

**BỘ GIÁO DỤC VÀ
ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



BẠCH HUY ANH

**NGHIÊN CỨU TÍNH ĐA HÌNH CỦA MỘT SỐ GEN
MÃ HÓA ENZYME CHỐNG OXY HÓA
TRÊN BỆNH NHÂN VÔ SINH NAM**

Mã số: 9 42 02 01

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hà Nội - Năm 2024

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn khoa học 1: PGS.TS. Nguyễn Đăng Tôn, Viện
Nghiên cứu hệ gen.

2. Người hướng dẫn khoa học 2: PGS.TS. Trần Đức Phấn, Đại học Y
Hà Nội.

Phản biện 1: PGS. TS. Đoàn Minh Thuy, Học viện Y dược học Cổ
truyền Việt Nam.

Phản biện 2: PGS. TS. Trịnh Thế Sơn, Học viện Quân Y.

Phản biện 3: PGS. TS. Lương Thị Lan Anh, Đại học Y Hà Nội.

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học
viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa
học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ ...', ngày ... tháng ...
năm 20...

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

Luận giải về tính cấp thiết của vấn đề nghiên cứu

Tình trạng đạt cân bằng của yếu tố stress oxy hoá/chất chống oxy hoá cuối cùng có thể dẫn tới khả năng thành công trong sinh sản sau này hay không. Với những bằng chứng về mối liên hệ giữa các thành phần stress oxy hoá và xúc tác phản ứng chống oxy hóa của tình trạng tinh trùng, những nghiên cứu về hoạt động của các enzyme này trong các mẫu tinh dịch trở thành lĩnh vực nhiều hứa hẹn trong bối cảnh nghiên cứu và khắc phục tình trạng vô sinh nam đang cần nhiều hướng đi mới và hoàn thiện.

Kiến thức về đặc điểm đa hình các gen mã hoá cho các enzyme quan trọng tham gia vào các con đường chống oxy hoá trên người Việt Nam và mối liên hệ với vô sinh nam đến nay vẫn còn hạn chế. Cập nhật dữ liệu đa hình di truyền của nhóm gen nói trên là nền tảng quan trọng bổ sung cho những nghiên cứu cơ bản về vô sinh nam trước đây nhằm làm sáng tỏ những nguy cơ và cơ chế gây bệnh toàn diện hơn. Trên cơ sở đó, đưa ra những đề xuất, khuyến nghị kế hoạch cụ thể, cũng như các quy trình chuẩn nhằm góp phần giải quyết tình trạng vô sinh trong đó cả vấn đề thuốc điều trị tại Việt Nam.

Mục tiêu nghiên cứu:

- Xác định tỷ lệ đa hình ở một số gen chống oxy hoá ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh ở bệnh nhân vô sinh ít và không có tinh trùng.
- Xác định mức độ stress oxy hoá trong tinh dịch ở nam giới thiếu tinh năng.
- Xác định mối liên quan giữa các biến đổi gen chống oxy hoá với vô sinh nam.

Cách tiếp cận nghiên cứu:

Đối tượng nghiên cứu là các nam giới trong độ tuổi sinh sản, bao gồm 107 bệnh nhân được chẩn đoán vô sinh nguyên phát cùng với nhóm đối chứng là 85 nam giới khoẻ mạnh có khả năng sinh sản bình thường và có ít nhất một con sinh học dưới 2 tuổi. Nhóm đối tượng vô sinh sẽ được loại bỏ những nguyên nhân vô sinh do bất thường nhiễm sắc thể và mất đoạn nhỏ trên nhiễm sắc thể Y cùng với những bệnh mắc phải/bệnh của cơ quan sinh sản có thể ảnh hưởng đến tình trạng vô sinh.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Khái niệm vô sinh nam

Theo Tổ chức Y tế Thế giới (World Health Organization-WHO), vô sinh là tình trạng một cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh đẻ, có sức khỏe bình thường, mong muốn có con nhưng không thể có thai sau 12 tháng có quan hệ tình dục mà không sử dụng biện pháp tránh thai nào. Dựa vào tiền sử đã từng có thai trước đó hay chưa mà vô sinh được phân thành hai loại: vô sinh nguyên phát và vô sinh thứ phát. Vô sinh nguyên phát hay còn gọi là vô sinh I, là trường hợp cặp vợ chồng chưa từng có thai lần nào. Vô sinh thứ phát, còn gọi là vô sinh II, là trường hợp cặp vợ chồng đã từng có thai ít nhất một lần nhưng sau đó không thể có thai lại mặc dù đang có quan hệ tình dục bình thường trên một năm và không sử dụng bất kì biện pháp tránh thai nào.

