thấy trên 3 anh em trai người Thổ Nhĩ Kỳ có tinh hoàn nhỏ và bị vô sinh do suy sinh tinh, cho thấy đột biến này là nguyên nhân gây ra dị tật sinh tinh, đồng thời có liên quan với việc giảm số lượng tinh trùng theo thời gian ở 3 anh em [44]. Các đột biến trên gen *TEX15* cũng được tìm thấy ở 2 anh em người Ý mắc vô sinh với tinh hoàn nhỏ và vô tinh không tắc nghẽn (NOA), đột biến này không tìm thấy ở 65 nam giới khỏe mạnh, xác nhận rằng gen *TEX15* đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh tinh bình thường và các khiếm khuyết trên gen này có thể chịu trách nhiệm cho một số trường hợp vô tinh không tắc nghẽn [45]. Gần đây, một nghiên cứu trên 25 bệnh nhân vô sinh bị vô tinh và thiếu tinh ở Ý, cũng đã xác định được một đột biến gen *TEX15* trên một bệnh nhân [46]. Bên cạnh đó, các đa hình trên gen *TEX15* cũng được nghiên cứu và cho thấy có liên quan đến vô sinh nam ở nhiều quần thể người trên thế giới, ví dụ như Trung Quốc, Iran... [47, 48]. Từ các nghiên cứu về gen *TEX15*, có thể thấy gen này được cho là liên quan trực tiếp đến vô sinh ở nam giới, và là một gen tiềm năng để phân tích trong quá trình nghiên cứu về bệnh này ở các quần thể người trên thế giới.

1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VÔ SINH NAM TRÊN THẾ GIỚI VÀ VIỆT NAM

1.4.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Việc xác định các nguyên nhân di truyền gây vô sinh ở nam giới được bắt đầu từ giữa thế kỷ 20 và vẫn tiếp tục được nghiên cứu cho đến ngày nay, nhờ sự phát triển của các kỹ thuật phân tử mới và tiến bộ công nghệ cho phép phát hiện và mô tả đặc điểm của các gen chính là nguyên nhân gây vô sinh nam ở người [49]. Karyotyping (lập nhiễm sắc thể đồ) là xét nghiệm đầu tiên được sử dụng để xác định các bất thường di truyền tiềm ẩn ở nam giới vô sinh và cho đến ngày nay vẫn là xét nghiệm chẩn đoán vô sinh nam được sử dụng rộng rãi nhất. Kỹ thuật tế bào học này cho thấy một số bất thường nhiễm sắc thể rất quan trọng liên quan đến vô sinh nam, trong đó phổ biến nhất là sự hiện diện của một nhiễm sắc thể X bổ sung (47, XXY) đặc trưng cho hội chứng Klinefelter [49]. Bên cạnh đó, sự kết hợp giữa phân tích karyotype với kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) có thể phát hiện ra một số bất thường nhiễm sắc thể gây vô sinh nguyên phát và rối loạn phát triển giới tính; ví dụ 46, XX nam; chuyển vị Robertsonian [50, 51]. Phân tích karyotype cũng rất cần thiết để xác định vị trí của các yếu tố di truyền kiểm soát quá trình sinh tinh. Năm 1976, sử dụng kỹ thuật karyotype đã xác định mất đoạn ở q11 trên nhánh dài của nhiễm sắc thể Y trên 6 người đàn ông bị vô tinh và vùng này được xác định là cần thiết cho quá trình sinh tinh [52]. Mặc dù điều này chỉ ra sự hiện diện của một hoặc nhiều gen kiểm soát quá trình sinh tinh của con người nằm trong vùng bị xóa này của nhiễm sắc thể Y, nhưng mãi đến những năm 1990, gen đầu tiên liên quan trực tiếp đến sự thất bại của quá trình sinh tinh mới được xác định bằng các công nghệ phân tử mới. Tuy nhiên, tất cả các bệnh đã được báo cáo ở trên bằng cách sử dụng karyotyping bị giới hạn trong việc chỉ xác định được nguyên nhân vô sinh nam ở bệnh nhân không có tinh trùng (azoospermia) và có số lượng tinh trùng thấp (oligospermia) [3, 49].



Hình 1.4. Quá trình nghiên cứu các gen chính liên quan đến vô sinh nam [49]

Gen đầu tiên liên quan đến vô sinh nam nằm ngoài nhiễm sắc thể Y được xác định vào năm 1988 trên nhiễm sắc thể X. Brown và các đồng nghiệp đã sử dụng phương pháp dựa trên PCR kết hợp với phương pháp Southern blot, phát hiện được mất đoạn một phần gen thụ thể androgen (*AR*) ở một người mắc hội chứng không nhạy cảm với androgen (Androgen insensitivity syndrome - AIS) [53]. Năm 1989, đột biến gen *CFTR* trên nhiễm sắc thể số 7 đã được phát hiện sử dụng kỹ thuật đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn (RFLP), sau đó là giải trình tự dựa trên PCR để xác định đột biến, đồng thời xác định được các đột biến này ở *CFTR* là nguyên nhân gây ra tình trạng vô tinh do tắc nghẽn (OA) do sự khiếm khuyết bẩm sinh của ống dẫn tinh ở hai bên [54, 55]. Năm 1995, bằng cách sử dụng kỹ thuật PCR và các vị trí được gắn thẻ trình tự (Sequence-Tagged Site - STSs), các nhà nghiên cứu đã phát hiện được các gen ứng cử viên mạnh nhất ở những bệnh nhân không có tinh trùng có vi mất đoạn trên nhiễm sắc thể Y, gọi là các gen deleted in Azoospermia (*DAZ*) [56]. Bên cạnh đó, sử dụng thêm kỹ thuật PCR đã phát hiện ra 3 vùng gen trên nhiễm sắc thể Y thường bị xóa ở nam giới bị suy sinh tinh, được gọi là *AZF*a, *AZF*b và *AZF*c [57].

Với các công nghệ giải trình tự hiện có cũng như sự ra đời của kỹ thuật SNP Microarray vào những năm 1990 đã một lần nữa thay đổi các phương pháp nghiên cứu để phân tích bộ gen của nam giới bị vô sinh và xác định được các gen mới liên quan đến vô sinh nam [49]. Lúc đầu, một nhóm lớn các điểm đánh dấu đa hình đã được phát triển và áp dụng để sàng lọc bộ gen của những người đàn ông vô sinh trong cùng gia đình để xác định các gen vô sinh

như *AURCK* [58], *SPATA16* [59] và *DNAH1* [60]. Sau đó, sử dụng phép lai bộ gen so sánh dựa trên microarray (Array CGH) và SNP Array, các đột biến mất đoạn và lặp đoạn gen ngày càng được phát hiện nhiều hơn, trong đó một số gen bị mất đoạn đã được phát hiện như *DPY19L2* [61], *TEX11* [62], *DMRT1* [63].

Với sự phát triển của các nền tảng NGS - Next generation sequencing thông lượng cao trong thập kỷ qua đã cho phép giải trình tự một số lượng lớn gen, tất cả các exon mã hóa (Whole exome sequencing - WES) hoặc giải trình tự toàn bộ bộ gen của con người, được thực hiện trong các nhóm bệnh nhân và đối chứng rất lớn. Theo đó, NGS đã cung cấp một phương pháp sàng lọc di truyền nhanh chóng và tiết kiệm chi phí để phát hiện ra các gen mới liên quan đến vô sinh nam, trong đó có thể kể đến *TEX15*. Năm 2015, trong một gia đình Thổ Nhĩ Kỳ có 3 anh em trai có tinh hoàn nhỏ và bị vô sinh do suy sinh tinh, Okutman và các cộng sự đã thực hiện giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa WES và xác định đồng hợp tử một đột biến vô nghĩa trong gen *TEX15* dẫn đến stop codon và do đó biểu hiện ra protein bị ngắt đoạn và không có hoạt tính [44]. Hai năm sau đó, trong 2 anh em người Ý vô sinh với tinh hoàn nhỏ và chúng vô tinh không bế tắc, Colombo và cộng sự cũng sử dụng phương pháp giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa WES đã xác định các đột biến dị hợp tử trên gen *TEX15* và không được tìm thấy trong 65 đối chứng cùng chủng tộc [45]. Các nghiên cứu này đều đã cho thấy các đột biến trên *TEX15* là nguyên nhân gây ra một số trường hợp vô sinh và cho thấy vai trò quan trọng của *TEX15* trong quá trình sinh tinh ở người. Ngoài ra, các đa hình trên gen *TEX15*, trong đó có thể kể đến rs323345, rs323346 và rs323347, đều đã được nghiên cứu và cho thấy có liên quan đến vô sinh nam ở các quần thể người Châu Âu, Trung Quốc và Iran [47, 48, 64], tuy nhiên, kết quả về mối liên quan của các đa hình này với vô sinh nam ở các quần thể trên đều cho kết quả không thống nhất.

1.4.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam

Tại Việt Nam, tỷ lệ vô sinh nói chung, vô sinh nam nói riêng và đặc biệt là vô tinh (azoospermia) khá cao. Theo điều tra dân số toàn quốc năm 1982, tỷ lệ vô sinh ở Việt Nam khoảng 13%. Năm 2013, theo một nghiên cứu do Bệnh viện Phụ sản Trung ương và Đại học Y Hà Nội tiến hành trên toàn quốc, với 14.300 cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh đẻ (15 - 49 tuổi) ở 8 tỉnh đại diện

cho 8 vùng sinh thái ở nước ta, xác định tỉ lệ vô sinh của các cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh đẻ là 7,7%, mà trong đó có khoảng 50% các cặp vợ chồng vô sinh có độ tuổi dưới 30 [65]. Ở Việt Nam hiện nay, có nhiều nhóm các nhà khoa học tập trung nghiên cứu về vô sinh nam giới, chủ yếu đề cập đến các gen đã biết (*CFTR*, *NAT2*, *GSTs*) [66, 67] hoặc vùng gen *AZF* (nhân tố azoospermia) [66, 67]. Nhóm nghiên cứu của Lương Thị Lan Anh, Trường ĐH Y Hà Nội, đã nghiên cứu trên 327 nam giới mắc hội chứng OAT (Oligo - Astheno - Teratozoospermia) sử dụng thuật PCR đa môi, các tác giả đã phát hiện thấy 40/327 nam giới mắc hội chứng OAT có mất đoạn nhỏ trên nhiễm sắc thể Y, nằm chủ yếu tập trung vào khu vực *AZF* (loci) [67]. Nhóm nghiên cứu này cũng đã giải trình tự gen *CTFR* của 194 bệnh nhân nam bất sản ống dẫn tinh và tìm thấy đa hình (TG)mTn được tìm thấy ở intron 8 [68]. Năm 2018, Nguyễn Thị Trang và đồng tác giả đã phân tích đa hình của hai gen N-acetyltransferase-2 (*NAT2*) and glutathione S-transferase (*GSTs*) qua 300 mẫu (150 mẫu của người vô sinh và 150 mẫu đối chứng của người khỏe mạnh). Kết quả phân tích cho thấy, cả hai đa hình đơn đã biết của *NAT2* và của *GSTs* được kết luận là liên quan đến vô sinh [69]. Tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-TPHCM và Bệnh viện Hùng Vương TPHCM, Huỳnh Thị Kim Phương và đồng tác giả đã dùng kỹ thuật Multiplex-PCR để xác định đột biến mất đoạn của vùng *AZF* trên nhiễm sắc thể Y, qua đó xây dựng quy trình chẩn đoán bệnh vô sinh nam không có tinh trùng [66]. Mới đây TS.BS Nguyễn Khắc Hoan thuộc Bệnh viện Từ Dũ cũng đã báo cáo tại hội thảo chia sẻ những xét nghiệm trong chuẩn đoán và điều trị vô sinh tại Bệnh viện Đa khoa Medlatec 21/4/2017 về vấn đề vô sinh và phương pháp xét nghiệm chuẩn đoán xoá đoạn tại vùng *AZF* trên nhiễm sắc thể Y. Trong những năm gần đây, nhóm nghiên cứu của Nguyễn Thùy Dương và các cộng sự đã tiến hành nhiều nghiên cứu về mối liên quan giữa các đa hình trên các gen có vai trò quan trọng trong quá trình sinh tinh và ảnh hưởng đến tinh trùng như *FSIP2*, *PON2* [70], *NR5A1* [71], *TDRD9* [72], và *AK7*...[73, 74] với quần thể vô sinh nam người Việt Nam, cho thấy tầm quan trọng của việc nghiên cứu liên quan đa hình với vô sinh nam và sự cần thiết để tiếp tục thực hiện các nghiên cứu về gen *TEX15* ở Việt Nam.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Hai trăm lẻ hai (202) người nam giới mắc bệnh vô sinh (chẩn đoán vô sinh nam được tham khảo theo hướng dẫn của Hiệp hội Tiết niệu Hoa Kỳ [75]), đều trong độ tuổi sinh đẻ từ 22 đến 49 tuổi, được tuyển chọn theo các tiêu chí sau:

(1) đã được chẩn đoán mắc vô sinh nguyên phát không rõ nguyên nhân (vô tinh hoặc thiếu tinh với số lượng tinh trùng <15 triệu/mL);

(2) có hệ nhiễm sắc thể bình thường, không rối loạn hoặc bị mất đoạn ở vùng AZF;

(3) không bị tắc đường ống dẫn tinh;

(4) không bị mắc các bệnh gây vô sinh như quai bị (làm teo tinh hoàn);

(5) không có tiền sử bị mắc các bệnh truyền nhiễm qua đường sinh dục hay nghiện ma túy.

- Hai trăm (200) người nam giới khỏe mạnh, từ 24 đến 58 tuổi, có ít nhất một người con sinh ra bằng phương pháp tự nhiên được tuyển chọn vào nhóm đối chứng.

Các đối tượng tình nguyện tham gia cung cấp mẫu máu cho nghiên cứu phải ký tên vào bản xác nhận đồng ý hiến mẫu cho mục đích nghiên cứu.

*Cỡ mẫu:

Công thức tính cỡ mẫu:

$$n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{p(1-p)}{\varepsilon^2}$$

Trong đó: n là cỡ mẫu tối thiểu

$Z_{1-\alpha/2}$ = là giá trị từ phân bố chuẩn, được tính dựa trên mức ý nghĩa thống kê; với mức ý nghĩa thống kê = 5% thì $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$

p là tỷ lệ ước đoán (Lấy từ tỉ lệ đa hình rs323347 trong nghiên cứu trước đây của Ruan và các cộng sự năm 2012 tiến hành trên quần thể người Hán [47], chọn $p=0,018$)

ε là mức sai số tương đối chấp nhận (Ở đây, lựa chọn ε ở mức là 0,05)

Thay thế vào công thức tính cỡ mẫu: $n=160$, như vậy số mẫu tối thiểu cho mỗi nhóm là 160 người.

Trong phạm vi thực hiện đề tài, nhóm nghiên cứu lựa chọn tiến hành nghiên cứu trên 202 bệnh nhân cho nhóm bệnh và 200 người cho nhóm đối chứng.

2.1.2. Phạm vi nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu được thu thập ở bệnh viên Đại học Y Nội. Đề tài được thực hiện tại Phòng Hệ gen học người, Viện Nghiên cứu hệ gen trong thời gian từ 2021-2023. Vấn đề liên quan đến đối tượng nghiên cứu đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Viện Nghiên cứu Hệ gen đồng ý thông qua (Số: 2-2019/NCHGHĐĐĐ).

2.2. HÓA CHẤT, DỤNG CỤ VÀ TRANG THIẾT BỊ

- Hóa chất sử dụng:

- Hóa chất dùng để tách DNA tổng số, tinh sạch sản phẩm PCR thuộc bộ kit GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification (Thermo Fisher);
- Hóa chất dùng cho phản ứng PCR: đệm, $MgCl_2$, dNTPs, Taq DNA polymerase của hãng Fermentas;
- Bột agarose (Promega), Ethidium bromide 10 mg/mL (Beckman), DNA Gene Ruler 100 bp/DNA Ladder (Promega);
- Các hóa chất khác như nước khử ion, agarose, ethanol, acetic axit, EDTA, Tris HCl,... của các hãng Thermo, Merck, Sigma.

- Dụng cụ và trang thiết bị

- Ống chứa máu EDTA-K2 (Việt Nam); Găng tay, cốc đong, bình thủy tinh, lò vi sóng, khay đổ gel;
- Pipet định mức và đầu côn các loại 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 20 μ l, 10 μ l, 2,5 μ l, Ống Eppendorf loại 1,5 ml và 0,2 ml;
- Tủ lạnh sâu -20°C, -84°C (Sanyo, Nhật Bản); cân phân tích (Mettler Toledo, Thụy Sĩ); máy đo pH (Mettler); máy li tâm Eppendorf 5415C (Eppendorf, CHLB Đức); máy điện di PowerPac 300 (Bio-Rad, Mỹ); máy chụp ảnh GelDoc (BioSciences); máy GeneAmp® PCR System 9700 (ABI); bể ổn nhiệt (Tempette Junior Techne); máy làm khô chân

không (Speed Vac Sc 110A) (Savant); máy Thermo Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1 Tách chiết DNA tổng số từ mẫu máu toàn phần

- Nguyên lý

Từ mẫu máu toàn phần, tế bào được tách khỏi cấu trúc nội mô thành các tế bào đơn lẻ, biệt lập. Tế bào được phá vỡ màng bằng các tác nhân hoặc hóa học (dung dịch ly giải tế bào). Khi màng tế bào phá vỡ giải phóng các thành phần trong tế bào chất (chủ yếu là protein). Các chất được thêm vào để biến tính hoặc phân giải protein, từ đó tách ra khỏi dung dịch dưới dạng tủa. Cuối cùng, DNA được hòa tan trong dung dịch đệm và bảo quản ở điều kiện nhiệt độ thấp (4°C hoặc -20°C).

- Các bước tiến hành

Quy trình tách chiết DNA tổng số của các mẫu máu được thực hiện trên bộ kit tách chiết và tinh sạch thương mại (Thermo), từng bước cụ thể như sau:

- Bước 1: Máu cất giữ ở -20°C được lấy ra và để vào tủ ấm 37°C trong thời gian 30 phút.
- Bước 2: Thêm 20 µl Proteinase K vào 200 µl máu, mix bằng vortex. Thêm 400 µl Lysis solution, mix hoàn toàn bằng vortex hoặc pipet.
- Bước 3: Ủ mẫu ở 56°C trong 10 phút và thỉnh thoảng vortex hoặc sử dụng bể lắc đến khi tế bào tan hoàn toàn.
- Bước 4: Thêm 200 µl ethanol (96-100%) và mix bằng vortex hoặc pipet.
- Bước 5: Chuyển hỗn hợp trên vào cột được cung cấp theo bộ kit. Ly tâm ở 8000 vòng/phút trong vòng 1 phút. Loại bỏ ống thu có chứa dịch. Đặt cột vào một ống thu 2ml mới.
- Bước 6: Thêm 500 µl Wash Buffer I (đã thêm ethanol). Ly tâm ở 10000 vòng/phút trong vòng 1 phút. Loại bỏ dịch sau khi ly tâm.
- Bước 7: Thêm 500 µl Wash Buffer II (đã thêm ethanol). Ly tâm ở tốc độ tối đa trong 3 phút (≥ 12000 vòng trên phút). Loại bỏ dịch sau khi ly tâm.
- Bước 8: Đặt cột vào ống ly tâm 1.5ml sạch để thu DNA. Thêm 200 µl Elution Buffer vào giữa màng cột để elute DNA. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 phút và ly tâm ở 10000 vòng/phút trong 1 phút.
- Bước 9: Bỏ cột. Sử dụng DNA đã được tinh sạch hoặc lưu trữ ở -20°C.

2.3.2. Phương pháp định lượng DNA bằng quang phổ kế

- Nguyên lý

Dựa vào sự hấp thụ ánh sáng tối đa ở bước sóng 260 nm của hai đơn phân cấu tạo nên DNA là base purin và pyrimidin, người ta sử dụng giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 nm để xác định nồng độ axit nucleic trong mẫu. Ngoài ra, mật độ quang tại bước sóng 280 nm còn xác định được nồng độ protein. Từ đó dựa vào tỷ lệ A_{260}/A_{280} để kiểm tra chất lượng của DNA tách chiết. Sản phẩm đạt yêu cầu khi tỷ lệ $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$

- Các bước tiến hành

- Lấy 2 μ l dung môi (TE pH 8,0 hoặc nước khử ion vô trùng) để làm blank.

- Sử dụng 2 μ l mỗi mẫu để xác định nồng độ DNA ở bước sóng 260nm và 280nm.

- Ghi lại kết quả nồng độ DNA cho mỗi mẫu nghiên cứu sau mỗi lần đo.

2.3.3. Thiết kế môi PCR

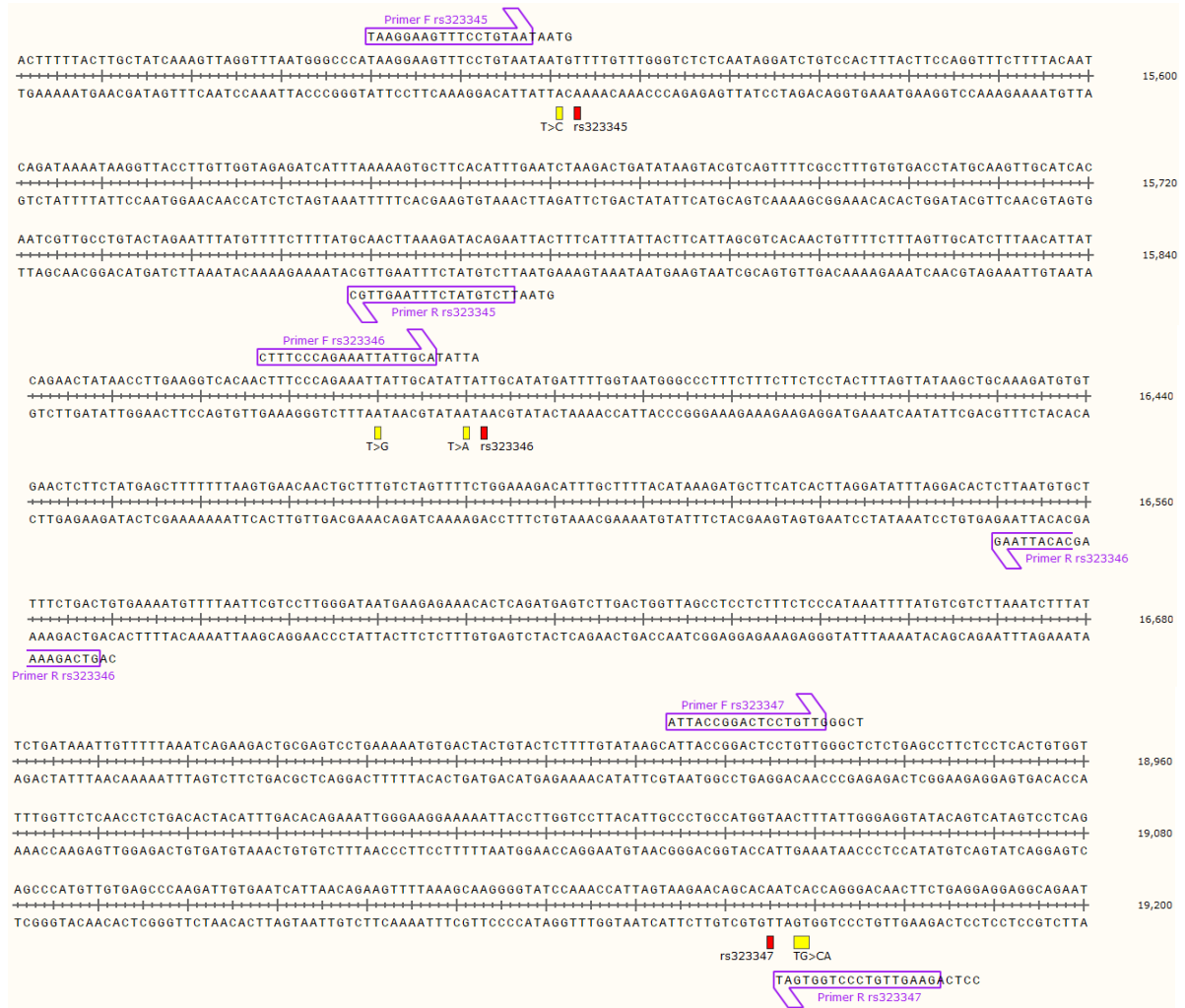
Các đoạn môi đặc hiệu tương ứng với từng đoạn gen có chứa SNP được thiết kế dựa trên vị trí của từng SNP. Đối với SNP có các vùng vị trí nhận biết tự nhiên, trình tự môi được thiết kế bằng phần mềm NCBI Primer BLAST với các tham số mặc định. Với các SNP không có vị trí phân cắt enzyme tự nhiên, các nucleotide gần đầu 3' của đoạn môi ngay trước (hoặc sau) vị trí SNP sẽ được sửa đổi để tạo vị trí nhận biết enzym cắt giới hạn theo các điều kiện sau: nucleotide cải biến không trùng vào vị trí nucleotide cuối cùng của môi, số lượng nucleotide cải biến không vượt quá ba nucleotide. Cuối cùng, cả hai đoạn môi ngược và xuôi đều được kiểm tra hóa bằng cách sử dụng công cụ OligoAnalyzer (www.idtdna.com/calc/analyzer).

Bảng 2.1. Trình tự các cặp môi sử dụng cho phản ứng PCR

Gen	SNP	Trình tự	Kích thước (bp)
<i>TEX15</i>	rs323345	F: 5'-TAAGGAAGTTTCCTGTAATAACG-3'	261bp
		R: 5'-GTAATTCTGTATCTTTAAGTTGC-3'	
	rs323346	F: 5'-CTTTCCCAGAAATGATTGCATATAA-3'	224bp

		R: 5'-CAGTCAGAAAAGCACATTAAG-3'	
	rs323347	F: 5'-ATTACCGGACTCCTGTTGGGCT-3'	275bp
		R: 5'-CCTCAGAAGTTGTCCCTGGCAAT-3'	

Sơ đồ vị trí các cặp mồi được thiết kế của 3 đa hình rs323345, rs323346 và rs323347 trên gen *TEX15* được thể hiện ở Hình 2.1



Hình 2.1. Sơ đồ các cặp mồi trên gen *TEX15* được thể hiện trên phần mềm SnapGene Viewer

2.3.4. Khuếch đại vùng DNA chứa đa hình bằng PCR

Các mẫu DNA tổng số được pha loãng về nồng độ đồng nhất (khoảng 5 ng/ μ L) và sau đó được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR. Đoạn DNA chứa các đa hình nghiên cứu được khuếch đại bằng phương pháp PCR với các cặp mồi đặc hiệu.

Phản ứng PCR bao gồm 3 giai đoạn

- Giai đoạn 1 (giai đoạn biến tính): giai đoạn này được thực hiện với nhiệt độ cao từ 94 - 95°C. Trong quá trình này đã làm đứt các liên kết hidro, từ đó DNA mạch kép tách thành 2 mạch đơn tạo mạch khuôn cho quá trình tổng hợp.

- Giai đoạn 2 (giai đoạn gắn mồi): trong giai đoạn này nhiệt độ được hạ thấp xuống về nhiệt độ gắn mồi cho phép các đoạn oligonucleotid gắn với sợi DNA khuôn. Một nhiệt độ gắn mồi thích hợp được duy trì để cho phép gắn mồi phù hợp và có độ đặc hiệu cao.

- Giai đoạn 3 (giai đoạn kéo dài): nhiệt độ được tăng lên đến 72°C là nhiệt độ hoạt động tối ưu nhất của enzym Taq polymerase, dưới tác động của enzym này các mạch đơn được tổng hợp theo nguyên tắc bổ sung

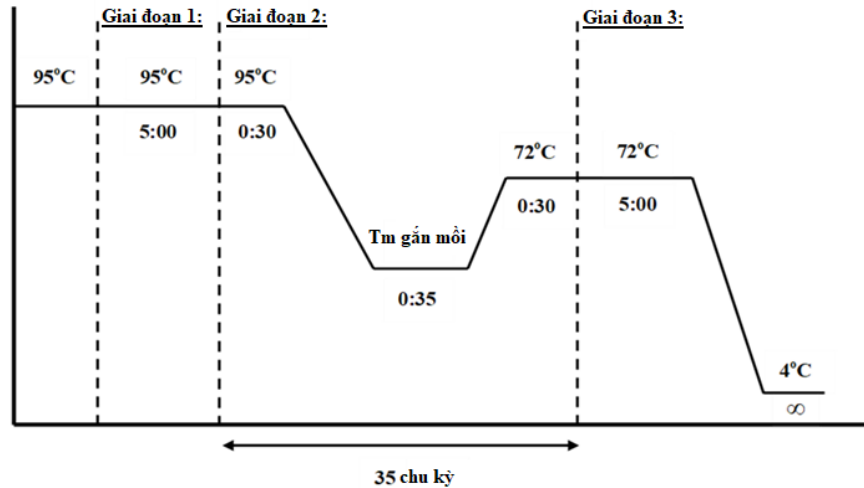
Tổng thể tích phản ứng PCR là 10 μL bao gồm nước không chứa nuclease (H_2O), Buffer Dream Taq (10X), dNTPs (2.5mM), Taq polymerase (5U/ μL), mồi F/R (10 pmol) và mẫu DNA ($\sim 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$); thể tích của các thành phần được sử dụng cụ thể theo Bảng 2.2.

Bảng 2.2. Thành phần các chất trong một mẫu phản ứng PCR

Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μL)
H_2O		6,35
Buffer Dream Taq	10X	1
dNTPs	2,5 mM	0,6
Taq polymerase	5U/ μL	0,05
Mồi xuôi (F)	10 pmol	0,5
Mồi ngược (R)	10 pmol	0,5
Mẫu DNA	$\sim 5 \text{ ng} / \mu\text{L}$	1
Tổng		10

Phản ứng khuếch đại DNA có chứa các đa hình *TEX15* (rs323345, rs323346, rs323347) bằng phương pháp PCR có điều kiện như sau: 95°C – 5 phút; (95°C – 30 giây; T_m – 30 giây; 72°C – 30 phút) x 35 chu kỳ; 72°C – 5 phút. Sau đó giữ sản phẩm ở 4°C. Nhiệt độ gắn mồi T_m của các đa hình rs323345, rs323346, rs323347 lần lượt là 53°C, 55°C, 57°C

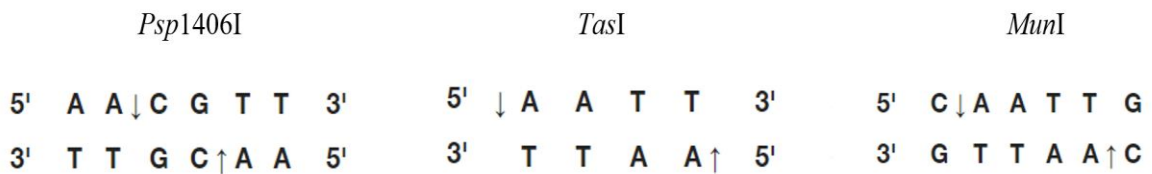
Điều kiện PCR được minh họa trong hình dưới đây (Hình 2.1)



Hình 2.2. Chu trình chạy phản ứng PCR

2.3.5. Phương pháp RFLP

Sản phẩm PCR của đa hình *TEX15* rs323345, rs323346, rs323347 được cắt lần lượt bằng các enzyme cắt giới hạn (RE) *Psp1406I*, *TasI* và *MunI* (Thermo Fisher) (Hình 2.2) theo kỹ thuật đa hình chiều dài đoạn giới hạn (PCR-RFLP).



Hình 2.3. Trình tự nhận biết của enzyme *Psp1406I*, *TasI* và *MunI*

Psp1406I và *MunI* là các RE cắt đầu dính và *TasI* là một RE cắt đầu bằng. Các enzyme này sẽ nhận biết được vị trí cắt tại vùng trình tự xung quanh các SNP và sử dụng phần mềm SnapGene® (Insightful Science; có tại snapgene.com) có thể nhận biết được các sản phẩm cắt enzyme dựa trên sản phẩm PCR. Trong điều kiện thích hợp, nếu không xảy ra đột biến, enzyme giới hạn sẽ cắt sản phẩm PCR thành 2 đoạn, nếu có xảy ra đột biến, enzyme không cắt sản phẩm PCR vì không nhận biết được vị trí cắt nên chỉ thu được 1 đoạn. Số lượng và kích thước của ba kiểu gen của các đa hình được phân tích trên lý thuyết khi điện di trên gel agarose được mô tả trong Bảng 2.3.

Bảng 2.3. Số lượng và kích thước đoạn DNA tương đương với các kiểu gen của 3 đa hình trên *TEX15*

SNP	Kiểu gen	Số lượng băng điện di	Kích thước các băng điện di (bp)
rs323345	TT	2	238; 23
	TC	3	261; 238; 23
	CC	1	261
rs323346	TT	2	201; 23
	TC	3	224; 201; 23
	CC	1	224
rs323347	AA	2	24; 251
	AG	3	275; 251; 24
	GG	1	275

Tổng thể tích phản ứng cắt giới hạn bằng enzym là 5 μL , gồm nước không chứa nuclease (H_2O), Buffer tương ứng và enzyme. Hỗn hợp được ủ ở 37°C đối với enzyme *Psp1406I* và *MunI* và 65°C đối với enzyme *TasI* trong bể ủ nhiệt trong 5 giờ.

Bảng 2.4. Thành phần các chất tham gia phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn

Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μL)
H_2O		1,55
Buffer Tango cho <i>Psp1406I</i>	10X	0,35
Buffer G cho <i>MunI</i>		
Buffer B cho <i>TasI</i>		
Enzyme tương ứng	10U/ μL	0,1
Sản phẩm PCR		3,0
Tổng		5

2.3.6. Phương pháp điện di trên gel agarose

Sản phẩm DNA sau khi chạy PCR và sản phẩm sau khi xử lí bằng enzyme cắt giới hạn được phân tích định tính nhờ phương pháp điện di trên

gel agarose. Axit nucleic là phân tử mang điện tích âm, vì thế khi điện di các đoạn DNA đã được khuếch đại sẽ dịch chuyển về cực dương trong điện trường. Các đoạn DNA kích thước khác nhau sẽ chạy với tốc độ khác nhau trên gel. Sử dụng bản gel agarose để điện di, sau đó nhuộm bản gel với ethidium bromide, các phân tử ethidium bromide sẽ chèn vào giữa các base nitơ của axit nucleic, khi chụp dưới ánh sáng tử ngoại sẽ cho hình ảnh các băng sáng. So sánh hình ảnh thu được với marker và độ dài gen đích sẽ cho thấy kích thước sản phẩm PCR và sản phẩm sau khi xử lý enzyme.

Các bước tiến hành

- Chuẩn bị gel agarose 1% và 3%: Cho 1g/3g agarose vào 100 ml đệm TAE 1X, đun hỗn hợp bằng lò vi sóng trong khoảng 1 – 1,5 phút đến khi dung dịch sôi hoàn toàn và bột agarose tan hết thành dung dịch đồng nhất.
- Để nguội thì đổ gel vào khay điện di đã có sẵn các lược để tạo giếng. Bề dày gel khoảng 50mm là thích hợp. Sau 20-30 phút khi agarose đông đặc hoàn toàn thì có thể tiến hành điện di.
- Đặt bản gel vào bể điện di, sao cho bản gel ngập hoàn toàn trong đệm TBE 1X. Tra 2 μ l Marker 100 bp vào giếng đầu tiên. Tra 2-3 μ l sản phẩm PCR lần lượt vào các giếng còn lại trên bản gel.
- Chạy điện di trong khoảng 20 phút với hiệu điện thế (U: 100 - 150 V) và cường độ dòng điện (I: 80 - 100 mA).
- Nhuộm DNA: Ngâm bản gel đã điện di vào dung dịch nhuộm Ethidium bromide (10 mg/mL) trong 3-5 phút. Sau đó lấy bản gel ra khỏi dung dịch nhuộm và rửa nước để loại bỏ phần Ethidium bromide dư thừa.
- Quan sát và chụp ảnh: Bản gel sau khi nhuộm với Ethidium bromide được soi bằng tia tử ngoại (UV). Quan sát các vạch sáng xuất hiện trên bản gel và chụp hình lưu trữ kết quả.

2.3.7. Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

Dữ liệu thu thập từ các phương pháp PCR - RFLP được phân tích thống kê bằng Microsoft Excel (Microsoft Corp., Washington, DC, USA) và R phiên bản 4.1.2 [76]. Kiểm định Chi-bình phương (χ^2) (gói code "Hardy-Weinberg" trong R) được thực hiện để kiểm tra trạng thái cân bằng Hardy-Weinberg (HWE) của quần thể [77]. Mối liên quan giữa đa hình với vô sinh nam được khảo sát bằng ba mô hình thử nghiệm khác nhau (cộng gộp, trội và lặn) [78], trong đó phép kiểm định Fisher (Fisher exact test) được sử dụng cho

những SNP với kích thước mẫu dự kiến dưới 5 và thử nghiệm Chi bình phương (Chi square test) cho những đa hình có kích thước mẫu dự kiến lớn hơn 5 [79]. Phân tích haplotype được thực hiện bằng phần mềm SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>) [80]. Tỷ lệ OR (odds ratio) với khoảng tin cậy 95% được tính toán để đánh giá mối liên quan đó. Kiểm định Mann–Whitney U được thực hiện để so sánh các giá trị chỉ số lâm sàng giữa 2 nhóm nghiên cứu bằng phần mềm SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0). Tất cả các phép kiểm định đều có tính chất tương đối. Các kiểm định được coi là có ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$.

2.4. VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU

- Các đối tượng tham gia nghiên cứu hoàn toàn tự nguyện.
- Đối tượng nghiên cứu được giải thích rõ ràng về mục tiêu nghiên cứu, thông tin riêng của đối tượng được đảm bảo bí mật.
- Nghiên cứu đảm bảo tuân thủ các quy định đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học.
- Nghiên cứu này đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Viện Nghiên cứu hệ Gen thông qua theo quyết định số 3.1 - 2019/NCHG-HĐĐĐ

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÂN TÍCH CÁC ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG Ở HAI NHÓM BỆNH NHÂN VÀ NHÓM ĐỐI CHỨNG

Các đặc điểm lâm sàng của 402 mẫu nghiên cứu gồm 202 bệnh nhân vô sinh nam và 200 mẫu đối chứng đã được phân tích để đánh giá liên quan lâm sàng giữa hai nhóm bệnh và chứng. Kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ được tổng hợp ở Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ của các đối tượng nghiên cứu

Các chỉ số tinh dịch	Nhóm vô sinh nam	Nhóm đối chứng	Giá trị <i>p</i>
Độ pH	7.5	7.5	0,739
Thể tích tinh dịch (mL)	3	3.1	0,012
Tổng số lượng tinh trùng (10^6)	11.2	417.3	<0,001
Mật độ tinh trùng (10^6 / mL)	4	120	<0,001
Khả năng di động (%)	3	68	<0,001

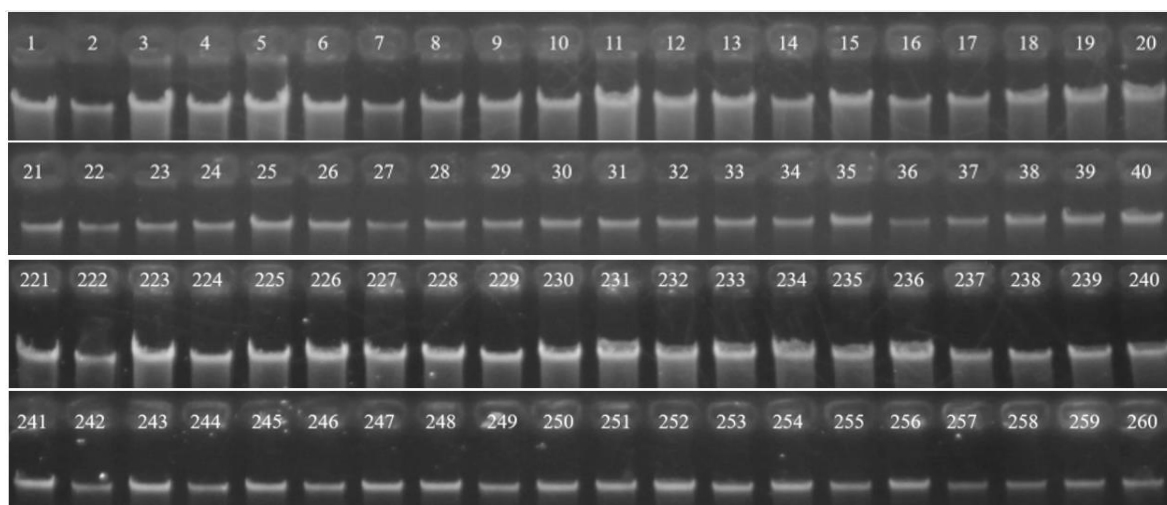
*Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung vị; sự khác biệt giữa hai nhóm được thể hiện qua giá trị *p* được tính bằng kiểm định Mann–Whitney U; giá trị *p* < 0,05 biểu thị ý nghĩa thống kê.*

Kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ được đánh giá theo 5 chỉ số là độ pH, thể tích tinh dịch, tổng số lượng tinh trùng, mật độ tinh trùng và khả năng di động của tinh trùng. Giá trị tham chiếu của tổ chức WHO 2021 cho một mẫu tinh trùng bình thường là độ pH từ 7,2-8,0, thể tích tinh dịch lớn hơn hoặc bằng 1,4mL, tổng số lượng tinh trùng trong một lần xuất tinh lớn hơn hoặc bằng 39 triệu, mật độ tinh trùng lớn hơn 16 triệu tinh trùng trên một ml và khả năng di động của tinh trùng lớn hơn 42%. Có thể thấy giá trị trung vị của nhóm đối chứng ở cả 5 chỉ số đều lớn hơn mức tham chiếu bình thường của tổ chức WHO, cho thấy nhóm đối chứng đều có chất lượng tinh trùng tốt, các đối tượng đều có khả năng sinh sản. Ngược lại, giá trị trung vị của nhóm vô sinh nam, chỉ có chỉ số độ pH và thể tích tinh dịch nằm ở khoảng tham chiếu bình thường, giá trị trung vị của các chỉ số còn lại như tổng số tinh trùng, mật độ tinh trùng và khả năng di động đều thấp hơn rất nhiều so với khoảng tham chiếu, thể hiện nhóm vô sinh trong nghiên cứu đều gồm các đối tượng vô tinh

và thiếu tinh, ít tinh trùng hoặc không có tinh trùng, tinh trùng chất lượng kém và kém di chuyển. So sánh giữa giá trị trung vị thể tích tinh dịch, tổng số tinh trùng, mật độ tinh trùng và khả năng di động của hai nhóm vô sinh nam và nhóm đối chứng cho thấy sự khác biệt đáng kể với giá trị $p < 0,05$, cho thấy kết quả có ý nghĩa thống kê. Thông tin lâm sàng này của các đối tượng nghiên cứu cho thấy những bệnh nhân vô sinh nam và những người ở nhóm đối chứng đều đảm bảo các tiêu chí nghiên cứu, phù hợp để tiến hành các bước phân tích tiếp theo.

3.2. KẾT QUẢ TÁCH CHIẾT DNA TỔNG SỐ

Quy trình tách chiết DNA tổng số được thực hiện như đã trình bày trong phần 2.3.1. Nồng độ và độ tinh sạch DNA của các mẫu nghiên cứu được đánh giá bằng hai phương pháp là phương pháp đo quang phổ và phương pháp điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di trên gel agarose 1% của DNA tổng số tách chiết được từ mẫu máu cho thấy các băng DNA sắc nét và sáng (Hình 3.1). Điện di của đầy đủ 402 mẫu DNA được cung cấp ở Phụ lục 2.



Hình 3.1. Kết quả điện di DNA tổng số các mẫu trên gel agarose 1%

01 – 40: DNA tổng số của 40 mẫu vô sinh nam ký hiệu từ VSN001 – VSN040

221 – 260: DNA tổng số của 40 mẫu đối chứng ký hiệu từ VSC019 – VSC058

Toàn bộ 402 mẫu DNA được định lượng bằng máy quang phổ NanoDrop để xác định chính xác hơn về nồng độ và độ tinh sạch của mẫu. Kết quả đo nồng độ DNA của 10 mẫu vô sinh nam và 10 mẫu vô sinh chứng được thể hiện ở Bảng 3.2, cho thấy nồng độ cao và giá trị mật độ quang học (Optical density - OD) trong mức chấp nhận. Tỷ lệ giữa độ hấp thụ ở bước sóng 260 và 280nm (A_{260}/A_{280}) trong khoảng 1,7 - 1,9. Nồng độ DNA của các mẫu còn lại được trình bày đầy đủ ở Phụ lục 1.

Bảng 3.2. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA ở một số mẫu đại diện

STT	Mã mẫu nghiên cứu	Nồng độ DNA (ng/ μ l)	Độ tinh sạch DNA (A_{260}/A_{280})
1	VSN001	21.10	1.83
2	VSN002	31.78	1.81
3	VSN003	35.91	1.79
4	VSN004	20.35	1.81
5	VSN005	25.74	1.82
6	VSN006	27.33	1.83
7	VSN007	28.34	1.80
8	VSN008	20.85	1.78
9	VSN009	21.10	1.83
10	VSN010	31.78	1.81
11	VSC019	26.84	1.74
12	VSC020	34.56	1.75
13	VSC021	22.68	1.74
14	VSC022	26.37	1.75
15	VSC023	24.79	1.81
16	VSC024	26.40	1.76
17	VSC025	28.37	1.85
18	VSC026	30.46	1.85
19	VSC027	25.98	1.80
20	VSC028	33.21	1.81

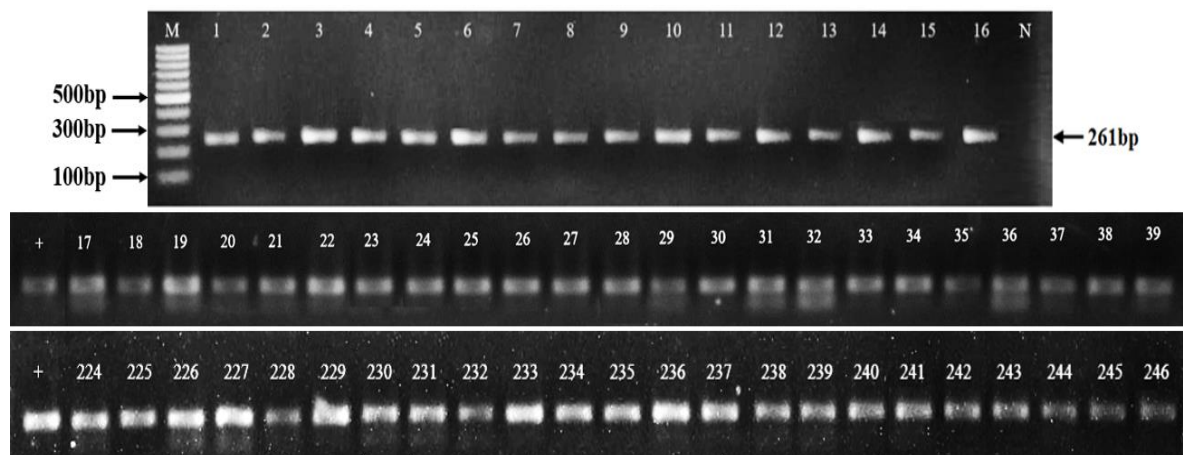
Kết quả cho thấy, DNA tổng số sau khi tách chiết đều xuất hiện một băng rõ nét, độ đậm nhạt của băng điện di phản ánh nồng độ DNA thu được. Kết hợp với kết quả thu được trên máy đo quang phổ, có thể thấy các mẫu đều

đạt chất lượng, đủ điều kiện cho các phản ứng tiếp theo. Sau khi tách chiết 402 mẫu DNA, tiến hành pha loãng các mẫu DNA tổng số này về cùng nồng độ tiêu chuẩn (khoảng 5 ng/ μ L) để dùng làm DNA cho các phản ứng PCR tiếp theo.