1.2. Khái quát tình hình vô sinh và vô sinh nam tại Việt Nam

Ở Việt Nam, một số công trình nghiên cứu về vô sinh cho thấy tỉ lệ vô sinh có xu hướng tăng. Báo cáo của Nguyễn Việt Tiến tại Hội thảo quốc tế “Cập nhật về hỗ trợ sinh sản” (2009) tại Hà Nội nghiên cứu trên 14.396 cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh đẻ, tuổi từ 15 - 49, tại 8 tỉnh đại diện cho 8 vùng sinh thái của cả nước cho thấy tỉ lệ vô sinh chung trên phạm vi toàn quốc là 7,7%, trong đó vô sinh do nam giới chiếm 25 - 40%, do nữ giới là 40%, còn lại là do cả hai vợ chồng và chưa rõ nguyên nhân.

1.3. Những nguyên nhân bệnh sinh và yếu tố nguy cơ của vô sinh nam

Các yếu tố gây rối loạn nội tiết hay ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh, cương dương, phóng tinh...không có nguyên nhân di truyền đều ảnh hưởng đến vô sinh. Trong những năm gần đây, sự tiến bộ của công nghệ giải trình tự gen đã cho phép xác định rất nhiều những biến thể di truyền là nguyên nhân gây nên những bất thường của hệ thống sinh sản nam giới bao gồm: sự hình thành hợp tử, điều hòa nội tiết của quá trình sinh tinh, quá trình biệt hóa của tế bào mầm và những chức năng của tinh trùng. Các đột biến gen gây bất thường trong sinh sản nam giới bao gồm: đột biến gen gây bất thường cấu trúc và chức năng của tinh trùng, đột biến gen gây bất thường ống dẫn tinh và tinh hoàn và bất thường trên nhiễm sắc thể Y. Ngoài ra, về khía cạnh di truyền ngoại gen thì quá trình methyl hoá của nhiều gen bất hoạt đã được nghiên cứu trên những mẫu tinh dịch bất thường thuộc nhóm bệnh nhân thiểu tinh, tinh trùng dị dạng. Trong số đó,

MEST và *H19* là những gen được nghiên cứu rộng rãi nhất, với những dữ liệu lặp lại cho thấy biến động trong mức độ methyl hoá 2 gen này đóng vai trò là yếu tố nguy cơ của tình trạng vô sinh nam. Bên cạnh đó, lối sống không lành mạnh dẫn đến tình trạng béo phì, thói quen hút thuốc, sử dụng các thiết bị điện tử thường xuyên cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng tiêu cực đến khả năng sinh sản của nam giới.

1.4. Stress oxy hóa và vô sinh nam

Stress oxy hoá là sự mất cân bằng giữa quá trình sản sinh các gốc oxy hoạt động và khả năng loại bỏ các ROS của các chất chống oxy hoá sẵn có. Các tế bào tinh trùng dễ bị tổn thương bởi ROS do chúng có nhiều acid béo không bão hoà trong màng sinh chất cũng như tế bào chất, đồng thời tinh trùng bị hạn chế khả năng chống oxy hoá và hệ thống tự sửa chữa DNA. Một số gen chống oxy hóa có vai trò trong quá trình sinh tinh đã được xác định ở động vật có vú bao gồm *NRF2*, *SOD*, *CAT*, *GST*, *GPX*, *PRX*, *GRX*, *TRX* và *NOS*. Các enzyme được mã hóa bởi nhóm gen nói trên tham gia vào các phản ứng chống oxy hóa, tổng hợp GSH và khử, chu trình oxy hóa khử trong quá trình sinh tinh. Các biến thể di truyền là một nguyên nhân quan trọng gây nên tình trạng vô sinh nam, vậy nên biến thể thuộc các gen mã hóa cho các enzyme chống oxy hóa có thể chịu trách nhiệm cho tình trạng vô sinh nam, đặc biệt là trong môi trường chịu stress oxy hóa. Cho tới nay, các biến thể di truyền của các gen chịu trách nhiệm chống oxy hóa như *NRF2*, *SOD*, *GST*, *NOS*, *CAT* và *GPX* đã được công bố là có liên quan tới vô sinh ở nam giới.

Ở người, có hai SNP của *NRF2* là rs6721961 và rs3562124 có mối liên hệ với tình trạng tinh trùng yếu (số lượng thấp với khả năng di chuyển kém). Những người mang kiểu gen 617TT và 653TT có nguy cơ cao hơn mắc phải tình trạng tinh trùng yếu như vậy. Có ba loại biến thể di truyền của gen *GST* gồm biến thể mất 2 allele *GSTT1* (*GSTT1* null), mất 2 allele *GSTM1* (*GSTM1* null) và *GSTP1* 6624A>G (p.105Ile>Val) đã được nghiên cứu trong thời gian dài và chứng minh là có mối liên hệ với vô sinh nam ở nhiều quần thể người khác nhau. Ở người, tinh trùng bị thiếu hụt *GPX* quan sát thấy ở 26% nam giới vô sinh được chẩn đoán số lượng tinh trùng thấp và khả năng di chuyển kém. Những biến thể di truyền của gen *SOD* cũng có thể liên quan phần nào đến khả năng sinh sản. Ví dụ như đa hình c.47T>C (p.16Val>Ala) (rs4880) thuộc gen *SOD2* có liên quan tới

tình trạng vô sinh và tỉ lệ mang thai thành công khi thực hiện IVF. Đối với NOS, một số allele của *NOS* đã được báo cáo là liên quan tới giảm chức năng của tinh trùng ở một số các quần thể người khác nhau. Ngoài ra, hoạt động của các enzyme thủy phân CAT đã được chứng minh là có mối liên quan tới chất lượng tinh trùng kém.

1.5. Tình hình nghiên cứu vô sinh nam tại Việt Nam và trên thế giới

Phổ biến thể di truyền của bệnh nhân vô sinh nam vô cùng phức tạp bởi tinh dịch và cấu trúc mô học của tinh hoàn rất không đồng nhất. Cho tới nay, có ít nhất 2.000 gen có thể chi phối quá trình sinh tinh. Những phương pháp xét nghiệm di truyền thông thường cho nam giới vô sinh trong thực hành lâm sàng hiện nay là xét nghiệm nhiễm sắc thể đồ, sàng lọc mất đoạn nhỏ trên nhiễm sắc thể Y và xét nghiệm đột biến gen *CFTR*.

Mặc dù đã đạt được những tiến bộ đáng kể trong lĩnh vực di truyền y học, có tới 80% nam giới vô sinh không rõ nguyên nhân. Cùng với sự phát triển nhanh chóng của các công nghệ phân tích di truyền, các chiến lược phân tích hệ gen trong vòng 20 năm trở lại đây bao gồm: các phương pháp dựa trên nền tảng microarray (SNP array, exome array, CGH array) và giải trình tự thế hệ mới (Next Generation Sequencing-NGS).

Tại Việt Nam, Nguyên nhân di truyền do mất đoạn gen *AZF* ở nhóm bệnh nhân vô sinh nam không có tinh trùng đã được khảo sát bởi PGS. Lương Thị Lan Anh và cs. Các nhóm nghiên cứu tại Bệnh viện trung ương quân đội 108, trường đại học Y Hà Nội cũng đã triển khai hướng nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của nồng độ nguyên tố vi lượng (kẽm) hoặc fructose trong huyết thanh/tinh dịch với đặc điểm vô sinh nam. Ngoài ra, mối tương quan giữa stress oxy hoá với đa hình di truyền của gen *NAT2* và *GSTP1* trong nhóm vô sinh nam nguyên phát đã được khảo sát bởi Vũ Thị Huyền và cs. Cho tới nay, chưa có nghiên cứu quy mô nào về mối liên hệ giữa các biến thể di truyền của các gen chịu trách nhiệm cho hệ thống chống oxy hoá là *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *NOS3* với tình trạng vô sinh nam tại Việt Nam.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu và thời gian nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu 107 bệnh nhân (tuổi từ 21-50) được chẩn đoán vô sinh nguyên phát và nhóm đối chứng là 85 nam giới khỏe mạnh (tuổi từ 23-43), đều trong độ tuổi sinh sản. Từ 1/2019-12/2020 thu 107 bệnh nhân và 85 đối chứng.