3.3. ĐÁNH GIÁ LIÊN QUAN GIỮA *TEX15* rs323345 VÀ VÔ SINH NAM

3.3.1. Xác định thành phần kiểu gen đa hình *TEX15* rs323345

Vùng DNA chứa SNP rs323345 trên gen *TEX15* được khuếch đại thành công bằng phương pháp PCR. Sản phẩm này được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di cho thấy đã khuếch đại thành công trình tự đặc hiệu cho tất cả các mẫu có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết. Một phần kết quả được trình bày trong Hình 3.2, các kết quả còn lại sẽ được trình bày đầy đủ trong Phụ lục 3.



Hình 3.2. Sản phẩm PCR khuếch đại vùng DNA chứa *TEX15* rs323345

M: Marker 100 bp,

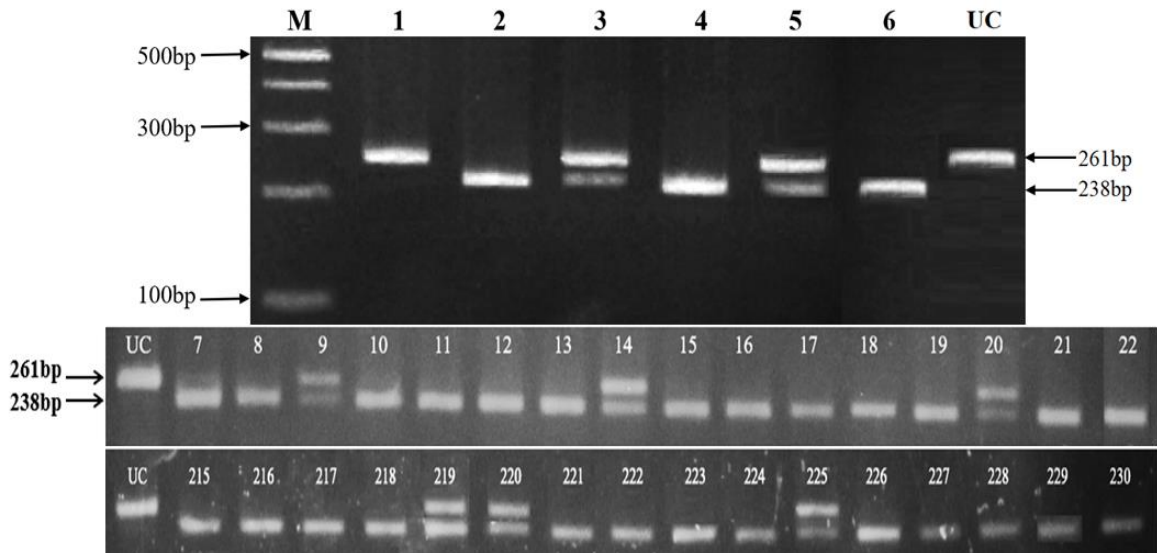
1 – 39: Sản phẩm PCR của mẫu vô sinh nam ký hiệu VSN001 – VSN039,

224 – 246: Sản phẩm PCR của mẫu đối chứng ký hiệu VSC022 – VSC044,

N: Đối chứng âm, +: chứng dương

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen chứa *TEX15* rs323345 được xử lý với enzyme *Psp1406I* ở nhiệt độ 37°C trong 5 giờ. Sau đó, sản phẩm này được điện di kiểm tra trên gel agarose 3%. Kết quả điện di sản phẩm cắt của một số mẫu đại diện cho thấy ở giếng 1 có 1 băng DNA duy nhất có kích thước 261bp tương ứng với kiểu gen CC; các giếng 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 215, 216, 217, 218, 221, 222, 223, 224, 226, 227, 228, 229, 230: có 1 băng DNA duy nhất có kích thước 238bp tương ứng với kiểu

gen TT và ở giếng 3, 5, 9, 14, 20, 219, 220, 225 có 2 băng DNA có kích thước lần 261bp và 238bp tương ứng với kiểu gen TC. Theo lý thuyết các mẫu có kiểu gen TT và TC sản phẩm cắt có thêm băng DNA kích thước 23bp tuy nhiên khi điện di không quan sát được băng này trên gel agarose 3% do kích thước quá nhỏ (Hình 3.3). Kết quả xác định kiểu đa hình rs323345 gen *TEX15* được trình bày đầy đủ trong Phụ lục 4.



Hình 3.3. Điện di sản phẩm PCR sau khi được xử lý với enzyme *Psp1406I*

M: Marker 100 bp; *UC*: Sản phẩm PCR không xử lý bằng enzyme *Psp1406I*
 1 - 22: Sản phẩm cắt bằng enzyme *Psp1406I* mẫu vô sinh nam ký hiệu VSN001 – VSN022;

215 – 230: Sản phẩm cắt bằng enzyme *Psp1406I* mẫu đối chứng ký hiệu VSC013 – VSC028

Kết quả xác định kiểu gen và tần số allele của đa hình *TEX15* rs323345 được thống kê và tóm tắt ở Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele của đa hình *TEX15* rs323345

	Kiểu gen			Tần số allele		HWE (Giá trị p)
	TT	TC	CC	T	C	
Nhóm bệnh (n=202)	164	37	1	0,904	0,096	0,476

Nhóm đối chứng (n=200)	166	34	0	0,915	0,085	0,189
Tổng (n=402)	330	71	1	0,909	0,091	

Phân tích thống kê cho thấy sự phân bố kiểu gen của đa hình này *TEX15* rs323345 tuân theo định luật Hardy-Weinberg (HWE) ở trên nhóm bệnh nhân vô sinh nam, nhóm đối chứng khoẻ mạnh và trên toàn bộ đối tượng nghiên cứu ($p > 0,05$). Kiểu gen CC chỉ quan sát được trong nhóm bệnh, mà không quan sát được trong nhóm đối chứng với tỉ lệ xuất hiện ở nhóm bệnh là 0,005. Kiểu gen TT là kiểu gen phổ biến nhất trong quần thể với tỉ lệ xuất hiện ở nhóm bệnh là 0,82 và ở nhóm đối chứng là 0,83. Kiểu gen TT, TC và CC trong quần thể có tỉ lệ lần lượt là 0,82; 0,177 và 0,003 (Bảng 3.3). Tần số allele C trong nhóm bệnh, nhóm đối chứng và toàn bộ quần thể nghiên cứu tương ứng là 0,096; 0,085 và 0,091 (Bảng 3.3). Ngoài ra, kết quả phân tích cho thấy không có sự khác biệt giữa tần số allele của đa hình nghiên cứu giữa nhóm bệnh và nhóm đối chứng.

3.3.2. Phân tích sự liên quan giữa đa hình *TEX15* rs323345 với vô sinh nam

Để phân tích mối liên quan giữa đa hình rs323345 gen *TEX15* với vô sinh ở nam giới, kiểm định Chi-square đã được thực hiện trên cả ba mô hình trội, lặn và cộng gộp. Giá trị p quan sát được ở cả 3 mô hình được thể hiện Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Đánh giá liên quan giữa đa hình *TEX15* rs323345 và vô sinh nam

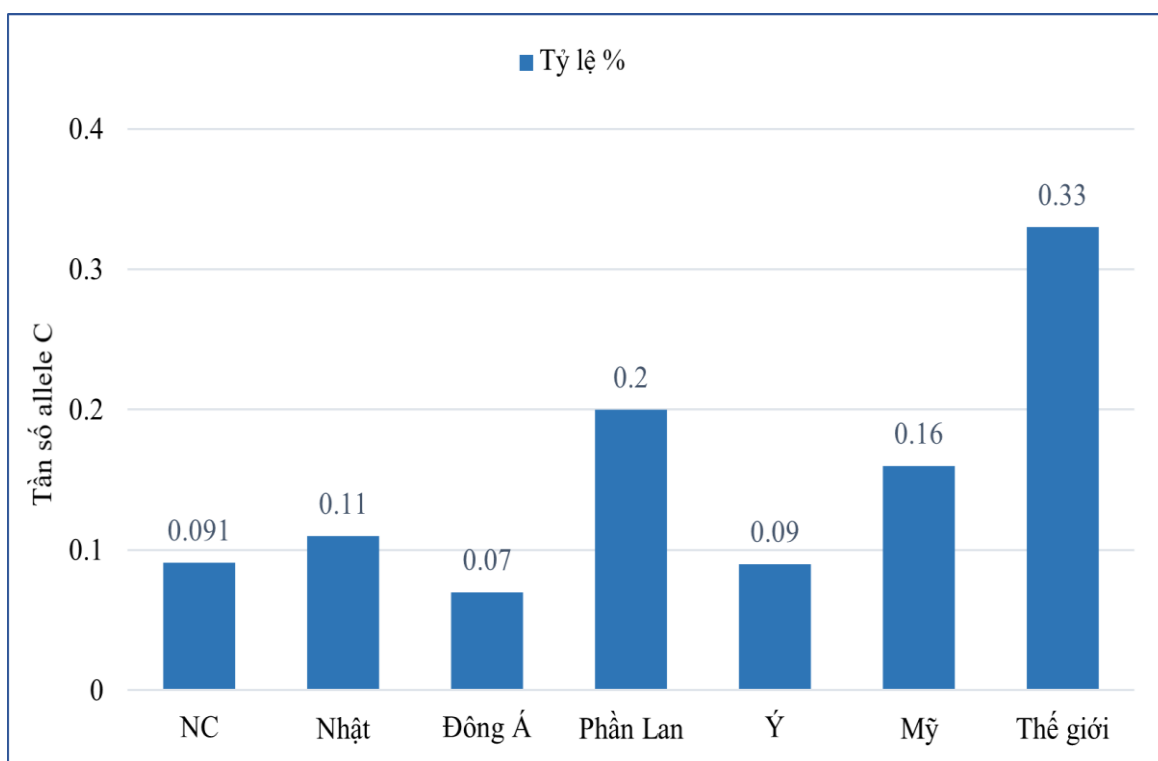
	Mô hình	Nhóm bệnh (n = 202)	Nhóm đối chứng (n=200)	OR	95% CI	Giá trị p
<i>TEX15</i> rs323345	Cộng gộp					0,961
	TT	81,19%	83%	1,000		
	TC	18,31%	17%	1,076	0,644 – 1,799	0,777

CC	0,5%	0%	1,018	0,025 – 39,940	0,989
Trội					
TT	81,19%	83%	1,000		
TC + CC	18,81%	17%	1,130	0,677 – 1,893	0,636
Lặn					
TT + TC	99,5%	100%	1,000		
CC	0,5%	0%	1,868	0,15 – 58,975	0,568
Alleles					
T	90,35%	91,5%	1,000		
C	9,65%	8,5%	1,149	0,708 – 1,872	0,569

Kết quả nghiên cứu cho thấy trong cả ba mô hình là mô hình cộng gộp, mô hình trội, hay mô hình lặn có giá trị p ở ba mô hình này lần lượt là 0,961; 0,636; 0,568, đều lớn hơn 0,05, cho thấy không có bất cứ mối liên quan nào giữa kiểu gen của đa hình này với vô sinh nam trong 402 cá thể nghiên cứu. Do đó, trong phạm vi nghiên cứu này, đa hình này xuất hiện ngẫu nhiên trong cả quần thể vô sinh nam và quần thể người khỏe mạnh, sự xuất hiện của các SNP này không liên quan đến khả năng mắc bệnh hay có giảm nguy cơ mắc vô sinh nam ở các nhóm quần thể nghiên cứu. Tương tự, cũng không tìm thấy sự khác biệt về tần số allele T và C giữa 2 nhóm bệnh và chứng.

Đa hình rs323345 (chr8:30845086, T>C) dẫn đến sự biến đổi amino axit Asparagine tại vị trí 1694 thành amino axit Serine. Đa hình này đã được nghiên cứu để đánh giá mối liên quan của nó với nguy cơ vô sinh nam ở ba nhóm quần thể khác nhau và cho thấy các kết quả không thống nhất. Trên quần thể người da trắng ở Châu Âu gồm 158 nam giới khỏe mạnh (>20 triệu tinh trùng/ml), 141 người bị thiếu tinh (<5 triệu tinh trùng/ml) và 80 người mắc vô tinh không tác nhân, *TEX15* rs323345 được cho thấy là có liên quan

đến tình trạng vô tinh không tắc nghẽn (NOA), thiếu tinh trùng nghiêm trọng (SO) và thiếu tinh trùng ở nam giới vô sinh với giá trị $p = 0,0121$, tần số allele C là 0,09 trong nhóm vô sinh nam [64]. Tuy nhiên trái ngược với nghiên cứu ở Châu Âu, các nghiên cứu về đa hình rs323345 trên các quần thể khác cho kết quả khác biệt [47, 81]. Năm 2012, trong một nghiên cứu trên quần thể người Hán ở Trung Quốc gồm 309 nam giới vô sinh và 377 nam giới bình thường, phân tích cho thấy không có mối liên quan khác biệt nào giữa đa hình rs323345 với quần thể này ($p > 0,05$) [50]. Trong một nghiên cứu khác tiến hành trên 136 người đàn ông bị vô sinh vô căn (93 người đàn ông có nguồn gốc là người Macedonian, 32 người là người Albania và 11 người có nguồn gốc khác) và 161 đối chứng (125 người gốc Macedonia và 36 người Albania), cũng không tìm thấy mối liên hệ nào giữa *TEX15* rs323345 và nam giới vô tinh và thiếu tinh ở quần thể này ($p > 0,05$) [82]. Trong nghiên cứu này, trên quần thể nam giới người Việt Nam, mặc dù sự phân bố các kiểu gen của đa hình *TEX15* rs323345 tuân theo trạng thái cân bằng Hardy-Weinberg, tuy nhiên, cũng không tìm thấy bất kỳ mối liên quan nào giữa đa hình này và vô sinh nam trong ba mô hình (cộng gộp, trội và lặn) ($p > 0,05$). Ngoài ra, chúng tôi cũng so sánh tần số allele C trong nghiên cứu này với 7 quần thể khác nhau (Hình 3.4). Mặc dù tần số của allele C trong quần thể nam giới Việt Nam được nghiên cứu cao hơn so với người Đông Á và người Ý, nhưng lại nhỏ hơn so với các nhóm dân tộc khác bao gồm người Nhật, người Phần Lan và người Mỹ. Có thể thấy, tần số của allele C trong nghiên cứu này tương đồng với tần số của quần thể Đông Á, nơi có cùng khu vực địa lý với nước ta, tuy nhiên lại nhỏ hơn nhiều so với tần số trên thế giới.

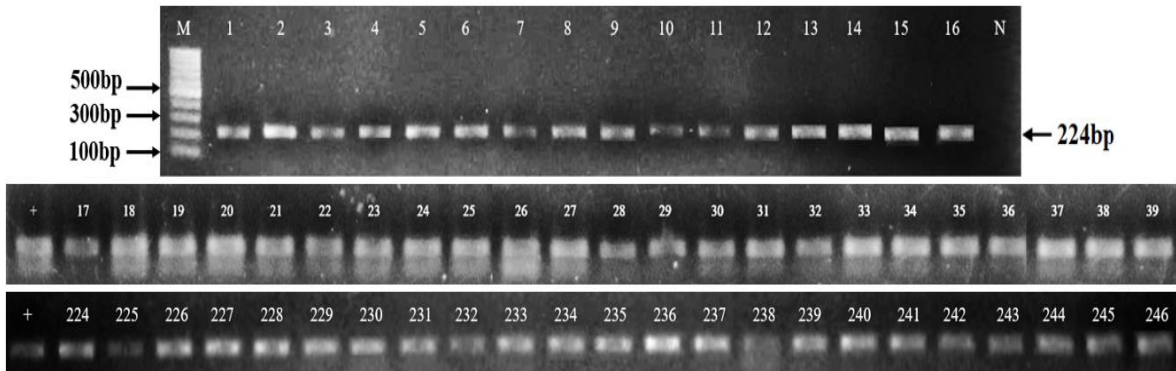


Hình 3.4. Tần số allele C rs323345 ở quần thể người Việt Nam trong nghiên cứu và các quần thể khác

3.4. ĐÁNH GIÁ LIÊN QUAN GIỮA *TEX15* rs323346 VÀ VÔ SINH NAM

3.4.1. Xác định thành phần kiểu gen đa hình *TEX15* rs323346

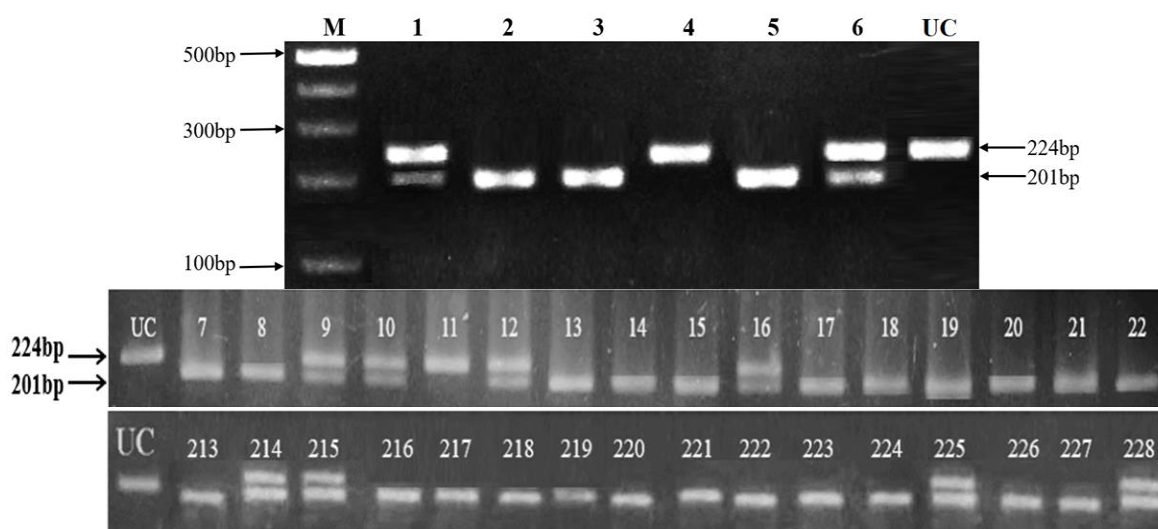
Vùng DNA chứa SNP rs323346 trên gen *TEX15* được khuếch đại thành công bằng phương pháp PCR. Sản phẩm này được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di cho thấy đã khuếch đại thành công trình tự đặc hiệu cho tất cả các mẫu có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết. Một phần kết quả được trình bày trong Hình 3.5, các kết quả còn lại sẽ được trình bày đầy đủ trong Phụ lục 5.



Hình 3.5. Sản phẩm PCR khuếch đại vùng DNA chứa *TEX15* rs323346

M: Marker 100 bp. 1 – 39: Sản phẩm PCR của mẫu vô sinh nam ký hiệu VSN001 – VSN039, 224 – 246: Sản phẩm PCR của mẫu đối chứng ký hiệu VSC022 – VSC044, *N*: Đối chứng âm, +: chứng dương

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen chứa *TEX15* rs323346 được xử lý với enzyme *TasI* ở nhiệt độ 65°C trong 5 giờ. Sau đó, sản phẩm này được điện di kiểm tra trên gel agarose 3%. Kết quả điện di sản phẩm cắt của một số mẫu đại diện cho thấy ở giếng 4 và 11 có 1 băng DNA duy nhất có kích thước 224bp tương ứng với kiểu gen CC; các giếng 2, 3, 5, 7, 8, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 213, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 226, 227 có 1 băng DNA có kích thước 201bp tương ứng với kiểu gen TT và ở giếng 1, 6, 9, 10, 12, 16, 214, 215, 225, 228 có 2 băng DNA có kích thước lần 224bp và 201bp tương ứng với kiểu gen TC. Theo lý thuyết các mẫu có kiểu gen TT và TC sản phẩm cắt có thêm băng DNA kích thước 23bp tuy nhiên khi điện di không quan sát được băng này trên gel agarose 3% do kích thước quá nhỏ (Hình 3.6). Kết quả điện di xác định kiểu gen đa hình rs323346 gen *TEX15* được trình bày đầy đủ trong Phụ lục 6.



Hình 3.6. Điện di sản phẩm PCR sau khi được xử lý với enzyme *TasI*

M: Marker 100 bp; *UC*: Sản phẩm PCR không xử lý bằng enzyme *TasI*

1 - 22: Sản phẩm cắt bằng enzyme *TasI* mẫu vô sinh nam ký hiệu VSN001 - VSN022;

213 – 228: Sản phẩm cắt bằng enzyme *TasI* mẫu đối chứng ký hiệu VSC011 – VSC026

Kết quả xác định kiểu gen và tần số allele của đa hình *TEX15* rs323346 được thống kê và tóm tắt ở Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele của đa hình *TEX15* rs323346

	Kiểu gen			Tần số allele		HWE (Giá trị p)
	TT	TC	CC	T	C	
Nhóm bệnh (n=202)	156	42	4	0,876	0,124	0,556
Nhóm đối chứng (n=200)	156	43	1	0,888	0,112	0,278
Tổng (n=402)	312	85	5	0,882	0,118	

Kết quả phân tích thống kê cho thấy sự phân bố kiểu gen của đa hình này ở nhóm bệnh và nhóm đối chứng đều tuân theo định luật Hardy-Weinberg (HWE) ($p > 0,05$). Kiểu gen TT là kiểu gen phổ biến nhất trong quần thể với tỉ lệ xuất hiện ở nhóm bệnh là 0,77 và ở nhóm đối chứng là 0,78. Kiểu gen CC

là kiểu gen xuất hiện ít nhất trong quần thể với tỉ lệ xuất hiện ở nhóm bệnh là 0,02 và ở nhóm đối chứng là 0,005. Kiểu gen TT, TC và CC trong quần thể có tỉ lệ lần lượt là 0,78; 0,21 và 0,01 (Bảng 3.5). Tần số allele C trong nhóm bệnh, nhóm đối chứng và toàn bộ quần thể nghiên cứu tương ứng là 0,124; 0,112 và 0,118 (Bảng 3.5). Ngoài ra, kết quả phân tích cho thấy không có sự khác biệt giữa tần số allele của đa hình nghiên cứu giữa nhóm bệnh và nhóm đối chứng.