Mẫu phiếu thu thập thông tin được thiết lập trước giai đoạn thu mẫu. Thông tin bệnh án chi tiết của các tình nguyện viên tham gia nghiên cứu được bảo mật và lưu trữ tại Đại học Y Hà Nội. Thông tin hành chính bao gồm các thông tin nhân khẩu học của các cặp vợ chồng, ngoài ra còn có phiếu thông tin xét nghiệm tinh dịch đồ và thông tin xét nghiệm stress oxy hóa.

2.2. Thiết kế nghiên cứu và cỡ mẫu nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu: cắt ngang có đối chứng
- Cỡ mẫu cần thiết cho nghiên cứu được tính dựa trên cơ sở tần số xuất hiện các đa hình gen, được xác định theo công thức sau:

$$n = \frac{4C}{(\ln OR)^2 pq}$$

Trong đó: n là số mẫu cần thu thập; C là hằng số liên quan đến sai số loại I và loại II. Lấy giá trị $\alpha = 0,05$ và $\beta = 0,20$ thì $C = 7,85$; OR: Tỷ số nguy cơ; p: tần số xuất hiện đa hình gen.

2.3. Dụng cụ và hóa chất trong nghiên cứu

Các máy móc thiết bị sử dụng trong xét nghiệm tinh dịch đồ thuộc Trung tâm di truyền lâm sàng và hệ gen thuộc Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Các máy móc, thiết bị và hóa chất phục vụ thí nghiệm sinh học phân tử thuộc Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Xác định mức độ stress oxy hóa của mẫu tinh dịch

Bộ kit Oxisperm (Halotech, Tây Ban Nha) được sử dụng để đánh giá mức độ stress oxy hóa thông qua mức độ dư thừa của anion superoxide có trong tinh dịch. Tất cả các mẫu tinh dịch sau khi thu sẽ được đo stress oxy

hóa ngay sau khi hóa lỏng và 60 phút sau khi xuất tinh để tránh tình trạng dương tính giả.

2.4.2. Tách chiết và xác định nồng độ DNA tổng số

Các mẫu máu sau khi tiếp nhận được mã hóa và tiến hành tách chiết DNA tổng số theo quy trình của bộ kit Exgene™ Blood SV mini Kit (GeneAll, Hàn Quốc). Nồng độ DNA tổng số được đánh giá bằng bộ kit Qubit dsDNA HS Assay (Life Technologies, Mỹ).

2.4.3. PCR khuếch đại đặc hiệu các đoạn gen chứa biến thể quan tâm

Trình tự các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế bằng phần mềm Primer 3 (v.0.4.0) dựa trên trình tự gen tham chiếu, được tổng hợp nhân tạo bởi công ty PHUSA Biochem (Cần Thơ, Việt Nam). Sử dụng các cặp mồi đặc hiệu đã được thiết kế, vùng gen chứa các biến thể quan tâm *SOD1* 7958G>A, *SOD2* c.47T>C (p.16Val>Ala), *CAT*-262C>T và *NOS3* -786C>T được khuếch đại theo quy trình chuẩn. Tất cả các sản phẩm sau khi PCR được tinh sạch bằng Multiscreen PCR 96 Filter Plate theo hướng dẫn của nhà cung cấp.

2.4.4. Giải trình tự Sanger

Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch sẽ dùng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự. Trình tự các đoạn DNA điện di mao quản và đọc tín hiệu huỳnh quang trên máy giải trình tự ABI 3500 Genetic Analyzer. Tín hiệu được ghi tự động, phân tích và lưu trữ trên máy tính.

2.5. Phân tích số liệu nghiên cứu

Số liệu thô thu được sau khi giải trình tự được phân tích bằng phần mềm SeqScape 3.0 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Mỹ). Các thuật toán thống kê được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm khi bình phương (χ^2), kiểm định ANOVA một nhân tố, kiểm định Wilcoxon và hồi quy logistic.

2.6. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành sau khi được phép và đã được thông qua bởi hội đồng Y đức thuộc Đại học Y Hà Nội (76/HMU-IRB).

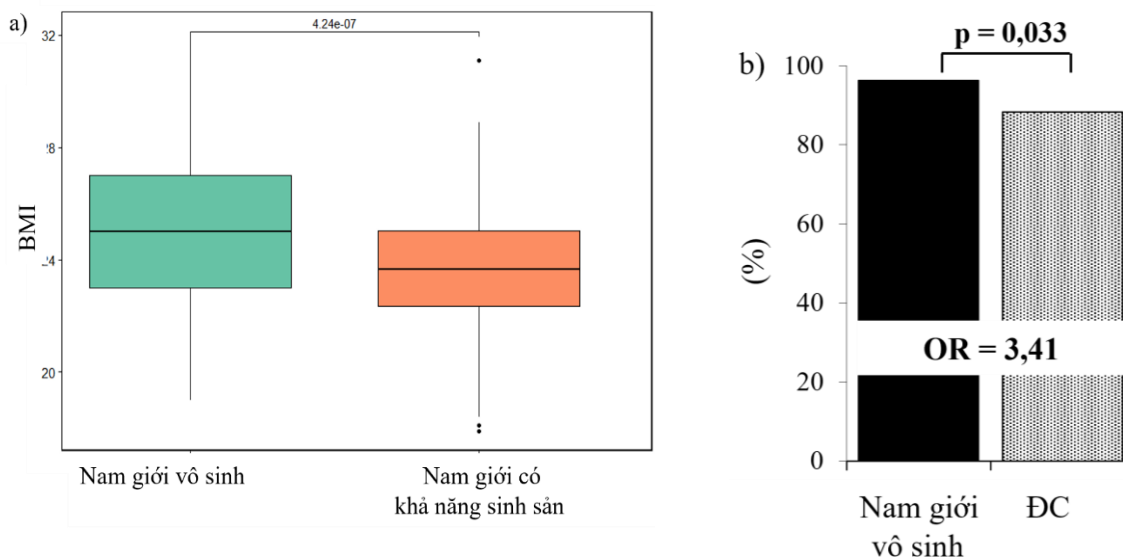
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm nhân khẩu học và các chỉ số lâm sàng của đối tượng nghiên cứu

Bảng 3.1. Đặc điểm nhân khẩu học và thông số tình dịch của các mẫu nghiên cứu

Đặc điểm	Nam giới vô sinh (N=107)	Nam giới có khả năng sinh sản (N=85)	P OR (95% CI)
Nhân khẩu học			
Tuổi (Năm/TB± SD)	31,93 ± 6,3	31,96 ± 4,87	0,920 ^b
BMI (Kg/m ² /TB± SD)	24,84 ± 2,31	23,53 ± 2,55	0,00026^b
Hút thuốc			
Có (%)	65 (60,75)	48 (56,47)	
Không (%)	42 (39,25)	37 (43,53)	
Uống rượu			
Có (%)	103 (96,26)	75 (88,23)	0,034^a

Chú thích: BMI: Body Mass Index-Chỉ số khối cơ thể; SD: Standard deviation-Sai số chuẩn, TB: giá trị trung bình.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của BMI và uống rượu đến tình trạng vô sinh nam

a) BMI ở nhóm nam giới vô sinh ($24,84 \pm 2,31$) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm nam giới có khả năng sinh sản ($23,53 \pm 2,55$), $p = 0,00026$, b) Tỷ lệ nam giới vô sinh có sử dụng rượu cao hơn so với nhóm có khả năng sinh sản (OR = 3,41; $p = 0,033$).

3.2. Xác định mức độ stress oxy hoá của mẫu tinh dịch

Tinh dịch được thu thập từ các bệnh nhân được xác định là vô sinh vô căn. Mức độ stress oxy hoá được xác định bằng phương pháp đo nồng độ ion âm superoxide bằng kit Oxisperm trong các mẫu trong vòng 60 phút sau khi xuất tinh. Mức độ stress oxy hoá từ các kết quả thu được khi đo bằng bộ kit Oxisperm được chia làm 4 cấp độ từ 1 đến 4. Trong nghiên cứu này, mức độ stress oxy hoá các mẫu tinh dịch của bệnh nhân sau khi phân tích được phân loại ra làm hai cấp độ là: cao (mức 3 và 4) và thấp (mức 1 và 2). Do đặc điểm thời gian xử lý mẫu tinh dịch sau khi thu không đảm bảo 100% các mẫu đạt các tiêu chuẩn để loại trừ dương tính giả (thời gian xử lý mẫu quá 60 phút sau khi thu) nên chỉ có 90/107 mẫu tinh dịch của bệnh nhân có thông số về mức độ stress oxy hoá.