3.4.2. Phân tích sự liên quan giữa đa hình *TEX15* rs323346 với vô sinh nam

Để phân tích mối liên quan giữa đa hình rs323346 gen *TEX15* với vô sinh ở nam giới, kiểm định Chi-square đã được thực hiện trên cả ba mô hình trội, lặn và cộng gộp. Giá trị *p* quan sát được ở cả 3 mô hình được thể hiện Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Đánh giá liên quan giữa đa hình *TEX15* rs323346 và vô sinh nam

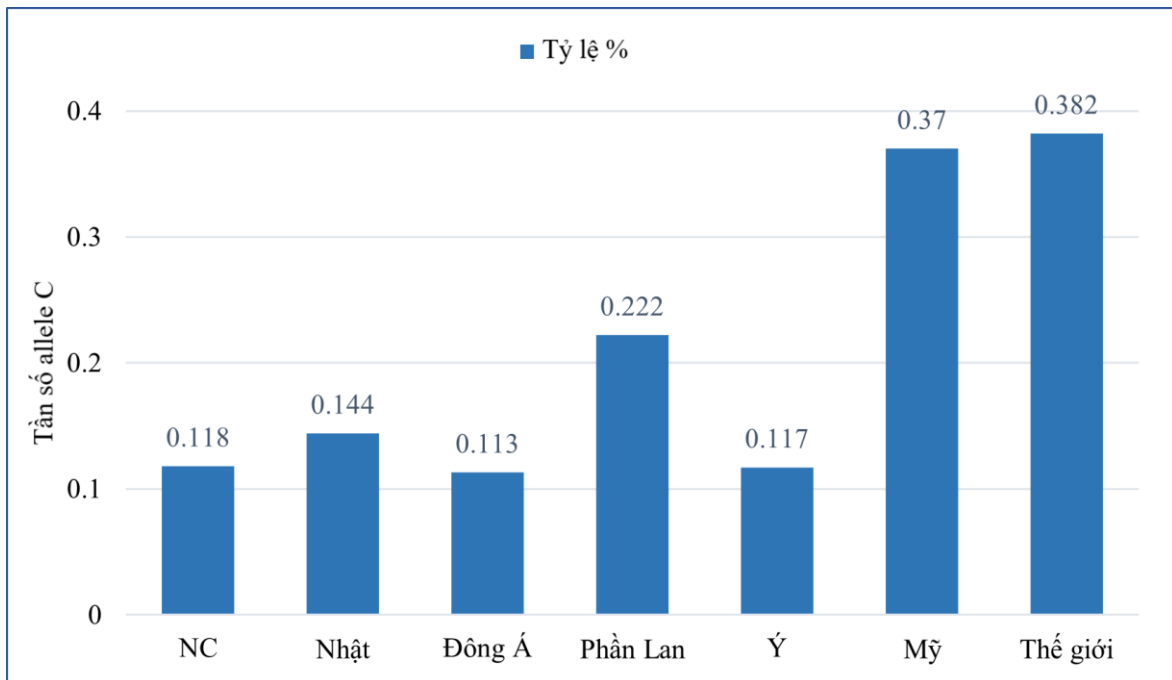
	Mô hình	Nhóm bệnh (n = 202)	Nhóm đối chứng (n=200)	OR	95% CI	Giá trị <i>p</i>
<i>TEX15</i> rs323346	Cộng gộp					0,406
	TT	77,23%	78%	1,000		
	TC	20,79%	21,5%	1,023	0,632 – 1,658	0,923
	CC	1,98%	0,5%	0,276	0,01 – 2,022	0,183
	Trội					
	TT	77,23%	78%	1,000		
	TC + CC	22,77%	22%	0,957	0,597 – 1,532	0,853
	Lặn					
	TT + TC	98,02%	99,5%	1,000		
	CC	1,98%	0,5%	0,275	0,01 – 2,006	0,181
	Alleles					
	T	87,6%	12,4%	1,000		
	C	12,4%	11,2%	0,897	0,582 – 1,38	0,621

Kết quả nghiên cứu cho thấy trong cả ba mô hình là mô hình cộng gộp,

mô hình trội, hay mô hình lặn có giá trị p ở ba mô hình này lần lượt là 0,406; 0,853; 0,181, đều lớn hơn 0,05, cho thấy không có bất cứ mối liên quan nào giữa kiểu gen của đa hình này với vô sinh nam trong 402 cá thể nghiên cứu. Do đó, trong phạm vi nghiên cứu này, đa hình này xuất hiện ngẫu nhiên trong cả quần thể vô sinh nam và quần thể người khỏe mạnh, sự xuất hiện của các SNP này không liên quan đến khả năng mắc bệnh hay có giảm nguy cơ mắc vô sinh nam ở các nhóm quần thể nghiên cứu. Tương tự, cũng không tìm thấy sự khác biệt về tần số allele T và C giữa 2 nhóm bệnh và chứng.

Đa hình rs323346 (chr8:30845915, T>C) dẫn đến sự biến đổi amino axit Isoleucine tại vị trí 1418 thành amino axit Valine. Giống với đa hình rs323345, đa hình này cũng được nghiên cứu ở các quần thể khác nhau trên thế giới và cho các kết quả không thống nhất. Năm 2012, trên quần thể người Trung Quốc, nghiên cứu về đa hình rs323346 được tiến hành trên 309 người bệnh (gồm 199 người mắc vô tinh không tắc nghẽn và 110 người bị thiếu tinh năng) và 377 nam giới khỏe mạnh cho thấy đa hình này có liên quan đến vô sinh ($p < 0,05$) và có thể làm tăng nguy cơ thiếu tinh năng ở nam giới người Hán ($p = 0,041$; OR = 1,635; 95% CI = 1,018 – 2,628) [47]. Tuy nhiên trái với nghiên cứu ở Trung Quốc, nghiên cứu về liên quan đa hình rs323346 với vô sinh nam ở quần thể người Châu Âu tiến hành trên 221 ca vô sinh và 158 nam giới khỏe mạnh đều không cho thấy mối liên hệ nào của đa hình này với vô sinh nam ($p > 0,05$) [64]. Trong một nghiên cứu khác của Zhang và các cộng sự tiến hành trên quần thể người Trung Quốc gồm 298 nam giới khỏe mạnh và 316 bệnh nhân vô sinh với 244 người bị vô tinh và 72 người bị thiếu tinh cũng cho thấy đa hình rs323346 không có sự liên quan đến vô sinh nam ở quần thể này [82]. Trong nghiên cứu này, cũng không tìm thấy mối liên hệ nào giữa đa hình rs323346 và nguy cơ mắc vô sinh nam ở người Việt Nam (ba mô hình cộng gộp, trội và lặn đều có $p > 0,05$). Ngoài ra, chúng tôi cũng so sánh tần số allele C rs32336 trong nghiên cứu này với 7 quần thể khác nhau (Hình 3.7). Có thể thấy, tần số của allele C trong quần thể nam giới Việt Nam được nghiên cứu gần với tần số này ở quần thể người Đông Á và người Ý, nhưng nhỏ hơn so với các nhóm dân tộc khác bao gồm người Nhật, người

Phân Lan và người Mỹ. Như vậy, tần số của allele C trong nghiên cứu này tương đồng với tần số của quần thể Đông Á, nơi có cùng khu vực địa lý với nước ta, tuy nhiên lại nhỏ hơn nhiều so với tần số trên thế giới.

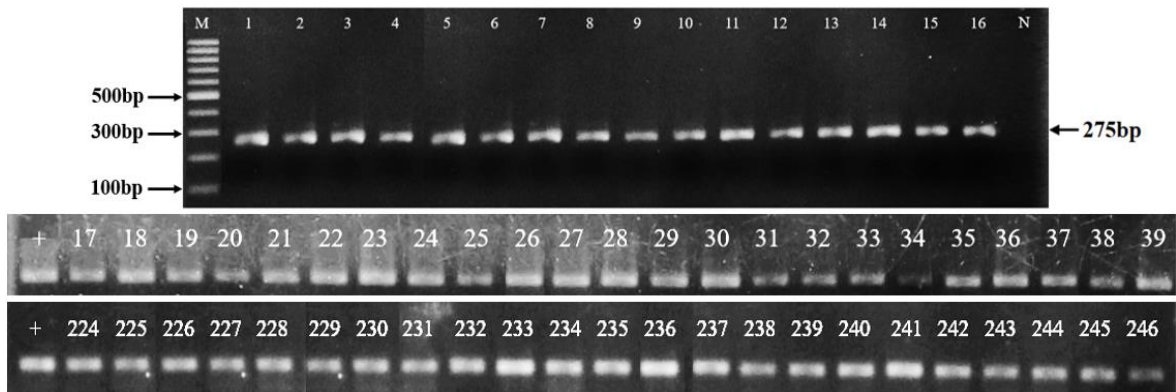


Hình 3.7. Tần số allele C rs323346 ở quần thể người Việt Nam trong nghiên cứu và các quần thể khác

3.5. ĐÁNH GIÁ LIÊN QUAN GIỮA *TEX15* rs323347 VÀ VÔ SINH NAM

3.5.1. Xác định thành phần kiểu gen đa hình *TEX15* rs323347

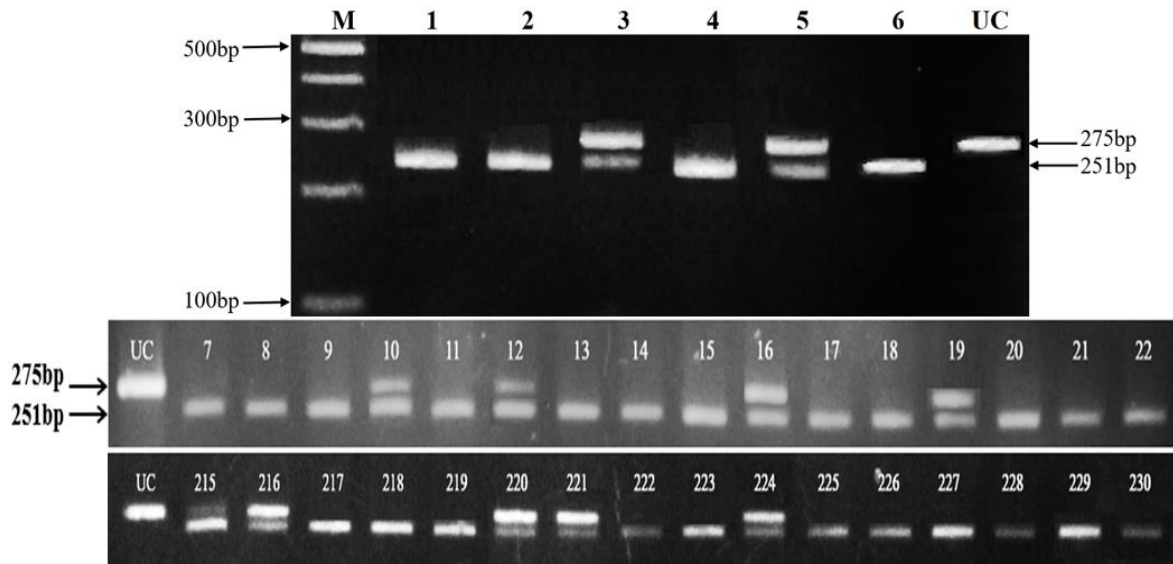
Vùng DNA chứa SNP rs323347 trên gen *TEX15* được khuếch đại thành công bằng phương pháp PCR. Sản phẩm này được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di cho thấy đã khuếch đại thành công trình tự đặc hiệu cho tất cả các mẫu có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết. Một phần kết quả được trình bày trong Hình 3.8, các kết quả còn lại sẽ được trình bày đầy đủ trong Phụ lục 7.



Hình 3.8. Sản phẩm PCR khuếch đại vùng DNA chứa *TEX15* rs323347

M: Marker 100 bp. 1 – 39: Sản phẩm PCR của mẫu vô sinh nam ký hiệu VSN001 – VSN039, 224 – 246: Sản phẩm PCR của mẫu đối chứng ký hiệu VSC022 – VSC044, *N*: Đối chứng âm, +: chứng dương

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen chứa *TEX15* rs323347 được xử lý với enzyme *MunI* ở nhiệt độ 37°C trong 5 giờ. Sau đó, sản phẩm này được điện di kiểm tra trên gel agarose 3%. Kết quả điện di sản phẩm cắt của một số mẫu đại diện cho thấy giếng 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 215, 217, 218, 219, 222, 223, 225, 226, 227, 228, 229, 230 có 1 băng DNA duy nhất có kích thước 251bp tương ứng với kiểu gen AA; giếng 3, 5, 10, 12, 16, 19, 216, 220, 221, 224 có 2 băng DNA có kích thước lần 251bp và 275bp tương ứng với kiểu gen AG. Theo lý thuyết các mẫu có kiểu gen AA và AG sản phẩm cắt có thêm băng DNA kích thước 24 bp tuy nhiên khi điện di không quan sát được băng này trên gel agarose 3% do kích thước quá nhỏ (Hình 3.9). Không tìm thấy mẫu có kiểu gen GG trong quần thể nghiên cứu. Kết quả điện di xác định kiểu đa hình rs323347 gen *TEX15* được trình bày đầy đủ trong Phụ lục 8.



Hình 3.9. Điện di sản phẩm PCR sau khi được xử lý với enzyme *MunI*
M: Marker 100 bp; *UC*: Sản phẩm PCR không xử lý bằng enzyme *MunI*
 1 - 22: Sản phẩm cắt bằng enzyme *MunI* mẫu vô sinh nam ký hiệu VSN001 – VSN022;
 215 – 230: Sản phẩm cắt bằng enzyme *MunI* mẫu đối chứng ký hiệu VSC013 – VSC028

Kết quả xác định kiểu gen và tần số allele của đa hình *TEX15* rs323347 được thống kê và tóm tắt ở Bảng 3.7.

Bảng 3.7. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele của đa hình *TEX15* rs323347

	Kiểu gen		Tần số allele		HWE (Giá trị p)
	AA	AG	A	G	
Nhóm bệnh (n=202)	162	40	0,899	0,101	0,118
Nhóm đối chứng (n=200)	158	42	0,895	0,105	0,09
Tổng số (n=402)	320	82	0,898	0,102	

Kết quả phân tích thống kê cho thấy sự phân bố kiểu gen của đa hình này ở nhóm bệnh và nhóm đối chứng đều tuân theo định luật Hardy-Weinberg (HWE) ($p > 0,05$). Trong quần thể nghiên cứu, không tìm thấy mẫu có kiểu

gen GG, kiểu gen AA là kiểu gen phổ biến nhất trong quần thể với tỉ lệ trong nhóm bệnh là 0,8 và trong nhóm đối chứng là 0,79. Kiểu gen AA và AG trong quần thể có tỉ lệ lần lượt là 0,8 và 0,2 (Bảng 3.7). Tần số allele G trong nhóm bệnh, nhóm đối chứng và toàn bộ quần thể nghiên cứu tương ứng là 0,101; 0,105 và 0,102 (Bảng 3.7). Ngoài ra, kết quả phân tích cho thấy không có sự khác biệt giữa tần số allele của đa hình nghiên cứu giữa nhóm bệnh và nhóm đối chứng.

3.5.2. Phân tích sự liên quan giữa đa hình *TEX15* rs323347 với vô sinh nam

Trong nghiên cứu này, vì kiểu gen GG không xuất hiện, do đó để phân tích mối liên quan giữa đa hình rs323347 gen *TEX15* với vô sinh ở nam giới, kiểm định Chi-square chỉ được thực hiện trên mô hình trội. Giá trị *p* quan sát được ở mô hình trội được thể hiện Bảng 3.8.

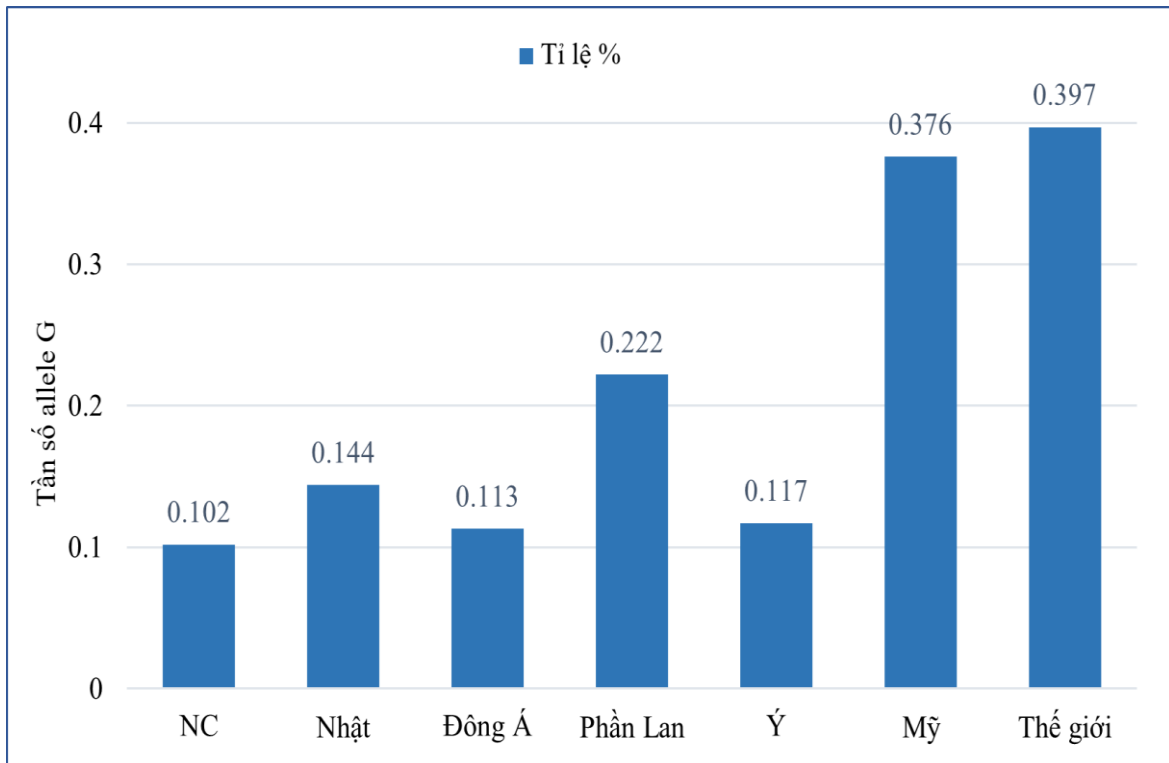
Bảng 3.8. Đánh giá liên quan giữa đa hình *TEX15* rs323347 và vô sinh nam

	Mô hình	Nhóm bệnh (n = 202)	Nhóm đối chứng (n=200)	OR	95% CI	Giá trị <i>p</i>
<i>TEX15</i> rs323347	Trội					
	AA	80,2%	79%	1,000		
	AG	19,8%	21%	0,929	0,570 - 1,513	0,766
	Alleles					
	A	90,1%	89,5%	1,000		
G	9,9%	10,5%	0,937	0,591 - 1,482	0,779	

Kết quả nghiên cứu cho mô hình trội có giá trị *p* là 0,766 cho thấy không có bất cứ mối liên quan nào giữa kiểu gen của đa hình này với vô sinh nam trong 402 cá thể nghiên cứu. Do đó, trong phạm vi nghiên cứu này, đa hình này xuất hiện ngẫu nhiên trong cả quần thể vô sinh nam và quần thể người khỏe mạnh, sự xuất hiện của các SNP này không liên quan đến khả năng mắc bệnh hay có giảm nguy cơ mắc vô sinh nam ở các nhóm quần thể nghiên cứu.

Tương tự, cũng không tìm thấy sự khác biệt về tần số allele A và G giữa 2 nhóm bệnh và chứng.

Đa hình đa hình rs323347 (chr8:30848708, A>G) dẫn đến sự biến đổi amino axit Cysteine tại vị trí 487 thành amino axit Arginine. Tương tự với đa hình rs323345 và rs323346, đa hình này cũng được nghiên cứu ở các quần thể khác nhau trên thế giới và cho các kết quả không thống nhất. Năm 2012, trên quần thể người Trung Quốc, nghiên cứu về đa hình rs323347 được tiến hành trên 309 người bệnh (gồm 199 người mắc vô tinh không tắc nghẽn và 110 người bị thiểu tinh nặng) và 377 nam giới khỏe mạnh cho thấy đa hình này có liên quan đến vô sinh ($p < 0,05$) và có thể làm tăng nguy cơ thiểu tinh nặng ở nam giới người Hán ($p = 0,046$, OR = 1,616, 95% CI = 1,006 - 2,597) [47]. Tuy nhiên trái với nghiên cứu ở Trung Quốc, nghiên cứu về liên quan đa hình rs323347 với vô sinh nam ở quần thể người Châu Âu tiến hành trên 221 ca vô sinh và 158 nam giới khỏe mạnh đều không cho thấy mối liên hệ nào của đa hình này với vô sinh nam ($p > 0,05$) [64]. Trong nghiên cứu này, cũng không tìm thấy mối liên hệ nào giữa đa hình rs323347 và nguy cơ mắc vô sinh nam ở người Việt Nam (ba mô hình cộng gộp, trội và lặn đều có $p > 0,05$). Ngoài ra, chúng tôi cũng so sánh tần số allele G rs323347 trong nghiên cứu này với 7 quần thể khác nhau (Hình 3.10). Có thể thấy, tần số của allele G trong quần thể nam giới Việt Nam được nghiên cứu gần với tần số này ở quần thể người Đông Á và người Ý, nhưng nhỏ hơn so với các nhóm dân tộc khác bao gồm người Nhật, người Phần Lan và người Mỹ. Như vậy, tần số của allele G trong nghiên cứu này tương đồng với tần số của quần thể Đông Á, nơi có cùng khu vực địa lý với nước ta, tuy nhiên lại nhỏ hơn nhiều so với tần số trên thế giới.



Hình 3.10. Tần số allele G rs323347 ở quần thể người Việt Nam trong nghiên cứu và các quần thể khác

Có thể thấy, cho đến nay các đa hình rs323345, rs32336, và rs323347 trên *TEX15* được nghiên cứu trên nhiều quần thể khác nhau trên thế giới và cho các kết quả không nhất quán. Trong nghiên cứu này, kết quả này tuy không tương đồng với một số kết quả ở nghiên cứu trên quần thể người Trung Quốc và người Châu Âu nhưng lại thống nhất với nghiên cứu trước đó trên quần thể người Macedonia và Albania. Sự không nhất quán ở các quần thể khác nhau này có thể do sự khác biệt của số lượng mẫu, sắc tộc của cá thể được nghiên cứu hoặc tương tác gen với các yếu tố khác (như chất dinh dưỡng, môi trường, chủng tộc, sắc tộc,...) có thể ảnh hưởng đến tác động của đa hình trên *TEX15*. Các nghiên cứu sâu hơn là cần thiết để xác định cơ chế, tác dụng của các đa hình này đối với vô sinh nam.

3.6. LIÊN QUAN CÁC HAPLOTYPE TRÊN GEN *TEX15* VÀ VÔ SINH NAM

Quá trình sinh tinh là một quá trình biệt hóa tế bào phức tạp, rất quan trọng đối với khả năng sinh sản của nam giới và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình này được quyết định bởi sự biểu hiện của rất nhiều gen [83]. Trong số các gen này, gen *TEX15* được coi là một trong những gen chính được xác

định có nguy cơ gây suy sinh tinh. Năm 2001, Wang và cộng sự đã xác định được gen *TEX15* biểu hiện ở ống sinh tinh của chuột và chỉ có ở tế bào mầm đực [36]. Nghiên cứu trên chuột đã cho thấy, mất chức năng *TEX15* ở chuột gây ra hiện tượng giảm khả năng sinh sản sớm ở con đực nhưng không xuất hiện ở con cái [42]. Ở các tế bào sinh tinh thiếu *TEX15*, quan sát thấy sự thất bại trong quá trình tiếp hợp nhiễm sắc thể, cho thấy rằng *TEX15* cần thiết cho sự tái tổ hợp, tiếp hợp nhiễm sắc thể và sửa chữa DSB DNA trong quá trình giảm phân khi sinh tinh ở nam giới [42]. Bên cạnh đó, đột biến trên gen *TEX15* được tìm thấy trên nhiều bệnh nhân vô sinh nam, và có thể là nguyên nhân gây vô tinh và thiếu tinh ở các ca bệnh này [44-46]. Với vai trò quan trọng của *TEX15* đối với quá trình sinh tinh và vô sinh ở nam giới, cho đến nay, đã có nhiều nghiên cứu về mối liên quan của các đa hình trên gen *TEX15* (như rs323342, rs323344, rs323345, rs323346, rs323347, rs12114073, rs61732458, v.v.) cũng như các nghiên cứu haplotype đa hình trên gen này với vô sinh nam ở nhiều quần thể trên thế giới [47, 48, 64, 81, 82].

Các đa hình rs323345, rs323346 và rs323347 được kiểm tra mối liên kết di truyền (linkage disequilibrium) trên cổng thông tin dữ liệu <https://asia.ensembl.org/> cho thấy sự liên kết di truyền cao giữa các đa hình trên quần thể người Kinh ở Việt Nam với giá trị $D' = 0,99$ và $D' = 1$. Từ đó, mối liên quan haplotype kiểu gen giữa các đa hình rs323345, rs323346 và rs323347 với vô sinh nam được phân tích bằng phần mềm SHEsis (Bảng 3.9). Đây là một phần mềm hiệu quả để tính tần số haplotype trong quần thể và sự khác biệt về tần số haplotype giữa hai nhóm bệnh và chứng đã được sử dụng để phân tích trong nhiều nghiên cứu bệnh chứng khác. Kết quả từ phần mềm này cho thấy, tần số haplotype CA của đa hình rs323346 và rs323347 cho thấy có sự khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm đối chứng với giá trị p nhỏ hơn mức ý nghĩa 0,05 ($p = 0,046$, OR = 2,547, 95% CI = 0,982 - 6,602). Kết quả này cho thấy, haplotype CA có thể làm tăng nguy cơ vô sinh nam ở quần thể nghiên cứu. Các haplotype của các đa hình còn lại đều cho thấy không có sự khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm đối chứng với $p > 0,05$.

Bảng 3.9. Đánh giá liên quan haplotype các đa hình trên gen *TEX15* và vô sinh nam

Haplotype	Tần số		Giá trị <i>p</i>	OR	95% CI
	Nhóm bệnh %	Nhóm đối chứng %			
Haplotype rs323345 và rs323346					
CC	5,3%	4,8%	0,776	1,097	0,578 - 2,082
CT	4,9%	3,9%	0,499	1,267	0,637 - 2,520
TC	6,7%	7%	0,863	0,952	0,546 - 1,660
TT	83,2%	84,3%	0,67	0,921	0,630 - 1,346
Haplotype rs323345 và rs323347					
CA	5,1%	3,9%	0,413	1,329	0,671 - 2,632
CG	5,1%	4,8%	0,885	1,049	0,550 - 1,999
TA	85,3%	85,1%	0,946	1,014	0,683 - 1,503
TG	4,6%	6,2%	0,319	0,728	0,389 - 1,363
Haplotype rs323346 và rs323347					
CA	3,8%	1,5%	0,046	2,547	0,982 - 6,602
CG	8,6%	9,8%	0,581	0,874	0,541 - 1,412
TA	86,3%	87,9%	0,619	0,897	0,584 - 1,378
TG	1,3%	0,8%	UA	UA	UA
Haplotype rs323345, rs323346 và rs323347					
CCG	4,5%	4,9%	0,847	0,937	0,482 - 1,819
CTA	4,4%	3,8%	0,636	1,186	0,548 - 2,408
TCA	2,8%	1,6%	UA	UA	UA

TCG	3,8%	5,3%	0,357	0,728	0,37 – 1,434
TTA	82,4%	83,6%	0,68	1,09	0,722 – 1,648
TTG	0,8%	0,8%	UA	UA	UA
CCA	0,8%	0%	UA	UA	UA
CTG	0,5%	0%	UA	UA	UA

(UA: unattainable, các cặp haplotype có tần số thấp hơn ngưỡng tần số là 3% sẽ không được phân tích)

Bên cạnh các đánh giá riêng về mối liên quan của các SNP với vô sinh nam, phân tích haplotype cũng là một công cụ có giá trị để phát hiện mối liên hệ có thể có giữa một gen với bệnh [47, 84, 85]. Trong cộng đồng người Hán ở Trung Quốc, hai haplotypes của hai đa hình rs323346 và rs323347 được cho thấy là có liên quan đến quá trình sinh tinh và vô sinh nam, trong đó haplotype AT làm giảm nguy cơ bị thiếu tinh trùng nặng ($p = 0,040$, OR = 0,616, 95% CI = 0,383 - 0,990) và haplotype GC làm tăng nguy cơ mắc bệnh này ở quần thể nghiên cứu ($p = 0,040$, OR = 1,624, 95% CI = 1,010 - 2,610) [47]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích haplotypes của các SNP rs323345, rs323346 và rs323347 trên gen *TEX15*, kết quả cho thấy haplotype CA của đa hình rs323346 và rs323347 có thể làm tăng nguy cơ vô sinh nam trong quần thể Việt Nam được nghiên cứu ($p = 0,046$, OR = 2,547, 95% CI = 0,982 - 6,602). Bên cạnh đó haplotypes của SNP rs323345 và *TEX15* rs142485241 trên quần thể người Việt Nam cũng đã được phân tích và cho thấy haplotype GT có thể làm tăng nguy cơ vô sinh nam ($p = 0,023$, OR = 1,937, 95% CI = 1,085-3,456) [86]. Cần tiến hành các nghiên cứu sâu hơn để làm rõ cơ chế tác động của các haplotype đa hình rs323345, rs323346 và rs323347 trên gen *TEX15* với vô sinh nam ở quần thể người Việt Nam.

Cho đến nay, các nghiên cứu về nguyên nhân di truyền vô sinh nam càng ngày càng đóng một vai trò quan trọng trong việc chẩn đoán lâm sàng và sàng lọc vô sinh ở nam giới [3]. Với những trường hợp bất thường về số lượng tinh trùng, vô tinh hoặc mật độ tinh trùng thấp, các xét nghiệm di truyền cần được tiến hành bao gồm xét nghiệm nhiễm sắc thể đồ (xét nghiệm Karyotype) để phát hiện bất thường nhiễm sắc thể, xét nghiệm sàng lọc mất đoạn ((theo hướng dẫn của Hội nam học Châu Âu (EAA) và Mạng lưới chất

lượng di truyền phân tử châu Âu (EMQN)) để phát hiện mất đoạn nhiễm sắc thể Y [87], xét nghiệm giải trình tự toàn bộ gen *TEX11* để phát hiện đột biến trên gen này, xét nghiệm mất đoạn gr/gr trên nhiễm sắc thể Y. Các xét nghiệm đột biến gen *CFTR* để phát hiện thiếu ống dẫn tinh 2 bên bẩm sinh, xét nghiệm sàng lọc các gen ứng viên như *FGFR1*, *ANOS1*, *TAC3*, *GNRH1*, *GNRHR* để phát hiện hội chứng Kallman và suy tuyến sinh dục. Đối với những trường hợp bất thường về hình thái tinh trùng, tiến hành các xét nghiệm sàng lọc và giải trình tự các gen tiềm năng như *DPY19L2*, *AURKC*, *DNAH1*, *DNAH11*, *DNAH5*... [88] để phát hiện đột biến gây bệnh. Có thể thấy, vô sinh nam là một hội chứng vô cùng phức tạp, bị tác động bởi nhiều yếu tố, mà trong đó vẫn còn nhiều trường hợp chưa phát hiện được nguyên nhân gây bệnh cần tiếp tục được nghiên cứu. Chính vì vậy, nghiên cứu này của chúng tôi về gen *TEX15* trên quần thể vô sinh nam người Việt Nam sẽ cung cấp thêm thông tin di truyền về tương tác giữa gen và bệnh ở nước ta, góp phần hỗ trợ quá trình chẩn đoán lâm sàng và tìm hiểu cơ chế gây bệnh trong tương lai.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu về mối liên quan giữa ba đa hình rs323345, rs323346 và rs323347 trên gen *TEX15* và vô sinh nam, đã thu được một số kết luận như sau:

1. Thu thập và đánh giá sự khác biệt thông tin lâm sàng của hai nhóm bệnh (202 bệnh nhân vô sinh nam) và chứng (200 nam giới khỏe mạnh có ít nhất 1 con).
2. Thu thập mẫu máu của 402 mẫu nghiên cứu và tách chiết được 402 DNA tổng số từ mẫu máu với nồng độ cao và mật độ quang OD đo ở tỷ lệ A260/A280 khoảng 1,7 - 1,9.
3. Phân bố kiểu gen/tần số allele của ba đa hình rs323345, rs323346 và rs323347 đều tuân theo định luật Hardy-Weinberg, với tần số allele là:
 - Đa hình rs323345 có tần số allele T và C trong quần thể lần lượt là 0,909 và 0,091.
 - Đa hình rs323346 có tần số allele T và C trong quần thể lần lượt là 0,882 và 0,118.
 - Đa hình rs323347 có tần số allele A và G trong quần thể lần lượt là 0,898 và 0,102.
4. Kết quả phân tích mối liên quan giữa 3 đa hình trên của gen *TEX15* và vô sinh nam trên 402 đối tượng cho thấy không có mối liên quan nào giữa các đa hình này với vô sinh nam. Tuy nhiên, haplotype CA của hai đa hình rs323346 và rs323347 có thể làm tăng nguy cơ vô sinh nam ở quần thể Việt Nam.

4.2. KIẾN NGHỊ

- Kết quả nghiên cứu luận văn này sẽ làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về mối liên quan giữa đa hình gen và vô sinh nam.
- Tiếp tục nghiên cứu các đa hình khác của các gen tiềm năng có liên quan đến bệnh vô sinh nam để có thêm tài liệu khoa học, cơ sở cho quá trình chẩn đoán sàng lọc vô sinh ở nam giới.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. Lã Đức Duy, **Nguyễn Phương Anh**, Nguyễn Thùy Dương, 2022, The association of *TEX15* haplotype with male infertility in Vietnamese individuals. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 20(2), tr. 219–224.

<https://doi.org/10.15625/1811-4989/17243>

2. **Nguyễn Phương Anh**, Lã Đức Duy, Bùi Minh Đức, Nguyễn Thùy Dương, 2022, Đánh giá mối liên quan của đa hình rs323346 gen *TEX15* với bệnh vô sinh nam ở 401 người Việt Nam, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Thái Nguyên*, 228(01), tr. 342-348.

<https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6668>

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. World Health Organization (WHO). International Classification of Diseases, 11th Revision (ICD-11) Geneva 2018.
2. Mascarenhas M.N., et al., 2012, National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med.* 9(12): pp. e1001356.
3. Krausz C. and A. Riera-Escamilla, 2018, Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology.* 15(6): pp. 369-384.
4. Sunder M. and S.W. Leslie, *Semen Analysis*, in *StatPearls*. 2023, StatPearls Publishing
5. Kumar N. and A.K. Singh, 2015, Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci.* 8(4): pp. 191-6.
6. Cooper T.G., et al., 2010, World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* 16(3): pp. 231-45.
7. Boitrelle F., et al., 2021, The Sixth Edition of the WHO Manual for Human Semen Analysis: A Critical Review and SWOT Analysis. *Life (Basel).* 11(12).
8. Wang C. and R.S. Swerdloff, 2014, Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertil Steril.* 102(6): pp. 1502-7.
9. Berookhim B.M. and P.N. Schlegel, 2014, Azoospermia due to spermatogenic failure. *Urol Clin North Am.* 41(1): pp. 97-113.
10. Tharakan T., et al., 2021, Non-obstructive azoospermia: current and future perspectives. *Fac Rev.* 10: pp. 7.
11. Choy J.T. and J.K. Amory, 2020, Nonsurgical Management of Oligozoospermia. *J Clin Endocrinol Metab.* 105(12): pp. e4194-207.
12. Tu C., et al., 2020, Genetic underpinnings of asthenozoospermia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 34(6): pp. 101472.
13. De Braekeleer M., et al., 2015, Genetic aspects of monomorphic teratozoospermia: a review. *J Assist Reprod Genet.* 32(4): pp. 615-23.

14. Magdi Y., et al., 2017, Effect of modifiable lifestyle factors and antioxidant treatment on semen parameters of men with severe oligoasthenoteratozoospermia. *Andrologia*. 49(7).
15. Boursier A., et al., 2022, Necrozoospermia: The tree that hides the forest. *Andrology*. 10(4): pp. 642-659.
16. Jung J.H., et al., 2016, Treatment of Leukocytospermia in Male Infertility: A Systematic Review. *World J Mens Health*. 34(3): pp. 165-172.
17. Esteves S.C., et al., 2018, Intracytoplasmic sperm injection for male infertility and consequences for offspring. *Nature Reviews Urology*. 15(9): pp. 535-562.
18. Sharma A., 2017, Male Infertility; Evidences, Risk Factors, Causes, Diagnosis and Management in Human. *Annals of Clinical and Laboratory Research*. 05.
19. Singh V. and R. Pakhiddey, 2015, Current Scenario on Genetic Basis of Infertility- A Review. *Acta Medica International*. 2: pp. 149-154.
20. Krzastek S.C., et al., 2020, Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential. *Transl Androl Urol*. 9(6): pp. 2797-2813.
21. Balawender K. and S. Orkisz, 2020, The impact of selected modifiable lifestyle factors on male fertility in the modern world. *Cent European J Urol*. 73(4): pp. 563-568.
22. Jensen C.F.S., et al., 2017, Varicocele and male infertility. *Nature Reviews Urology*. 14(9): pp. 523-533.
23. Goulart A.C.X., et al., 2020, HIV, HPV and Chlamydia trachomatis: impacts on male fertility. *JBRA Assist Reprod*. 24(4): pp. 492-497.
24. Dohle G.R., 2010, Male infertility in cancer patients: Review of the literature. *Int J Urol*. 17(4): pp. 327-31.
25. Krausz C., A.R. Escamilla, and C. Chianese, 2015, Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*. 150(5): pp. R159-74.
26. Tournaye H., C. Krausz, and R.D. Oates, 2017, Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 5(7): pp. 544-553.

27. Ramakrishnan V., S.G. Kumar, and R. Pandiyan, 2014, Klinefelter syndrome and its association with male infertility. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 3(1): pp. 77-79.
28. Hawksworth D.J., et al., 2018, Infertility in Patients With Klinefelter Syndrome: Optimal Timing for Sperm and Testicular Tissue Cryopreservation. *Rev Urol*. 20(2): pp. 56-62.
29. Hotaling J. and D.T. Carrell, 2014, Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology*. 2(3): pp. 339-50.
30. Koh E., et al., 2010, Azoospermia factor and male infertility. *Reprod Med Biol*. 9(3): pp. 129-137.
31. Nailwal M. and J.B. Chauhan, 2017, Azoospermia Factor a (AZFa) sub-region of human Y-chromosome: A review. *Meta Gene*. 13: pp. 124-128.
32. Colaco S. and D. Modi, 2018, Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 16(1): pp. 14.
33. Kido T. and Y.-F. Lau, 2015, Roles of the Y chromosome genes in human cancers. *Asian journal of andrology*. 17.
34. Boehm U., et al., 2015, Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism--pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 11(9): pp. 547-64.
35. Coutton C., et al., 2015, Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update*. 21(4): pp. 455-85.
36. Wang P.J., et al., 2001, An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nature Genetics*. 27(4): pp. 422-426.
37. Bellil H., et al., 2021, Human testis-expressed (TEX) genes: a review focused on spermatogenesis and male fertility. *Basic and Clinical Andrology*. 31(1): pp. 9.
38. Boroujeni P.B., et al., 2018, Expression analysis of genes encoding TEX11, TEX12, TEX14 and TEX15 in testis tissues of men with non-obstructive azoospermia. *JBRA Assist Reprod*. 22(3): pp. 185-192.

39. de Kretser D.M., et al., 1998, Spermatogenesis. *Human Reproduction*. 13(suppl_1): pp. 1-8.
40. Wang P.J., D.C. Page, and J.R. McCarrey, 2005, Differential expression of sex-linked and autosomal germ-cell-specific genes during spermatogenesis in the mouse. *Hum Mol Genet*. 14(19): pp. 2911-8.
41. Loriot A., T. Boon, and C. De Smet, 2003, Five new human cancer-germline genes identified among 12 genes expressed in spermatogonia. *Int J Cancer*. 105(3): pp. 371-6.
42. Yang F., et al., 2008, Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol*. 180(4): pp. 673-9.
43. Yang F., et al., 2020, TEX15 associates with MILI and silences transposable elements in male germ cells. *Genes Dev*. 34(11-12): pp. 745-750.
44. Okutman O., et al., 2015, Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. *Hum Mol Genet*. 24(19): pp. 5581-8.
45. Colombo R., A. Pontoglio, and M. Bini, 2017, Two Novel TEX15 Mutations in a Family with Nonobstructive Azoospermia. *Gynecol Obstet Invest*. 82(3): pp. 283-286.
46. Cannarella R., et al., 2021, Next-generation sequencing: toward an increase in the diagnostic yield in patients with apparently idiopathic spermatogenic failure. *Asian J Androl*. 23(1): pp. 24-29.
47. Ruan J., et al., 2012, Genetic variants in TEX15 gene conferred susceptibility to spermatogenic failure in the Chinese Han population. *Reprod Sci*. 19(11): pp. 1190-6.
48. Ghadirkhomi E., et al., 2022, Correlation of Novel Single Nucleotide Polymorphisms of USP26, TEX15, and TNP2 Genes with Male Infertility in North West of Iran. *Int J Fertil Steril*. 16(1): pp. 10-16.
49. Xavier M.J., et al., 2021, Disease gene discovery in male infertility: past, present and future. *Hum Genet*. 140(1): pp. 7-19.
50. Jacobs P.A., et al., 1975, The effect of structural aberrations of the chromosomes on reproductive fitness in man. II. Results. *Clin Genet*. 8(3): pp. 169-78.

51. Therkelsen A.J., 1964, STERILE MALE WITH THE CHROMOSOME CONSTITUTION 46 XX. *Cytogenetics*. 3: pp. 207-18.
52. Tiepolo L. and O. Zuffardi, 1976, Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet*. 34(2): pp. 119-24.
53. Brown T.R., et al., 1988, Deletion of the steroid-binding domain of the human androgen receptor gene in one family with complete androgen insensitivity syndrome: evidence for further genetic heterogeneity in this syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(21): pp. 8151-5.
54. Dumur V., et al., 1990, Abnormal distribution of CF delta F508 allele in azoospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens. *Lancet*. 336(8713): pp. 512.
55. Anguiano A., et al., 1992, Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *Jama*. 267(13): pp. 1794-7.
56. Reijo R., et al., 1996, Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet*. 347(9011): pp. 1290-3.
57. Vogt P.H., 1998, Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod*. 4(8): pp. 739-44.
58. Dieterich K., et al., 2007, Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet*. 39(5): pp. 661-5.
59. Dam A.H., et al., 2007, Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet*. 81(4): pp. 813-20.
60. Ben Khelifa M., et al., 2014, Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Am J Hum Genet*. 94(1): pp. 95-104.

61. Harbuz R., et al., 2011, A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet.* 88(3): pp. 351-61.
62. Yatsenko A.N., et al., 2015, X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *N Engl J Med.* 372(22): pp. 2097-107.
63. Lopes A.M., et al., 2013, Human spermatogenic failure purges deleterious mutation load from the autosomes and both sex chromosomes, including the gene DMRT1. *PLoS Genet.* 9(3): pp. e1003349.
64. Aston K.I., et al., 2010, Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent. *Hum Reprod.* 25(6): pp. 1383-97.
65. Bệnh viện Phụ sản Trung ương, 2009, Nghiên cứu thực trạng vô sinh ở Việt Nam theo các vùng sinh thái.
66. Huỳnh Thi Kim Phương, Huỳnh Kiều Thanh, Võ Trí Nam, Nguyễn Lê Tuấn Anh, Nguyễn Đức Hoàng, Phan Thị Phương Trang, Nguyễn Vạn Thông, Phạm Hà Giang, 2015, Xây dựng qui trình phát hiện đột biến vi mất đoạn nhiễm sắc thể giới tính Y trên bệnh nhân nam chẩn đoán mắc bệnh Azoospermia bằng kỹ thuật Multiplex – PCR. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ.* 18(5): pp. 5-15.
67. Nguyễn Bá Sơn, Nguyễn Xuân Tùng, Lương Thị Lan Anh, 2017, Phát hiện mất đoạn nhỏ trên nhiễm sắc thể Y ở nam giới mắc hội chứng OAT. *Tạp chí nghiên cứu Y học.* 18(3): pp. 23-29.
68. Dương Thị Hải Vân, Nguyễn Thị Trang, Lương Thị Lan Anh, 2017, Đặc điểm đa hình (TG)mTn của gen CFTR ở bệnh nhân bất sản ống dẫn tinh. *Tạp chí nghiên cứu Y học.* 18(3): pp. 30-35.
69. Trang N.T., et al., 2018, Association of N-acetyltransferase-2 and glutathione S-transferase polymorphisms with idiopathic male infertility in Vietnam male subjects. *Chem Biol Interact.* 286: pp. 11-16.
70. Huu Dinh T., et al., 2021, Association of FSIP2 rs4666689 and PON2 rs7493 with male infertility in Vietnamese population. *Academia Journal of Biology.* 43(3): pp. 77-85.

71. Minh Duc B., et al., 2021, Association study of NR5A1 rs1110061 with infertile male in 401 Vietnamese individuals. *Vietnam Journal of Biotechnology*. 19(4): pp. 625-631.
72. Thuy Duong N., L. Duc Duy, and D. Thu Ha, 2021, Study on the role of TDRD9 rs2273841 with male infertility of Vietnamese. *Vietnam Journal of Biotechnology*. 19(4): pp. 619-624.
73. Phuong Anh N., N. Van Hai, and N. Thuy Duong, 2022, Correlation between AK7 rs2275554 and male infertility in 421 Vietnamese individuals. *Academia Journal of Biology*. 44(1): pp. 107-114.
74. Thuy Duong N., L. Duc Duy, and N. Van Hai, 2022, Association of TEX15 rs142485241 with male infertility in 429 Vietnamese individuals. *Academia Journal of Biology*. 44(2): pp. 73-78.
75. Schlegel P.N., et al., 2021, Diagnosis and Treatment of Infertility in Men: AUA/ASRM Guideline Part I. *J Urol*. 205(1): pp. 36-43.
76. R Core Team, 2021, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. ; Available from: <https://www.R-project.org/>.
77. Graffelman J., 2015, Exploring Diallelic Genetic Markers: The HardyWeinberg Package. *Journal of Statistical Software*. 64: pp. 1-23.
78. Aragon T.J., 2020, epitools: Epidemiology Tools. R package version 0.5-101. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=epitools>
79. Clarke G.M., et al., 2011, Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc*. 6(2): pp. 121-33.
80. Shi Y.Y. and L. He, 2005, SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res*. 15(2): pp. 97-8.
81. Plaseski T., et al., 2012, Association study of single-nucleotide polymorphisms in FASLG, JMJDIA, LOC203413, TEX15, BRDT, OR2W3, INSR, and TAS2R38 genes with male infertility. *J Androl*. 33(4): pp. 675-83.
82. Zhang X., et al., 2015, Six polymorphisms in genes involved in DNA double-strand break repair and chromosome synapsis: association with male infertility. *Syst Biol Reprod Med*. 61(4): pp. 187-93.