Cụ thể, xác định được 21/90 mẫu có mức độ stress oxy hoá cao, chiếm 23,3% và 86/90 mẫu có mức độ stress oxy hoá thấp, chiếm 76,7% tổng số mẫu.

3.3. Xác định các đa hình của một số gen chống oxy hóa

3.3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số và khuếch đại các đoạn gen chứa biến thể quan tâm

DNA tổng số sau khi tách chiết từ máu ngoại vi được điện di kiểm tra trên gel Agarose 0,8%. Hình ảnh điện di cho thấy các dải băng sáng, rõ, phản ánh DNA tổng số không bị đứt gãy và có độ tinh sạch cao, đảm bảo chất lượng sử dụng cho các bước thí nghiệm tiếp theo.

Ở tất cả các mẫu nghiên cứu (107 mẫu bệnh nhân và 85 mẫu đối chứng), chúng tôi đã khuếch đại thành công tất cả 4 đoạn gen mang các biến thể 7958G>A (rs4998557) thuộc gen *SOD1* (298 bp), c.47 T>C (rs4880) thuộc gen *SOD2* (218 bp), -262C>T (rs1001179) thuộc gen *CAT* (282 bp) và -786C>T (rs2070744) thuộc gen *NOS3* (280 bp).

3.3.2. Phân tích biến thể gen của các đối tượng nghiên cứu

3.3.2.1. Biến thể 7958G>A (rs4998557) của gen *SOD1*

Đối với biến thể 7958 G>A (rs4998557) của gen *SOD1*, ở nhóm bệnh nhân vô sinh, có 23/107 cá thể mang kiểu gen đồng hợp tử GG (21,5%), 66 cá thể mang kiểu gen dị hợp tử GA (61,68%) và 18 cá thể

mang kiểu gen đồng hợp tử đột biến AA (16,82%). Trong nhóm đối chứng, 26/85 cá thể mang kiểu gen đồng hợp tử kiểu dại GG (30,59%), 36/85 cá thể mang kiểu gen dị hợp tử GA (42,35%) và 23/85 cá thể có kiểu gen đồng hợp tử đột biến AA (27,06%). Tần số allele ở nhóm bệnh nhân là allele G chiếm 47,66%, allele A chiếm 52,34%. Ở nhóm đối chứng, tần số allele G là 48,24%, tần số allele A là 51,76%.

Bảng 3.3. Tần số allele và tần số kiểu gen của biến thể *SOD1* 7958 G>A (rs4998557)

Kiểu gen/Allele	Bệnh nhân N = 107 (%)	Đối chứng N = 85 (%)
GG	23 (21,5)	26 (30,59)
GA	66 (61,68)	36 (42,35)
AA	18 (16,82)	23 (27,06)
Allele A	112 (52,34)	88 (51,76)
Allele G	102 (47,66)	82 (48,24)

Chú thích: N: số mẫu nghiên cứu

3.3.2.2. Biến thể c.47 T>C (rs4880) của gen *SOD2*

Đối với biến thể c.47 T>C (rs4880) của gen *SOD2*, ở nhóm bệnh nhân vô sinh, đã xác định được 51 cá thể mang kiểu gen đồng hợp tử TT (47,66%), 48 cá thể mang kiểu gen dị hợp tử TC (44,86%) và 8 cá thể mang kiểu gen đồng hợp tử đột biến CC (7,48%). Trong nhóm đối chứng, có 56 cá thể mang kiểu gen đồng hợp tử kiểu dại TT (65,88%), 27 cá thể mang kiểu gen dị hợp tử GA (31,76%) và 2 cá thể có kiểu gen đồng hợp tử đột biến CC (2,35%). Tần số allele ở nhóm bệnh nhân là allele T chiếm 70,09%, allele C chiếm 29,91%. Ở nhóm đối chứng, tần số allele T là 81,76%, tần số allele C là 18,24%.