83. Hermann B.P., et al., 2018, The Mammalian Spermatogenesis Single-Cell Transcriptome, from Spermatogonial Stem Cells to Spermatids. *Cell Rep.* 25(6): pp. 1650-1667.e8.
84. Jahantigh D., A. Hosseinzadeh Colagar, and S. Salimi, 2017, Genetic polymorphisms and haplotypes of the DJ-1 gene promoter associated with the susceptibility to male infertility. *J Assist Reprod Genet.* 34(12): pp. 1673-1682.
85. Piekarska K., et al., 2021, The Association of HLA-G Gene Polymorphism and Its Soluble Form With Male Infertility. *Front Immunol.* 12: pp. 791399.
86. Duc Duy L., N. Phuong Anh, and N. Thuy Duong, 2022, The association of TEX15 haplotype with male infertility in Vietnamese individuals. *Vietnam Journal of Biotechnology.* 20(2): pp. 219-224.
87. Krausz C., et al., 2014, EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology.* 2(1): pp. 5-19.
88. Chianese C., et al., 2015, Comprehensive investigation in patients affected by sperm macrocephaly and globozoospermia. *Andrology.* 3(2): pp. 203-12.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Danh sách thông tin các đối tượng tham gia nghiên cứu

STT	Mã mẫu nghiên cứu	Tên các đối tượng nghiên cứu	Tuổi	Giới tính	Vô sinh (Có/Không)	DNA	
						Nồng độ (ng/ μ L)	OD (A260/280)
1	VSN001	Đỗ Văn P.	1991	Nam	Có	21.10	1.83
2	VSN002	Hà Tuấn A.	1990	Nam	Có	31.78	1.81
3	VSN003	Phạm Thế V.	1985	Nam	Có	35.91	1.79
4	VSN004	Ngô Văn C.	1987	Nam	Có	20.35	1.81
5	VSN005	Nguyễn Văn Đ.	1990	Nam	Có	25.74	1.82
6	VSN006	Phạm Hải N.	1988	Nam	Có	27.33	1.83
7	VSN007	Đào Ngọc S.	1993	Nam	Có	28.34	1.80
8	VSN008	Nguyễn Công H.	1990	Nam	Có	20.85	1.78
9	VSN009	Đỗ Văn T.	1995	Nam	Có	21.10	1.83
10	VSN010	Lê Đình Q.	1988	Nam	Có	31.78	1.81
11	VSN011	Đoàn Xuân C.	1975	Nam	Có	32.03	1.78
12	VSN012	Trần Xuân N.	1995	Nam	Có	25.02	1.74
13	VSN013	Vũ Văn H.	1993	Nam	Có	40.66	1.75
14	VSN014	Vũ Đức K.	1991	Nam	Có	19.19	1.73
15	VSN015	Bùi Văn D.	1985	Nam	Có	31.83	1.80
16	VSN016	Trần Đình V.	1988	Nam	Có	32.03	1.78
17	VSN017	Phạm Ngọc T.	1989	Nam	Có	28.58	1.71
18	VSN018	Lương Văn T.	1991	Nam	Có	23.48	1.73
19	VSN019	Dương Hà N.	1986	Nam	Có	32.52	1.76
20	VSN020	Vũ Văn T.	1989	Nam	Có	26.83	1.76
21	VSN021	Nguyễn Hữu T.	1992	Nam	Có	25.77	1.80
22	VSN022	Vũ Hoàng T.	1983	Nam	Có	28.58	1.71
23	VSN023	Nguyễn Ngọc T.	1991	Nam	Có	23.48	1.73
24	VSN024	Ngọ Văn D.	1980	Nam	Có	32.52	1.76

25	VSN025	Đỗ Văn P.	1991	Nam	Có	28.58	1.71
26	VSN026	Đào Ngọc S.	1993	Nam	Có	23.48	1.73
27	VSN027	Nguyễn Doãn S.	1997	Nam	Có	32.52	1.76
28	VSN028	Nguyễn Văn Đ.	1990	Nam	Có	26.83	1.76
29	VSN029	Phạm Quốc D.	1993	Nam	Có	25.77	1.80
30	VSN030	Nguyễn Thái H.	1990	Nam	Có	28.58	1.71
31	VSN031	Tôn Đức L.	1997	Nam	Có	22.08	1.85
32	VSN032	Đông Văn C.	1994	Nam	Có	23.30	1.85
33	VSN033	Hà Văn Đ.	1987	Nam	Có	29.78	1.80
34	VSN034	Nguyễn Ngọc T.	1988	Nam	Có	32.48	1.81
35	VSN035	Lâm Đức M.	1992	Nam	Có	23.83	1.77
36	VSN036	Nguyễn Văn T.	1987	Nam	Có	25.31	1.76
37	VSN037	Tổng Văn P.	1986	Nam	Có	18.36	1.79
38	VSN038	Lê Hồng Q.	1991	Nam	Có	19.43	1.80
39	VSN039	Dương Văn L.	1990	Nam	Có	22.68	1.74
40	VSN040	Phạm Ngọc H.	1995	Nam	Có	26.37	1.75
41	VSN041	Dương Công P.	1986	Nam	Có	26.40	1.76
42	VSN042	Dương Văn T.	1992	Nam	Có	33.20	1.75
43	VSN043	Nguyễn Khắc H.	1994	Nam	Có	22.08	1.85
44	VSN044	Ngô Văn Q.	1993	Nam	Có	23.30	1.85
45	VSN045	Lê Ngọc A.	1989	Nam	Có	29.78	1.80
46	VSN046	Nguyễn Hữu Q.	2000	Nam	Có	32.48	1.81
47	VSN047	Đoàn Đại H.	1990	Nam	Có	23.83	1.77
48	VSN048	Từ Thái B.	1982	Nam	Có	25.31	1.76
49	VSN049	Nguyễn Đình S.	1980	Nam	Có	18.36	1.79
50	VSN050	Phạm Văn H.	1984	Nam	Có	19.43	1.80
51	VSN051	Lê Việt T.	1992	Nam	Có	22.68	1.74
52	VSN052	Nguyễn Chí T.	1992	Nam	Có	26.37	1.75

53	VSN053	Phạm Tiến L.	1997	Nam	Có	27.61	1.88
54	VSN054	Nguyễn Văn H.	1978	Nam	Có	50.46	1.84
55	VSN055	Phạm Hồng H.	1976	Nam	Có	30.93	1.83
56	VSN056	Nguyễn Xuân C.	1984	Nam	Có	22.85	1.78
57	VSN057	Nguyễn Văn V.	1991	Nam	Có	31.53	1.78
58	VSN058	Vũ Đức Q.	1987	Nam	Có	34.30	1.82
59	VSN059	Nguyễn Văn T.	1987	Nam	Có	48.10	1.82
60	VSN060	Lê Bá T.	1993	Nam	Có	39.58	1.79
61	VSN061	Nguyễn Văn L.	1987	Nam	Có	21.33	1.76
62	VSN062	Phạm Xuân V.	1989	Nam	Có	33.03	1.81
63	VSN063	Phạm Văn H.	1987	Nam	Có	22.53	1.78
64	VSN064	Nguyễn Văn C.	1986	Nam	Có	30.87	1.71
65	VSN065	Lê Văn T.	1995	Nam	Có	26.40	1.76
66	VSN066	Đặng Ngọc L.	1987	Nam	Có	33.20	1.75
67	VSN067	Nguyễn Văn Th.	1990	Nam	Có	19.58	1.78
68	VSN068	Hồ Sỹ K.	1991	Nam	Có	29.43	1.80
69	VSN069	Nguyễn Quốc Đ.	1990	Nam	Có	22.37	1.79
70	VSN070	Cao Văn T.	1989	Nam	Có	35.84	1.82
71	VSN071	Trần Văn H.	1994	Nam	Có	24.2	1.81
72	VSN072	Nguyễn Đức H.	1990	Nam	Có	27.61	1.88
73	VSN073	Nguyễn Văn V.	1974	Nam	Có	50.46	1.84
74	VSN074	Lê Minh Đ.	1988	Nam	Có	30.93	1.83
75	VSN075	Nguyễn Văn T.	1987	Nam	Có	22.85	1.78
76	VSN076	Lò Văn T.	1999	Nam	Có	31.53	1.78
77	VSN077	Nguyễn Tiến Đ.	1993	Nam	Có	34.30	1.82
78	VSN078	Đoàn Văn Q.	1991	Nam	Có	48.10	1.82
79	VSN079	Đinh Văn H.	1990	Nam	Có	36.54	1.79
80	VSN080	Nguyễn Văn T.	1994	Nam	Có	39.58	1.79

81	VSN081	Đào Văn T.	1973	Nam	Có	21.33	1.76
82	VSN082	Dương Văn H.	1975	Nam	Có	33.03	1.81
83	VSN083	Nguyễn Thị H.	1993	Nam	Có	22.53	1.78
84	VSN084	Nguyễn Hồng Q.	1989	Nam	Có	30.87	1.71
85	VSN085	Nguyễn Văn T.	1997	Nam	Có	26.83	1.76
86	VSN086	Nguyễn Minh H.	1989	Nam	Có	23.83	1.77
87	VSN087	Trần Quang A.	1992	Nam	Có	25.31	1.76
88	VSN088	Nguyễn Trọng N.	1990	Nam	Có	26.84	1.74
89	VSN089	Nguyễn Đình Q.	1991	Nam	Có	34.56	1.75
90	VSN090	Nguyễn Văn N.	1989	Nam	Có	22.68	1.74
91	VSN091	Nguyễn Xuân D.	1992	Nam	Có	26.37	1.75
92	VSN092	Nguyễn Tuấn A.	1980	Nam	Có	24.79	1.81
93	VSN093	Nguyễn Văn T.	1995	Nam	Có	26.40	1.76
94	VSN094	Vũ Văn V.	1992	Nam	Có	28.37	1.85
95	VSN095	Huỳnh Văn T.	1987	Nam	Có	30.46	1.85
96	VSN096	Vũ Trường S.	1985	Nam	Có	25.98	1.80
97	VSN097	Nguyễn Quốc H.	1988	Nam	Có	33.21	1.81
98	VSN098	Nguyễn Tự T.	1981	Nam	Có	28.45	1.77
99	VSN099	Ngô Văn L.	1992	Nam	Có	23.48	1.73
100	VSN100	Ngô Văn H.	1986	Nam	Có	32.52	1.76
101	VSN101	Bùi Xuân H.	1991	Nam	Có	26.83	1.76
102	VSN102	Đình Văn H.	1988	Nam	Có	25.77	1.80
103	VSN103	Đỗ Hồng V.	1995	Nam	Có	26.40	1.78
104	VSN104	Nguyễn Đình H.	1982	Nam	Có	33.20	1.78
105	VSN105	Dương Thế T.	1990	Nam	Có	31.99	1.82
106	VSN106	Nguyễn Văn S.	1987	Nam	Có	26.83	1.82
107	VSN107	Nguyễn Văn Q.	1991	Nam	Có	25.77	1.79
108	VSN108	Trịnh Trọng L.	1990	Nam	Có	28.58	1.76

109	VSN109	Nguyễn Văn V.	1987	Nam	Có	23.48	1.81
110	VSN110	Phạm Tuấn N.	1986	Nam	Có	32.52	1.78
111	VSN111	Trịnh Văn T.	1993	Nam	Có	25.41	1.88
112	VSN112	Trịnh Bá H.	1992	Nam	Có	32.23	1.81
113	VSN113	Nguyễn Trọng N.	1988	Nam	Có	29.51	1.72
114	VSN114	Bùi Đức V.	1996	Nam	Có	26.78	1.70
115	VSN115	Ngô Văn Q.	1990	Nam	Có	31.21	1.78
116	VSN116	Nguyễn Tuyên P.	1993	Nam	Có	35.93	1.84
117	VSN117	Hoàng Văn H.	1990	Nam	Có	24.49	1.79
118	VSN118	Đông Phúc C.	1987	Nam	Có	38.95	1.76
119	VSN119	Nguyễn Việt H.	1993	Nam	Có	42.36	1.75
120	VSN120	Chu Văn T.	1978	Nam	Có	39.86	1.71
121	VSN121	Nguyễn Văn Đ.	1990	Nam	Có	27.93	1.85
122	VSN122	Đỗ Văn T.	1982	Nam	Có	32.84	1.83
123	VSN123	Trần Văn H.	1994	Nam	Có	48.00	1.71
124	VSN124	Trần Văn Q.	1990	Nam	Có	46.29	1.70
125	VSN125	Nguyễn Văn V.	1986	Nam	Có	23.46	1.85
126	VSN126	Bùi Văn G.	1988	Nam	Có	42.01	1.72
127	VSN127	Đỗ Tuấn D.	1991	Nam	Có	57.91	1.73
128	VSN128	Đinh Đăng Đ.	1985	Nam	Có	60.63	1.73
129	VSN129	Nguyễn Hữu T.	1994	Nam	Có	64.41	1.80
130	VSN130	Phạm Quang T.	1986	Nam	Có	34.24	1.78
131	VSN131	Lưu Văn N.	1980	Nam	Có	32.81	1.77
132	VSN132	Nguyễn Phương N.	1995	Nam	Có	22.47	1.80
133	VSN133	Nguyễn Như T.	1990	Nam	Có	44.70	1.73
134	VSN134	Nguyễn Văn Q.	1993	Nam	Có	32.53	1.68
135	VSN135	Cao Xuân Q.	1995	Nam	Có	40.27	1.66
136	VSN136	Đoàn Văn T.	1989	Nam	Có	37.07	1.77

137	VSN137	Đinh Văn H.	1979	Nam	Có	35.83	1.81
138	VSN138	Vũ Khắc T.	1989	Nam	Có	48.51	1.75
139	VSN139	Nguyễn Văn D.	1985	Nam	Có	30.15	1.77
140	VSN140	Nguyễn Trung C.	1985	Nam	Có	32.94	1.78
141	VSN141	Trần Văn T.	1990	Nam	Có	33.75	1.71
142	VSN142	Nguyễn Ngọc D.	1987	Nam	Có	35.83	1.81
143	VSN143	Vũ Anh T.	1995	Nam	Có	48.51	1.75
144	VSN144	Nguyễn Thành G.	1992	Nam	Có	30.15	1.77
145	VSN145	Dương Văn H.	1992	Nam	Có	32.94	1.78
146	VSN146	Vũ Thanh T.	1989	Nam	Có	33.75	1.71
147	VSN147	Vũ Đình L.	1983	Nam	Có	21.38	1.80
148	VSN148	Trần Quang A.	1991	Nam	Có	32.75	1.74
149	VSN149	Phạm Trọng T.	1991	Nam	Có	32.65	1.75
150	VSN150	Phạm Trung Đ.	1988	Nam	Có	26.40	1.88
151	VSN151	Vũ Quốc H.	1990	Nam	Có	33.20	1.82
152	VSN152	Phạm Đình T.	1990	Nam	Có	24.18	1.85
153	VSN153	Bùi Đức T.	1984	Nam	Có	21.28	1.85
154	VSN154	Chu Minh D.	1982	Nam	Có	28.75	1.80
155	VSN155	Nguyễn Phú T.	1991	Nam	Có	30.21	1.81
156	VSN156	Đào Văn P.	1991	Nam	Có	44.95	1.77
157	VSN157	Tổng Văn D.	1982	Nam	Có	23.10	1.76
158	VSN158	Nguyễn Văn N.	1990	Nam	Có	36.70	1.79
159	VSN159	Trần Văn H.	1993	Nam	Có	21.38	1.80
160	VSN160	Nguyễn Văn N.	1988	Nam	Có	32.75	1.74
161	VSN161	Hồ Hữu G.	1978	Nam	Có	32.65	1.75
162	VSN162	Vũ Đăng H.	1975	Nam	Có	29.95	1.76
163	VSN163	Lê Đình T.	1984	Nam	Có	25.18	1.75
164	VSN164	Nguyễn Đình D.	1989	Nam	Có	24.18	1.85

165	VSN165	Võ Văn T.	1980	Nam	Có	23.30	1.85
166	VSN166	Cao Văn T.	1988	Nam	Có	29.78	1.80
167	VSN167	Nguyễn Văn C.	1987	Nam	Có	32.48	1.81
168	VSN168	Lê Huy Q.	1991	Nam	Có	23.83	1.77
169	VSN169	Lê Văn H.	1984	Nam	Có	25.31	1.76
170	VSN170	Hoàng Văn N.	1985	Nam	Có	18.36	1.79
171	VSN171	Trần Xuân D.	1981	Nam	Có	19.43	1.80
172	VSN172	Bùi Duy T.	1994	Nam	Có	22.68	1.74
173	VSN173	Đào Văn M.	1993	Nam	Có	26.37	1.75
174	VSN174	Đào Đình P.	1990	Nam	Có	27.61	1.88
175	VSN175	Dương Xuân N.	1983	Nam	Có	50.46	1.84
176	VSN176	Lê Văn L.	1989	Nam	Có	30.93	1.83
177	VSN177	Đoàn Văn T.	1977	Nam	Có	22.85	1.78
178	VSN178	Nguyễn Văn Đ.	1992	Nam	Có	31.53	1.78
179	VSN179	Lê Anh T.	1974	Nam	Có	34.30	1.82
180	VSN180	Bùi Văn L.	1992	Nam	Có	26.40	1.88
181	VSN181	Bùi Ngọc T.	1990	Nam	Có	33.20	1.82
182	VSN182	Vũ Thành L.	1988	Nam	Có	19.58	1.81
183	VSN183	Hà Văn T.	1990	Nam	Có	29.43	1.85
184	VSN184	Lê Anh V.	1987	Nam	Có	22.37	1.85
185	VSN185	Nông Trường T.	1993	Nam	Có	35.84	1.87
186	VSN186	Nguyễn Sỹ H.	1996	Nam	Có	30.64	1.83
187	VSN187	Vũ Văn S.	1982	Nam	Có	24.97	1.78
188	VSN188	Nguyễn Minh T.	1992	Nam	Có	28.45	1.78
189	VSN189	Nguyễn Quang T.	1999	Nam	Có	29.50	1.82
190	VSN190	Hoàng Bá S.	1987	Nam	Có	31.09	1.82
191	VSN191	Nguyễn Trọng D.	1987	Nam	Có	25.40	1.79
192	VSN192	Đình Trung D.	1992	Nam	Có	28.81	1.88

193	VSN193	Nguyễn Văn T.	1984	Nam	Có	32.07	1.84
194	VSN194	Nguyễn Đình T.	1990	Nam	Có	23.88	1.83
195	VSN195	Nguyễn Văn K.	1991	Nam	Có	34.89	1.78
196	VSN196	Trần Văn Đ.	1981	Nam	Có	38.22	1.78
197	VSN197	Nguyễn Anh A.	1989	Nam	Có	28.94	1.82
198	VSN198	Vũ Tuấn A.	1989	Nam	Có	36.01	1.82
199	VSN199	Đỗ Quang Đ.	1984	Nam	Có	29.68	1.79
200	VSN200	Bùi Thế H.	1993	Nam	Có	38.69	1.79
201	VSN201	Nguyễn Văn H.	1991	Nam	Có	30.73	1.76
202	VSN202	Nguyễn Đức A.	1990	Nam	Có	25.40	1.81
203	VSC001	Lê Thành L.	1987	Nam	Không	35.91	1.79
204	VSC002	Ngô Sỹ G.	1986	Nam	Không	20.35	1.81
205	VSC003	Bùi Mạnh H.	1994	Nam	Không	25.74	1.82
206	VSC004	Dương Văn C.	1989	Nam	Không	39.08	1.79
207	VSC005	Nguyễn Đức T.	1995	Nam	Không	23.17	1.72
208	VSC006	Nguyễn Minh T.	1981	Nam	Không	30.60	1.82
209	VSC007	Phạm Thế L.	1987	Nam	Không	31.16	1.80
210	VSC008	Đào Mạnh Đ.	1994	Nam	Không	34.62	1.75
211	VSC009	Phạm Văn T.	1989	Nam	Không	45.42	1.81
212	VSC010	Nguyễn Mười X.A.	1993	Nam	Không	33.44	1.74
213	VSC011	Nguyễn Thế T.	1985	Nam	Không	22.07	1.71
214	VSC012	Ngô Văn L.	1972	Nam	Không	28.16	1.83
215	VSC013	Nguyễn Thanh T.	1981	Nam	Không	21.74	1.73
216	VSC014	Nguyễn Hữu V.	1989	Nam	Không	36.15	1.73
217	VSC015	Diêm Công T.	1985	Nam	Không	28.81	1.74
218	VSC016	Nguyễn Thành T.	1981	Nam	Không	32.07	1.74
219	VSC017	Nguyễn Bá N.	1988	Nam	Không	23.83	1.77
220	VSC018	Dương Hữu H.	1964	Nam	Không	25.31	1.76

221	VSC019	Phạm Văn T.	1985	Nam	Không	26.84	1.74
222	VSC020	Nguyễn Văn C.	1970	Nam	Không	34.56	1.75
223	VSC021	Đỗ Duy T.	1982	Nam	Không	22.68	1.74
224	VSC022	Nguyễn Trung K.	1990	Nam	Không	26.37	1.75
225	VSC023	Trần Văn H.	1986	Nam	Không	24.79	1.81
226	VSC024	Nguyễn Văn P.	1992	Nam	Không	26.40	1.76
227	VSC025	Tạ Văn T.	1982	Nam	Không	28.37	1.85
228	VSC026	Trần Thanh T.	1991	Nam	Không	30.46	1.85
229	VSC027	Trần Ngọc A.	1988	Nam	Không	25.98	1.80
230	VSC028	Nguyễn Xuân T.	1973	Nam	Không	33.21	1.81
231	VSC029	Phạm Văn Đ.	1986	Nam	Không	28.45	1.77
232	VSC030	Khuất Tất C.	1989	Nam	Không	22.43	1.71
233	VSC031	Phạm Văn N.	1988	Nam	Không	21.96	1.80
234	VSC032	Đặng Văn P.	1989	Nam	Không	21.49	1.76
235	VSC033	Nguyễn Văn C.	1993	Nam	Không	24.26	1.79
236	VSC034	Nguyễn Văn C.	1993	Nam	Không	23.50	1.87
237	VSC035	Nguyễn Văn L.	1987	Nam	Không	35.24	1.83
238	VSC036	Lê Văn M.	1991	Nam	Không	28.73	1.76
239	VSC037	Phạm Văn T.	1986	Nam	Không	29.04	1.76
240	VSC038	Vũ Trọng C.	1986	Nam	Không	37.53	1.72
241	VSC039	Phùng Thế C.	1979	Nam	Không	26.54	1.72
242	VSC040	Hoàng Hữu H.	1988	Nam	Không	35.71	1.84
243	VSC041	Hoàng Ngọc T.	1994	Nam	Không	22.11	1.70
244	VSC042	Kim Đức T.	1988	Nam	Không	29.96	1.84
245	VSC043	Cán Tiến T.	1992	Nam	Không	36.85	1.72
246	VSC044	Thiều Lê Q.	1986	Nam	Không	32.34	1.81
247	VSC045	Trần Văn T.	1990	Nam	Không	34.33	1.76
248	VSC046	Hoàng Mạnh L.	1991	Nam	Không	32.28	1.80

249	VSC047	Lò Văn H.	1991	Nam	Không	29.56	1.72
250	VSC048	Hồ Xuân H.	1995	Nam	Không	36.14	1.75
251	VSC049	Nguyễn Đức T.	1988	Nam	Không	29.12	1.76
252	VSC050	Trần Tuấn A.	1995	Nam	Không	38.60	1.81
253	VSC051	Hà Văn C.	1983	Nam	Không	44.24	1.81
254	VSC052	Đặng Đình K.	1987	Nam	Không	26.82	1.77
255	VSC053	Bê Tuấn H.	1994	Nam	Không	30.67	1.79
256	VSC054	Lê Xuân Đ.	1992	Nam	Không	43.78	1.79
257	VSC055	Nguyễn Mạnh T.	1992	Nam	Không	25.28	1.77
258	VSC056	Trần Văn L.	1983	Nam	Không	38.94	1.77
259	VSC057	Lê Xuân T.	1977	Nam	Không	50.25	1.77
260	VSC058	Trần Việt A.	1985	Nam	Không	45.19	1.78
261	VSC059	Vũ Xuân D.	1990	Nam	Không	22.87	1.70
262	VSC060	Đình Văn C.	1991	Nam	Không	32.88	1.73
263	VSC061	Hoàng Văn N.	1988	Nam	Không	36.38	1.88
264	VSC062	Phạm Công H.	1984	Nam	Không	30.92	1.75
265	VSC063	Nguyễn Trung H.	1990	Nam	Không	32.56	1.80
266	VSC064	Bùi Anh D.	1992	Nam	Không	25.29	1.76
267	VSC065	Trần Quốc T.	1989	Nam	Không	47.26	1.78
268	VSC066	Nguyễn Văn N.	1988	Nam	Không	30.10	1.70
269	VSC067	Đỗ Việt T.	1987	Nam	Không	35.89	1.77
270	VSC068	Phạm Văn H.	1995	Nam	Không	22.94	1.70
271	VSC069	Nguyễn Anh D.	1990	Nam	Không	25.67	1.79
272	VSC070	Trần Tiến T.	1996	Nam	Không	30.41	1.90
273	VSC071	Đình Xuân T.	1993	Nam	Không	32.90	1.74
274	VSC072	Đặng Thanh T.	1981	Nam	Không	29.82	1.75
275	VSC073	Trần Đức L.	1995	Nam	Không	37.11	1.81
276	VSC074	Lê Việt C.	1991	Nam	Không	26.13	1.83

277	VSC075	Tạ Nam S.	1992	Nam	Không	35.21	1.77
278	VSC076	Trần Minh H.	1986	Nam	Không	30.92	1.73
279	VSC077	Lê Việt H.	1986	Nam	Không	34.66	1.73
280	VSC078	Nguyễn Quang T.	1989	Nam	Không	30.91	1.74
281	VSC079	Nguyễn Hữu T.	1985	Nam	Không	25.78	1.74
282	VSC080	Hoàng Văn T.	1980	Nam	Không	25.89	1.76
283	VSC081	Lê Quang V.	1990	Nam	Không	29.95	1.76
284	VSC082	Nguyễn Minh L.	1994	Nam	Không	27.40	1.75
285	VSC083	Nguyễn Đình N.	1992	Nam	Không	25.42	1.77
286	VSC084	Vũ Văn T.	1994	Nam	Không	32.42	1.84
287	VSC085	Nguyễn Chí C.	1984	Nam	Không	25.07	1.79
288	VSC086	Bùi Quang T.	1972	Nam	Không	20.75	1.88
289	VSC087	Phùng Thế C.	1985	Nam	Không	29.22	1.73
290	VSC088	Nguyễn Xuân T.	1995	Nam	Không	32.18	1.78
291	VSC089	Hồ Việt B.	1991	Nam	Không	45.65	1.80
292	VSC090	Nguyễn Đình Q.	1983	Nam	Không	35.63	1.72
293	VSC091	Hoàng Văn T.	1983	Nam	Không	32.89	1.81
294	VSC092	Nguyễn Thành C.	1983	Nam	Không	24.33	1.81
295	VSC093	Phạm Văn P.	1993	Nam	Không	35.55	1.79
296	VSC094	Nguyễn Văn H.	1995	Nam	Không	32.18	1.74
297	VSC095	Lưu Văn D.	1992	Nam	Không	34.69	1.76
298	VSC096	Phạm Lê L.	1994	Nam	Không	24.53	1.86
299	VSC097	Vũ Công N.	1984	Nam	Không	21.75	1.86
300	VSC098	Lê Văn T.	1990	Nam	Không	30.72	1.78
301	VSC099	Vũ Hồng C.	1991	Nam	Không	45.65	1.77
302	VSC100	Nguyễn Đức V.	1980	Nam	Không	36.28	1.81
303	VSC101	Lê Tuấn V.	1987	Nam	Không	22.78	1.73
304	VSC102	Nguyễn Hải D.	1995	Nam	Không	22.87	1.76

305	VSC103	Vũ Văn T.	1981	Nam	Không	35.11	1.44
306	VSC104	Nguyễn Tuấn A.	1979	Nam	Không	36.13	1.83
307	VSC105	Hà Văn T.	1977	Nam	Không	25.21	1.77
308	VSC106	Vũ Văn H.	1984	Nam	Không	30.92	1.73
309	VSC107	Trần Văn T.	1989	Nam	Không	37.81	1.74
310	VSC108	Ngô Văn G.	1994	Nam	Không	31.87	1.75
311	VSC109	Nguyễn Văn C.	1993	Nam	Không	27.04	1.78
312	VSC110	Đào Văn H.	1987	Nam	Không	29.18	1.71
313	VSC111	Vũ Văn Q.	1992	Nam	Không	27.90	1.79
314	VSC112	Lăng Quang T.	1981	Nam	Không	24.00	1.76
315	VSC113	Trần Đức H.	1993	Nam	Không	33.10	1.80
316	VSC114	Nguyễn Văn T.	1995	Nam	Không	31.53	1.78
317	VSC115	Phạm Tuấn K.	1998	Nam	Không	34.30	1.82
318	VSC116	Bùi Quang H.	1989	Nam	Không	28.87	1.77
319	VSC117	Vũ Văn H.	1985	Nam	Không	31.09	1.74
320	VSC118	Trần Văn T.	1991	Nam	Không	25.40	1.75
321	VSC119	Vũ Văn T.	1995	Nam	Không	26.84	1.74
322	VSC120	Lâm Văn H.	1989	Nam	Không	34.56	1.75
323	VSC121	Hoàng Thành V.	1991	Nam	Không	28.60	1.80
324	VSC122	vũ Việt C.	1994	Nam	Không	24.92	1.86
325	VSC123	Trần Hồng Q.	1978	Nam	Không	28.16	1.79
326	VSC124	Phạm Văn H.	1993	Nam	Không	28.89	1.81
327	VSC125	Vũ Văn T.	1987	Nam	Không	27.44	1.77
328	VSC126	Đặng Ngọc T.	1981	Nam	Không	24.79	1.81
329	VSC127	Hoàng Xuân Q.	1993	Nam	Không	26.40	1.76
330	VSC128	Phạm Xuân Q.	1989	Nam	Không	26.40	1.76
331	VSC129	Phạm Văn P.	1993	Nam	Không	33.20	1.75
332	VSC130	Nguyễn Tuấn M.	1990	Nam	Không	19.58	1.78

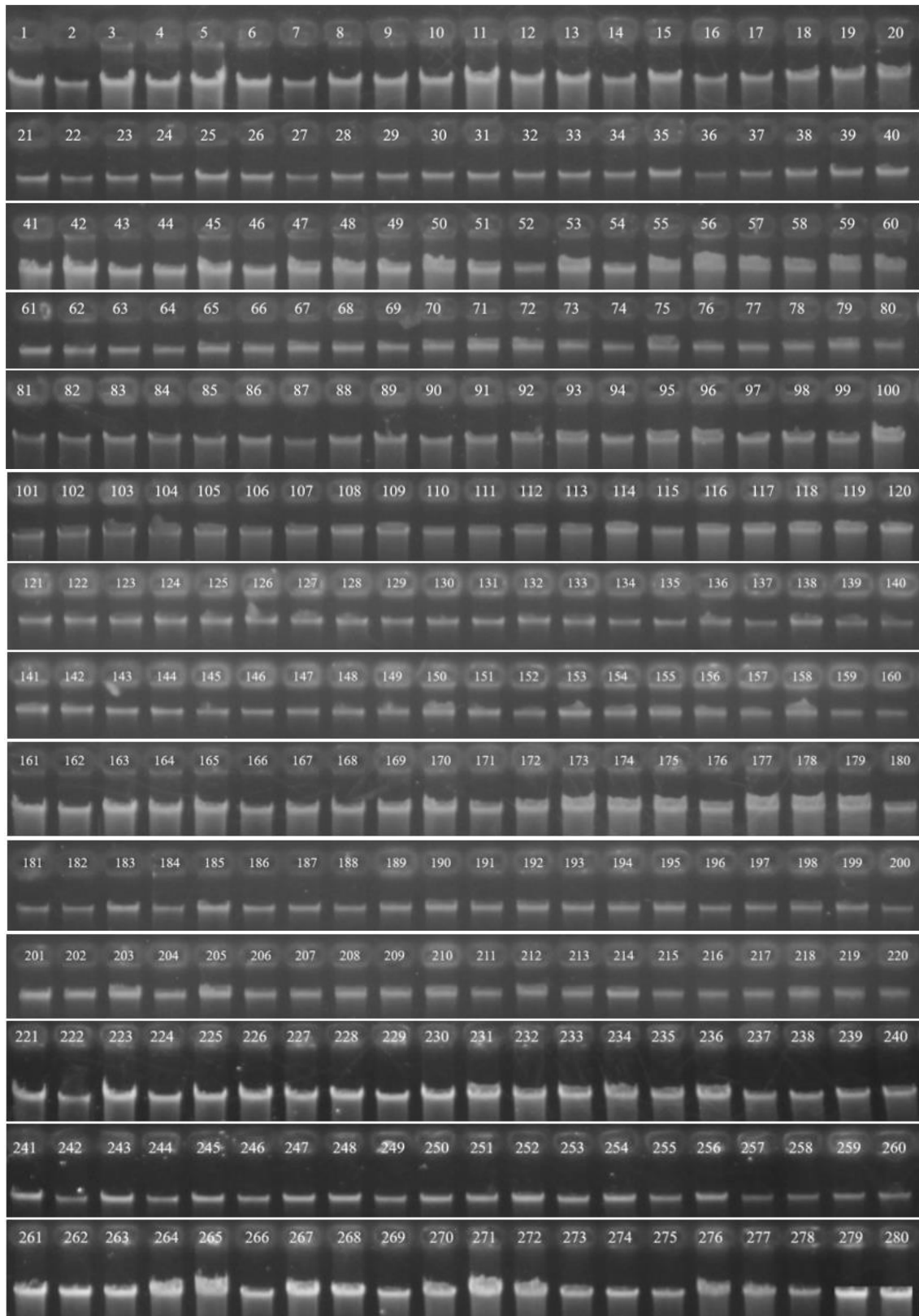
333	VSC131	Nguyễn Văn K.	1981	Nam	Không	29.43	1.80
334	VSC132	Nguyễn Như T.	1974	Nam	Không	22.37	1.79
335	VSC133	Lưu Ngọc K.	1992	Nam	Không	35.84	1.82
336	VSC134	Vũ Văn D.	1986	Nam	Không	30.64	1.79
337	VSC135	Phạm Văn S.	1981	Nam	Không	24.97	1.89
338	VSC136	Nguyễn Ngọc S.	1983	Nam	Không	28.45	1.79
339	VSC137	Nguyễn Công Đ.	1993	Nam	Không	29.50	1.82
340	VSC138	Lê Quang H.	1976	Nam	Không	26.40	1.76
341	VSC139	Nguyễn Hồng T.	1983	Nam	Không	33.20	1.75
342	VSC140	Đào Văn H.	1994	Nam	Không	22.08	1.85
343	VSC141	Trần Văn H.	1987	Nam	Không	23.30	1.85
344	VSC142	Đặng Đình Đ.	1997	Nam	Không	29.78	1.80
345	VSC143	Nguyễn Tiến Đ.	1993	Nam	Không	32.48	1.81
346	VSC144	Lương Thế H.	1995	Nam	Không	23.83	1.77
347	VSC145	Triệu Cao Q.	1988	Nam	Không	25.31	1.76
348	VSC146	Vy Văn H.	1992	Nam	Không	18.36	1.79
349	VSC147	Phạm Văn P.	1992	Nam	Không	19.43	1.80
350	VSC148	Trần Quốc H.	1980	Nam	Không	22.68	1.74
351	VSC149	Nguyễn Công T.A.	1975	Nam	Không	26.37	1.75
352	VSC150	Phạm Xuân C.	1985	Nam	Không	22.08	1.85
353	VSC151	Trịnh Tuấn A.	1968	Nam	Không	23.30	1.85
354	VSC152	Lò Thế H.	1980	Nam	Không	29.78	1.80
355	VSC153	Lưu Quang B.	1986	Nam	Không	32.48	1.81
356	VSC154	Lê Văn L.	1991	Nam	Không	23.83	1.77
357	VSC155	Trần Thái K.	1978	Nam	Không	25.31	1.76
358	VSC156	Đặng Việt S.	1986	Nam	Không	18.36	1.79
359	VSC157	Đỗ Ngọc M.	1993	Nam	Không	28.60	1.80
360	VSC158	Đỗ Xuân H.	1974	Nam	Không	24.92	1.86

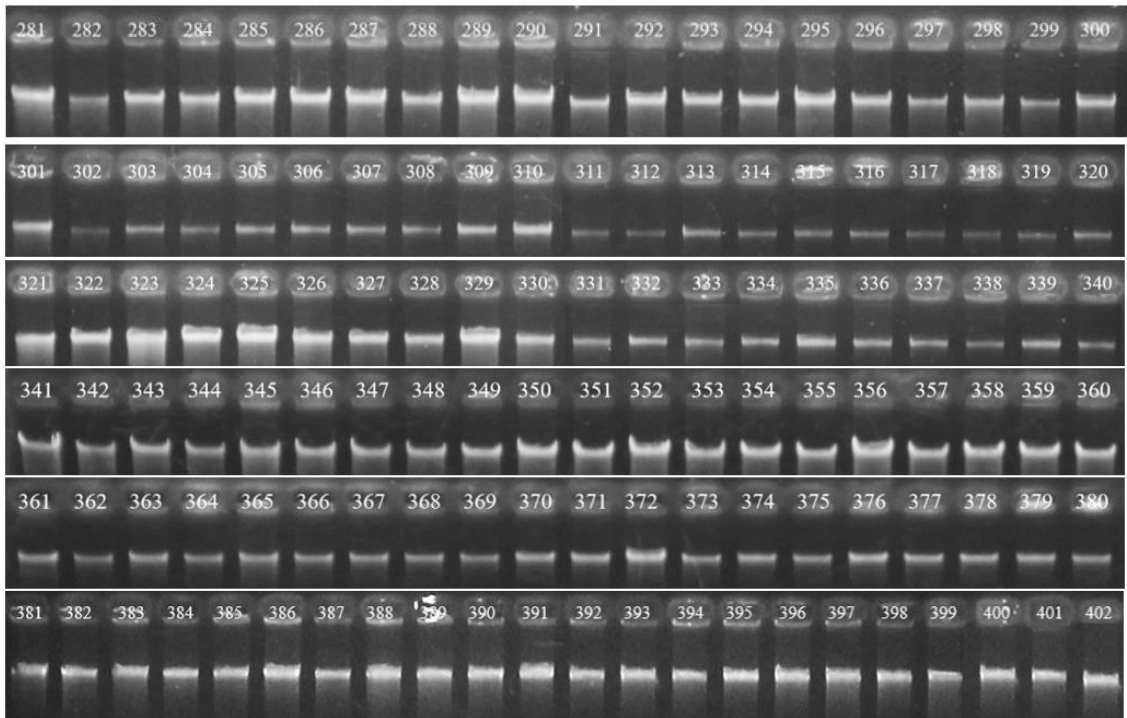
361	VSC159	Bùi Duy C.	1986	Nam	Không	28.16	1.79
362	VSC160	Phan Công T.	1993	Nam	Không	28.89	1.81
363	VSC161	Vũ H.	1990	Nam	Không	27.44	1.77
364	VSC162	Lê Văn B.	1985	Nam	Không	24.79	1.81
365	VSC163	Nguyễn Văn C.	1989	Nam	Không	26.40	1.76
366	VSC164	Phạm Văn Đ.	1987	Nam	Không	33.20	1.75
367	VSC165	Nguyễn Thành L.	1992	Nam	Không	31.99	1.72
368	VSC166	Nguyễn Vĩnh B.	1972	Nam	Không	26.83	1.76
369	VSC167	Phan Quốc P.	1982	Nam	Không	25.77	1.79
370	VSC168	Nguyễn Phùng D.	1989	Nam	Không	28.58	1.71
371	VSC169	Phạm Văn N.	1992	Nam	Không	23.48	1.73
372	VSC170	Đoàn Trung L.	1986	Nam	Không	32.52	1.76
373	VSC171	Long Minh H.	1989	Nam	Không	26.57	1.76
374	VSC172	Quách Ngọc H.	1996	Nam	Không	25.72	1.82
375	VSC173	Nguyễn Văn H.	1991	Nam	Không	28.58	1.71
376	VSC174	Trịnh Xuân T.	1986	Nam	Không	23.48	1.73
377	VSC175	Dương Ngô T.	1985	Nam	Không	23.83	1.77
378	VSC176	Nguyễn Văn H.	1992	Nam	Không	26.37	1.75
379	VSC177	Đậu Khắc T.	1993	Nam	Không	26.40	1.76
380	VSC178	Trần Minh Th.	1986	Nam	Không	33.20	1.75
381	VSC179	Đào Văn T.	1990	Nam	Không	22.08	1.85
382	VSC180	Nguyễn Việt A.	1995	Nam	Không	23.30	1.85
383	VSC181	Nguyễn Hoàng H.	1991	Nam	Không	29.78	1.80
384	VSC182	Nguyễn Văn T.	1992	Nam	Không	32.48	1.81
385	VSC183	Lê Văn L.	1991	Nam	Không	23.83	1.77
386	VSC184	Trịnh Việt H.	1994	Nam	Không	25.31	1.76
387	VSC185	Nguyễn Trường D.	1968	Nam	Không	18.36	1.79
388	VSC186	Ngô Thế T.	1988	Nam	Không	19.43	1.80

389	VSC187	Trần Đình T.	1992	Nam	Không	22.68	1.74
390	VSC188	Đình Đức D.	1993	Nam	Không	26.37	1.75
391	VSC189	Phạm Quốc D.	1986	Nam	Không	27.61	1.88
392	VSC190	Quàng Mạnh H.	1993	Nam	Không	20.46	1.84
393	VSC191	Thân Văn T.	1992	Nam	Không	30.93	1.83
394	VSC192	Lê Q.	1989	Nam	Không	25.77	1.79
395	VSC193	Đỗ Mạnh Q.	1995	Nam	Không	28.58	1.76
396	VSC194	Vũ Quý N.	1987	Nam	Không	36.13	1.76
397	VSC195	Nguyễn Hải T.	1989	Nam	Không	25.21	1.74
398	VSC196	Bùi Văn C.	1983	Nam	Không	20.92	1.75
399	VSC197	Nguyễn Văn T.	1993	Nam	Không	23.18	1.83
400	VSC198	Đình Văn T.	1976	Nam	Không	22.65	1.81
401	VSC199	Trần Nam L.	1983	Nam	Không	25.81	1.68
402	VSC200	Vi Quang H.	1994	Nam	Không	26.91	1.96

Trong đó, VSN001-VSN202: mẫu của bệnh nhân vô sinh nam; VSC001-VSC200: mẫu của đối chứng

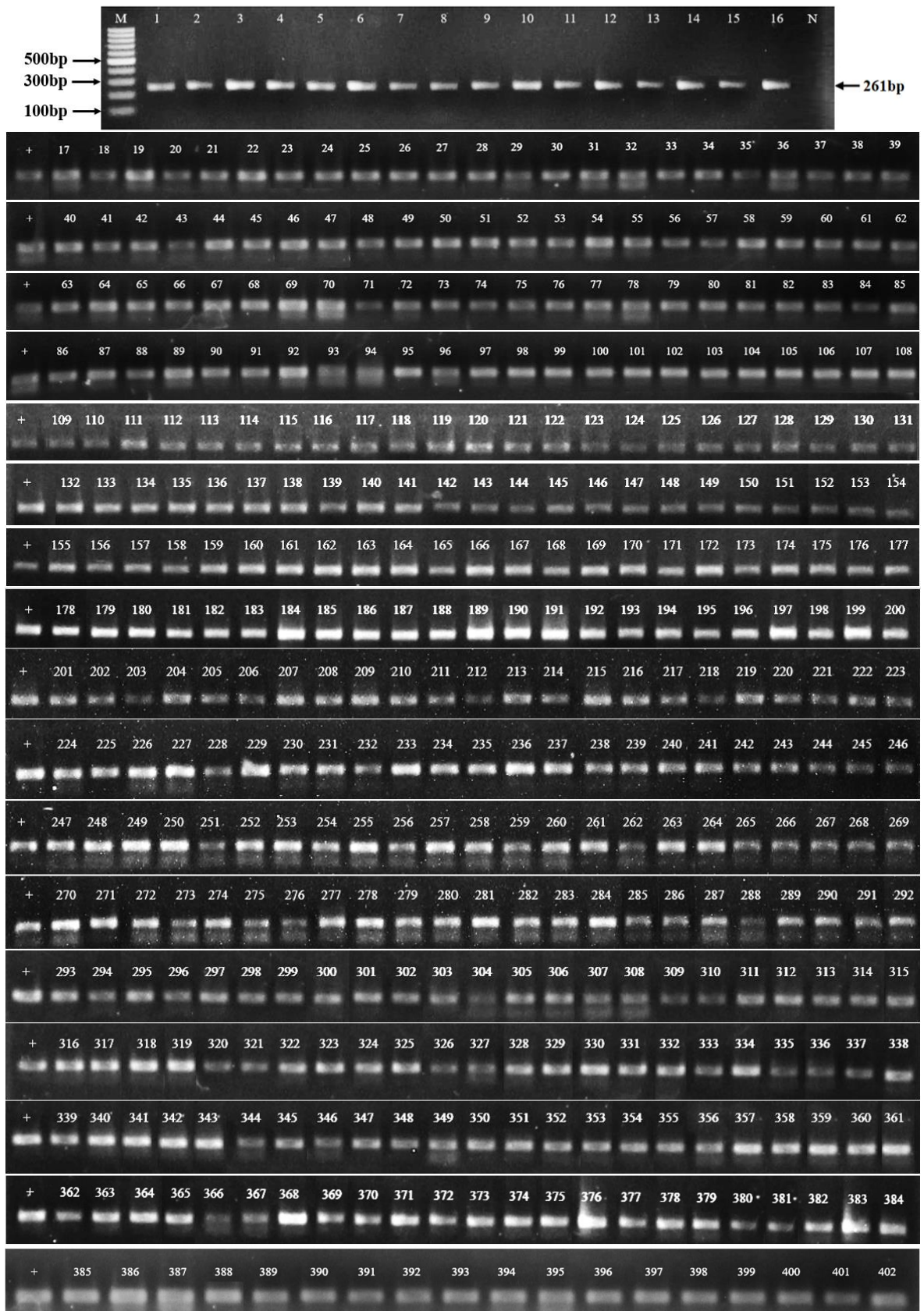
**Phụ lục 2. Điện di sản phẩm DNA tổng số tách chiết từ 402 mẫu máu
nghiên cứu trên gel agarose 1%**





Trong đó từ 1-202: DNA của bệnh nhân vô sinh nam VSN001-VSN202;
203-402: DNA của người nam bình thường VSC001-VSC200