Bảng 3.4. Tần số allele và tần số kiểu gen của biến thể *SOD2* c.47 T>C (rs4880)

Kiểu gen/Allele	Bệnh nhân N = 107 (%)	Đối chứng N = 85 (%)
TT	51 (47,66)	56 (65,88)
TC	48 (44,86)	27 (31,76)
CC	8 (7,48)	2 (2,35)

Allele T	150 (70,09)	139 (81,76)
Allele C	64 (29,91)	31 (18,24)

Chú thích: N: số mẫu nghiên cứu

3.3.2.3. Biến thể -262 C>T (rs1001179) của gen CAT

Bảng 3.5. Tần số allele và tần số kiểu gen của biến thể CAT -262 C>T (rs1001179)

Kiểu gen/Allele	Bệnh nhân N = 107 (%)	Đối chứng N = 85 (%)
CC	88 (82,24)	75 (88,24)
CT	18 (16,82)	10 (11,76)
TT	1 (0,93)	0 (0)
Allele C	194 (90,65)	160 (94,12)
Allele T	20 (9,35)	10 (5,88)

Chú thích: N: số mẫu nghiên cứu

Đối với -262 C>T (rs1001179) của gen CAT, ở nhóm bệnh nhân vô sinh, có 88 người mang kiểu gen đồng hợp tử CC (82,24%), 18 người mang kiểu gen dị hợp tử CT (16,82%) và chỉ có 1 người mang kiểu gen đồng hợp tử đột biến TT (0,93%). Trong nhóm đối chứng, có 75 cá thể mang kiểu gen đồng hợp tử kiểu dại CC (88,24%), 27 cá thể mang kiểu gen dị hợp tử CT (11,76%) và không có cá thể nào có kiểu gen đồng hợp tử đột biến TT. Tần số allele ở nhóm bệnh nhân là allele C chiếm 90,65%, allele T chiếm 9,35%. Ở nhóm đối chứng, tần số allele C là 94,12% và tần số allele T là 5,88%.

3.3.2.4. Biến thể -786 C>T (rs2070744) của gen NOS3

Đối với biến thể -786 C>T (rs2070744) của gen NOS3, ở nhóm bệnh nhân vô sinh, kiểu gen đồng hợp tử đột biến TT chiếm tần số cao nhất (57,94%), sau đó là kiểu gen dị hợp tử CT (40,19%) và kiểu gen đồng hợp tử kiểu dại CC có tần số thấp nhất (1,87%). Tương tự, ở nhóm đối chứng, tần số kiểu gen đồng hợp tử kiểu dại CC, dị hợp tử CT và đồng hợp tử kiểu đột biến TT lần lượt là 1,18%, 17,65% và 81,18%. Tần số allele ở nhóm bệnh nhân là allele T chiếm 78,04%, allele C chiếm 21,96%.

Bảng 3.6. Tần số allele và tần số kiểu gen của biến thể NOS3 -786 C>T (rs2070744)

Kiểu gen/Allele	Bệnh nhân N = 107 (%)	Đối chứng N = 85 (%)
CC	2 (1,87)	1 (1,18)
CT	43 (40,19)	15 (17,65)
TT	62 (57,94)	69 (81,18)
Allele T	167 (78,04)	153 (90)
Allele C	47 (21,96)	17 (10)

Chú thích: N: số mẫu nghiên cứu

3.4. Khảo sát mối liên quan giữa các biến thể di truyền của các gen chống oxy hóa với tình trạng vô sinh và tình trạng oxy hóa

3.4.1. Đánh giá đặc điểm di truyền của nhóm bệnh nhân vô sinh nam và đối chứng trong mối tương quan với những thông số cơ bản của tinh dịch.

Sự khác biệt trong tần số kiểu gen và tần số allele của các biến thể nghiên cứu tiếp tục được khảo sát giữa 2 nhóm: 107 mẫu bệnh nhân và 85 mẫu đối chứng nhằm làm rõ mối liên quan giữa đặc điểm di truyền và tình trạng vô sinh nam.