Phụ lục 3. Điện di sản phẩm PCR đa hình *TEX15* rs323345

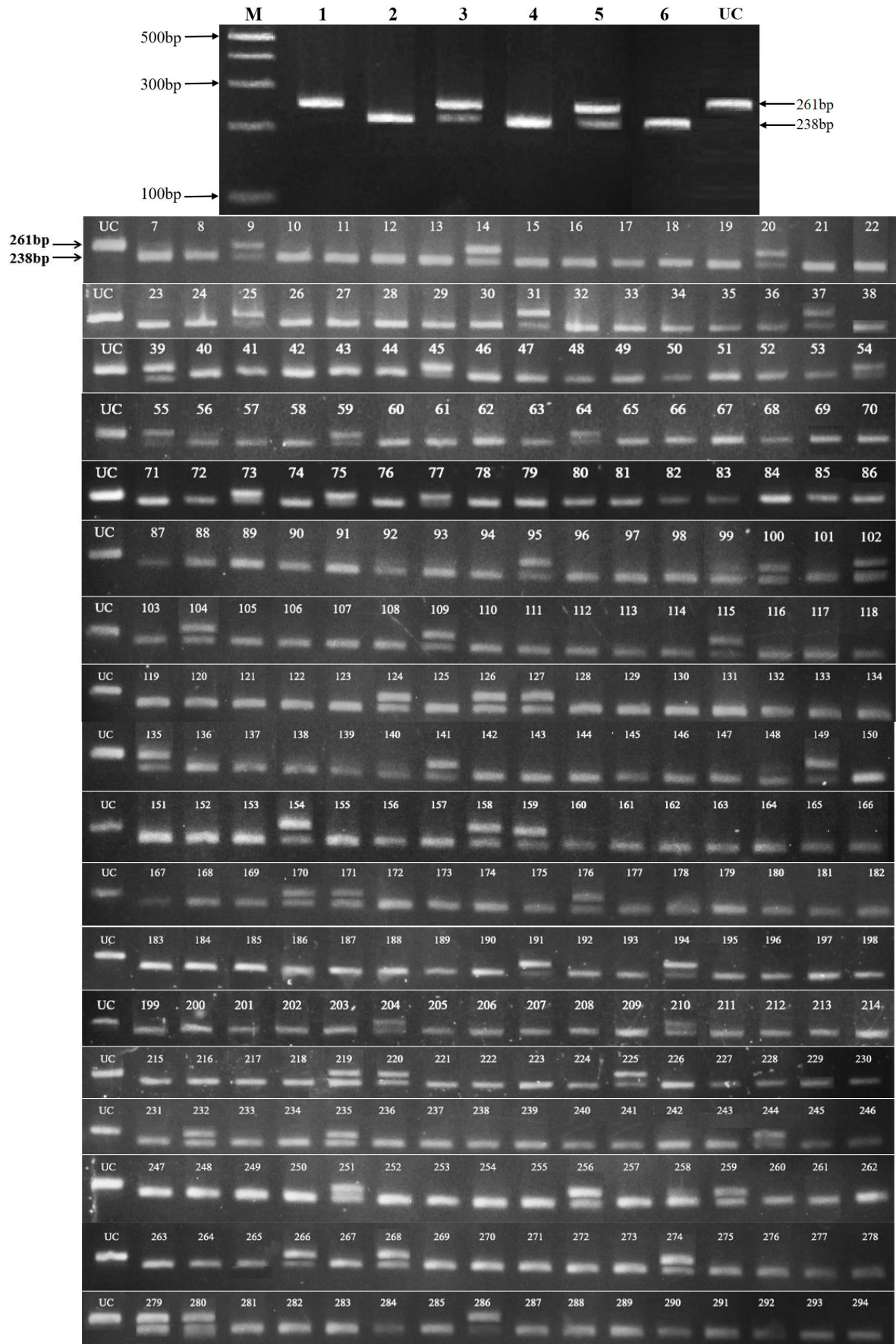


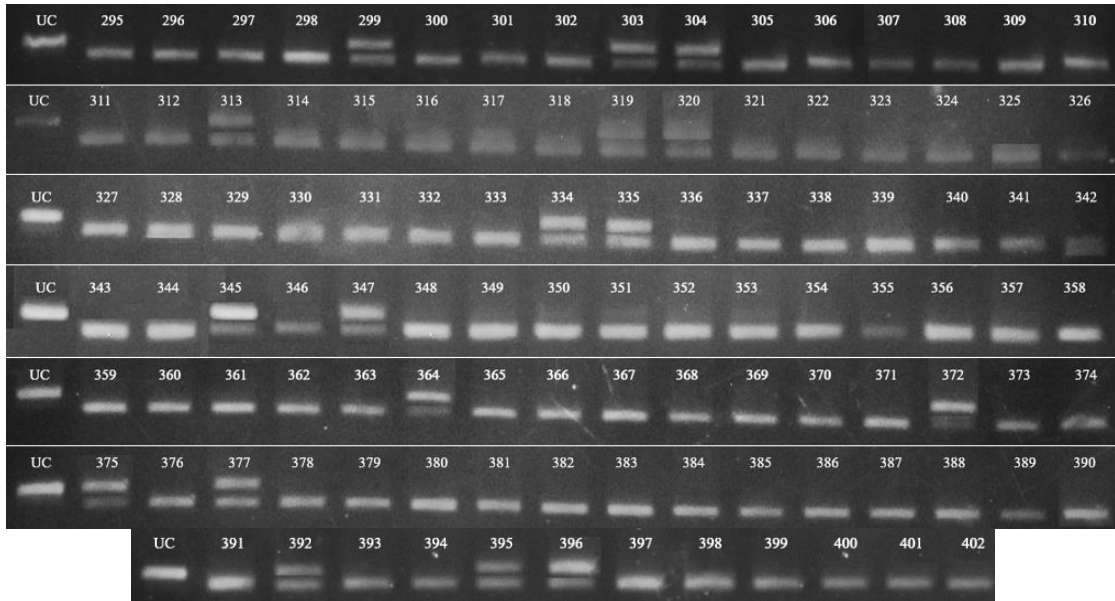
Trong đó từ 1-202: Sản phẩm PCR mẫu VSN001-VSN202;

203-402: Sản phẩm PCR mẫu VSC001-VSC200

+: chứng dương, N: chứng âm

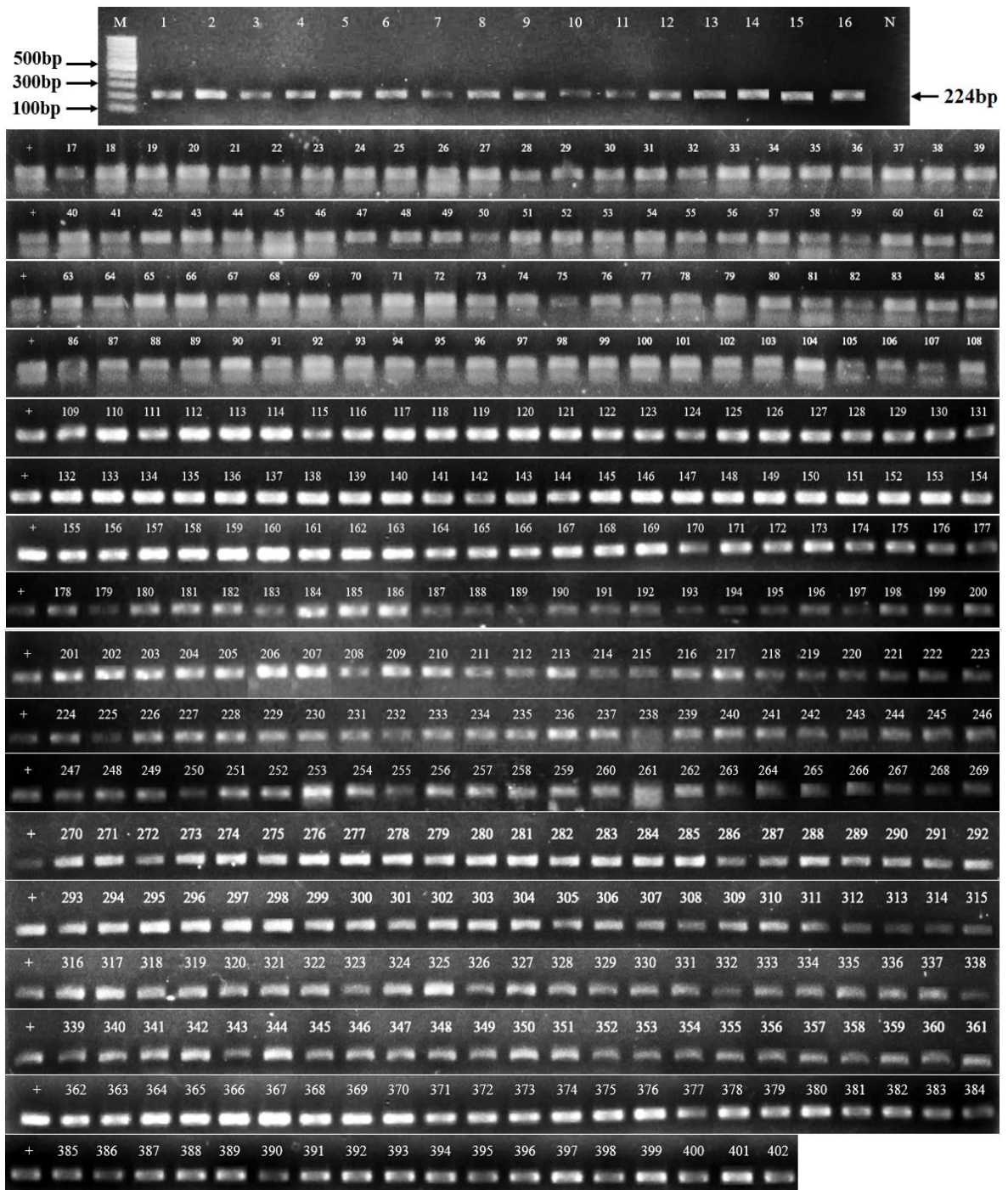
Phụ lục 4. Điện di sản phẩm cắt enzyme *Psp1406I* đa hình *TEX15* rs323345





Trong đó từ 1-202: Sản phẩm cắt mẫu VSN001-VSN202;
 203-402: Sản phẩm cắt mẫu VSC001-VSC200
 UC: Sản phẩm PCR không xử lý bằng enzyme *Psp1406I*

Phụ lục 5. Điện di sản phẩm PCR đa hình *TEX15* rs323346

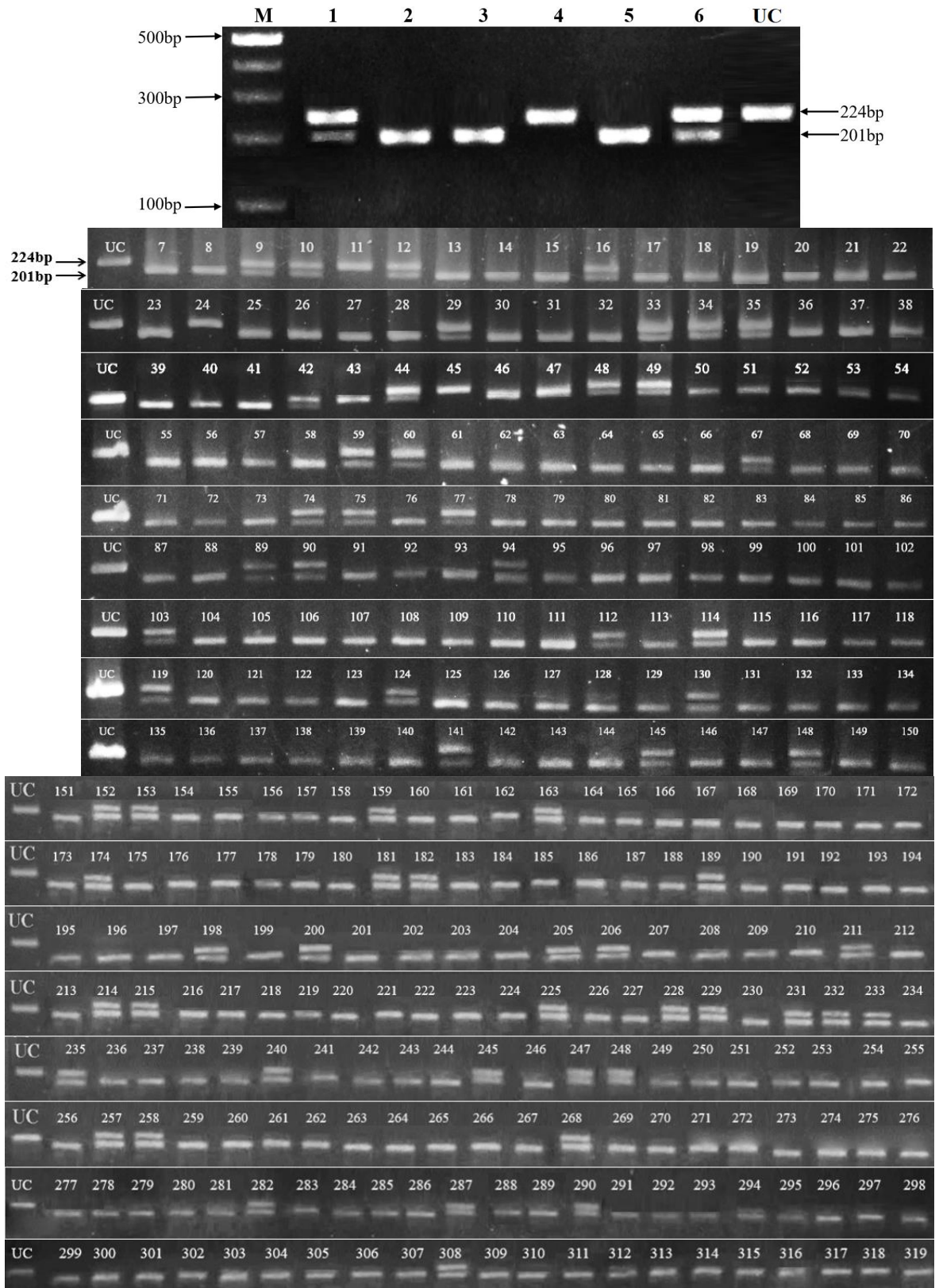


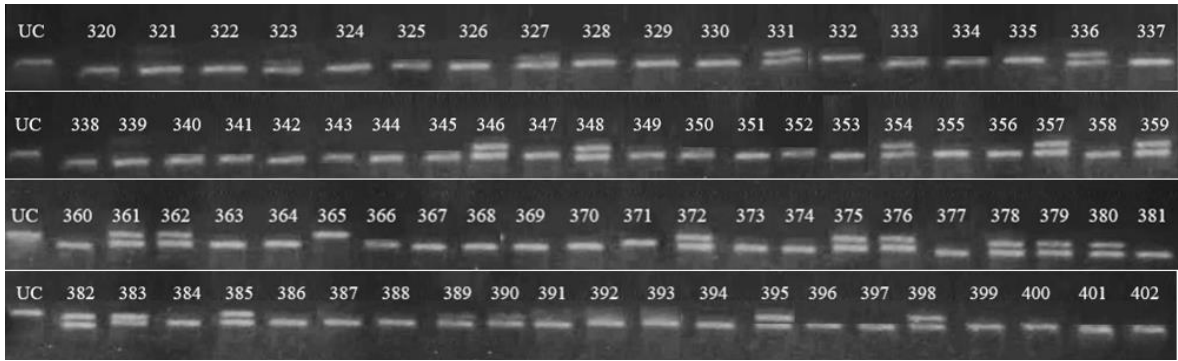
Trong đó từ 1-202: Sản phẩm PCR mẫu VSN001-VSN202;

203-402: Sản phẩm PCR mẫu VSC001-VSC200

+: chứng dương, N: chứng âm

Phụ lục 6. Điện di sản phẩm cắt enzyme *TasI* đa hình *TEX15* rs323346



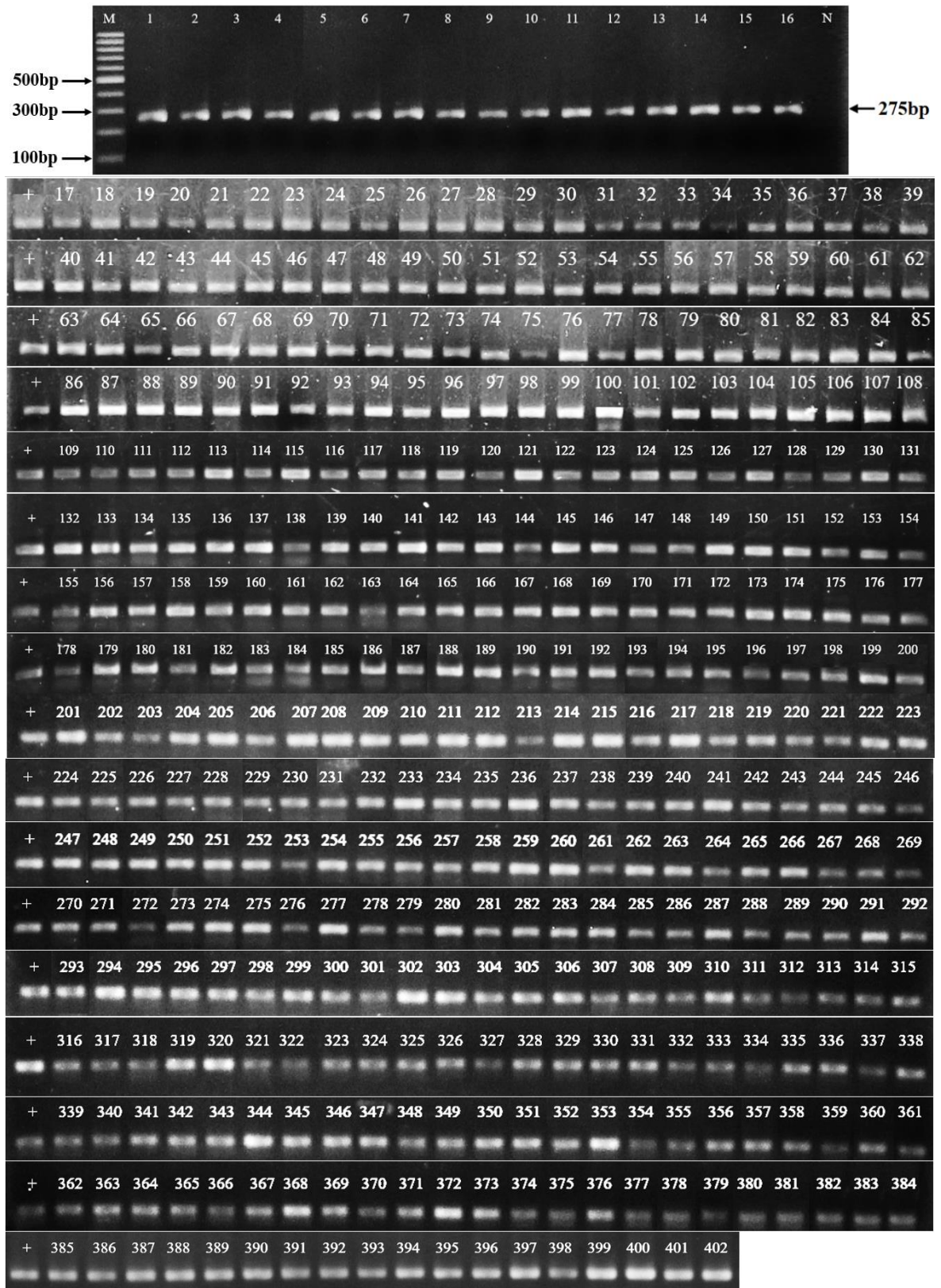


Trong đó từ 1-202: Sản phẩm cắt mẫu VSN001-202;

203-402: Sản phẩm cắt mẫu VSC001-200

UC: sản phẩm PCR không xử lý bằng enzyme *TasI*

Phụ lục 7. Điện di sản phẩm PCR đa hình *TEX15* rs323347

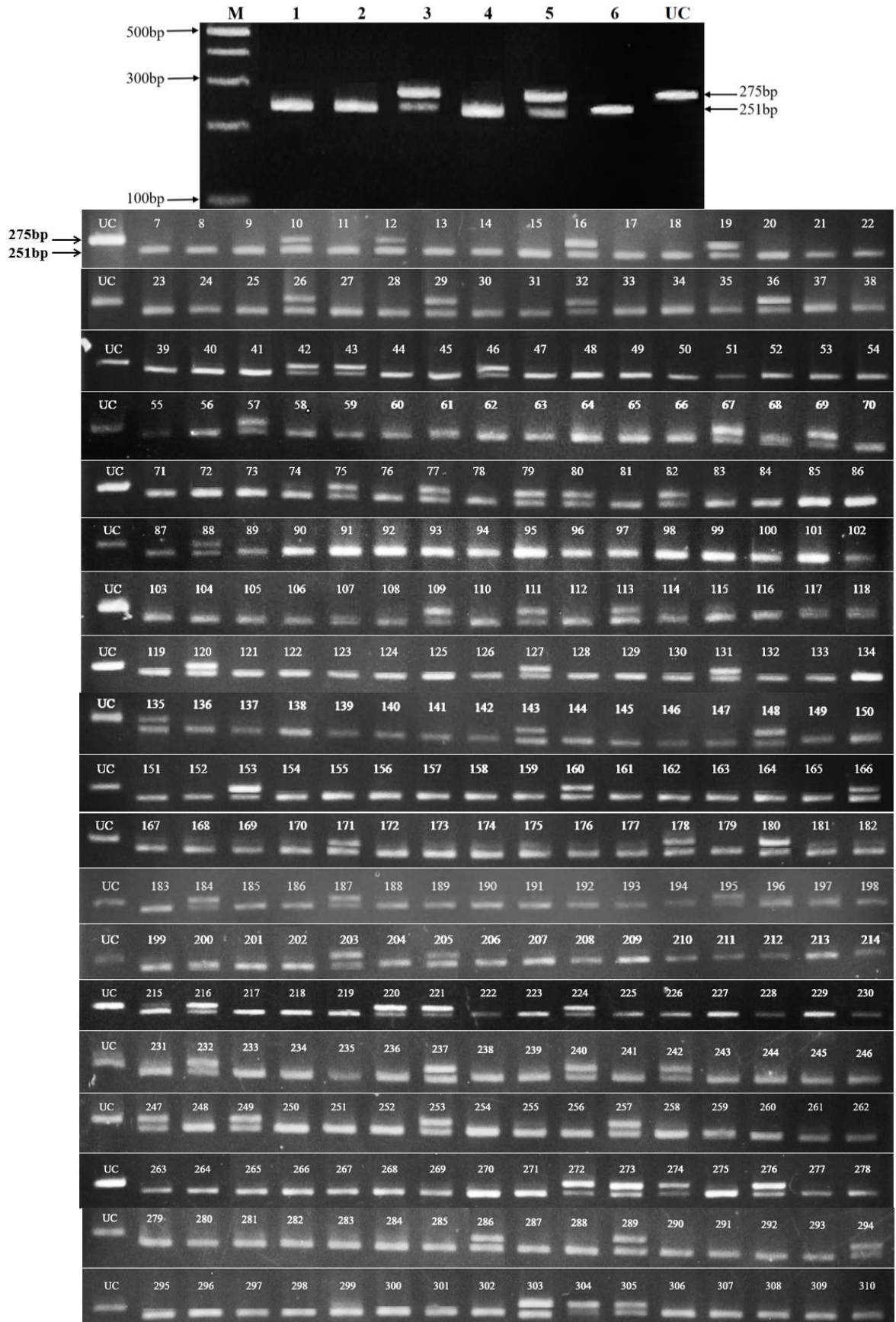


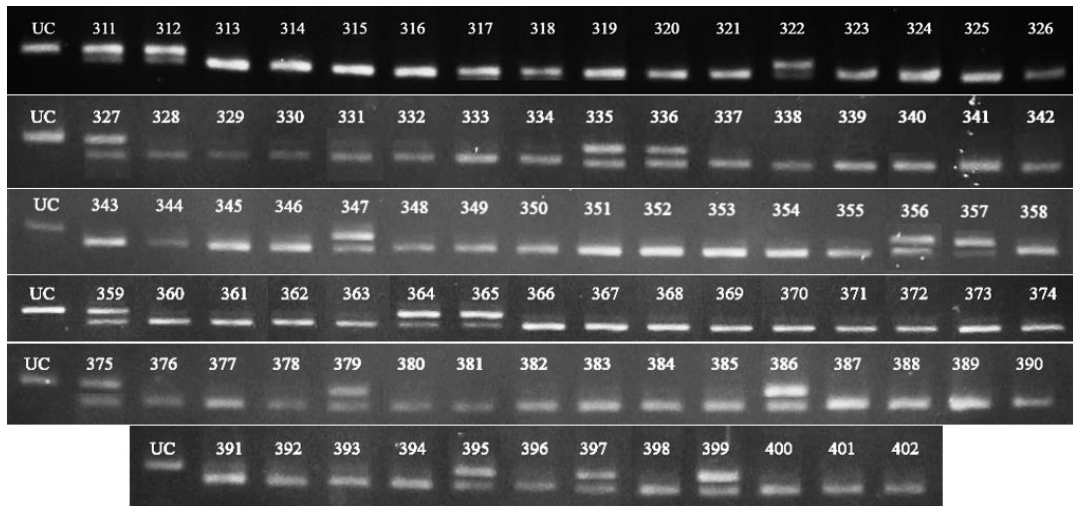
Trong đó từ 1-202: Sản phẩm PCR mẫu VSN001-VSN202;

203-402: Sản phẩm PCR mẫu VSC001-VSC200

+ : chứng dương, N: chứng âm

Phụ lục 8. Điện di sản phẩm cắt enzyme *MunI* đa hình *TEX15* rs323347





Trong đó từ 1-202: Sản phẩm cắt mẫu VSN001-VSN202;

203-402: Sản phẩm cắt mẫu VSC001-VSC200

UC: sản phẩm PCR không xử lý bằng enzyme MunI