Đối với biến thể *SOD1* 7958G>A, sự phân bố của các kiểu gen giữa 2 nhóm bệnh nhân và nhóm đối chứng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,027$). Cụ thể, kiểu gen dị hợp tử GA ở nhóm bệnh nhân có tần số cao hơn so với nhóm đối chứng ($p = 0,004$). Ngược lại, kiểu gen đồng hợp tử đột biến AA ở nhóm đối chứng có tần số cao hơn so với nhóm bệnh nhân ($p = 0,044$).

Đối với biến thể *SOD2* c.47T>C (rs4880), quan sát thấy kiểu gen đồng hợp tử kiểu dại TT ở nhóm đối chứng có tần số cao hơn so với nhóm bệnh nhân ($p = 0,006$). Ngược lại kiểu gen dị hợp tử TC ở nhóm đối chứng lại có tần số thấp hơn so với nhóm bệnh nhân ($p = 0,033$). Trong khi đó allele kiểu dại T ở nhóm đối chứng cũng cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm bệnh nhân vô sinh ($p = 0,019$).

Đối với biến thể *CAT* -262C>T, sự khác biệt trong phân bố các kiểu gen và allele giữa 2 nhóm nghiên cứu không đạt ngưỡng ý nghĩa thống kê.

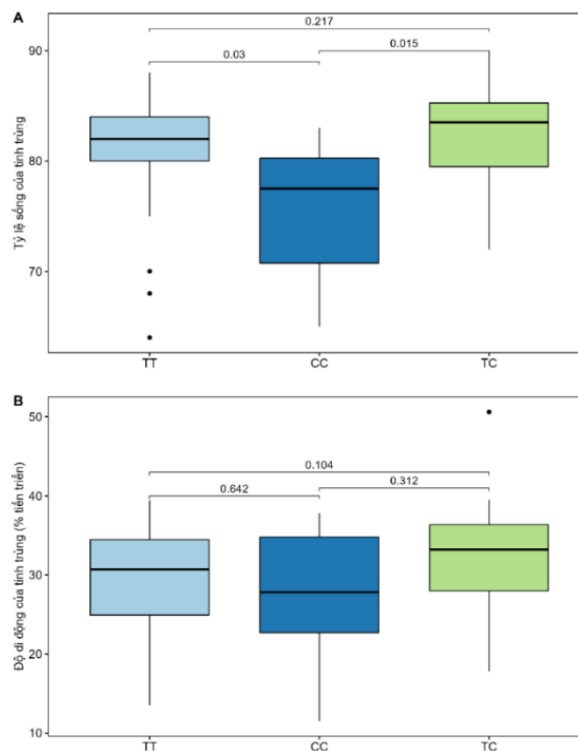
Đối với biến thể *NOS3* -786C>T, kiểu gen dị hợp tử có tần số cao hơn ở nhóm bệnh nhân ($p = 0$). Tần số allele đột biến C ở nhóm bệnh nhân cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng ($p = 0,02$). Mô hình

lặn cho thấy tỉ lệ số người mang allele kiểu đại ở nhóm bệnh nhân cao hơn nhóm đối chứng ($p = 0,001$).

3.4.2. *Mối tương quan giữa đặc điểm di truyền và đặc điểm lâm sàng của tình trạng ở nhóm bệnh nhân vô sinh nam.*

Bên cạnh đặc điểm vô sinh, chúng tôi tiếp tục khảo sát mối liên quan giữa đặc điểm di truyền của nhóm bệnh nhân với những thông số cơ bản của các mẫu tinh trùng ở những bệnh nhân này. Những thông số này bao gồm: hình dạng, đặc điểm vận động, tỉ lệ sống sót, mật độ và tổng số tinh trùng.

Kết quả cụ thể cho thấy, đối với *SOD2* c.47T>C có sự khác biệt về thông số trung bình của đặc tính tiến tới và tỉ lệ sống giữa các kiểu gen khác nhau. Trong đó, tỉ lệ phần trăm tinh trùng sống sót ở những bệnh nhân có kiểu gen kiểu đại hoặc dị hợp tử (TT hoặc TC) cao hơn so với dữ liệu thu được ở những bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử đột biến (CC) (Hình 3.9). Khảo sát các biến thể còn lại bao gồm *SOD1* 7958G>A, *CAT* -262 C>T, *NOS3* -786 C>T, quan sát thấy không có sự khác biệt nào về các đặc điểm của tinh trùng giữa các kiểu gen khác nhau.



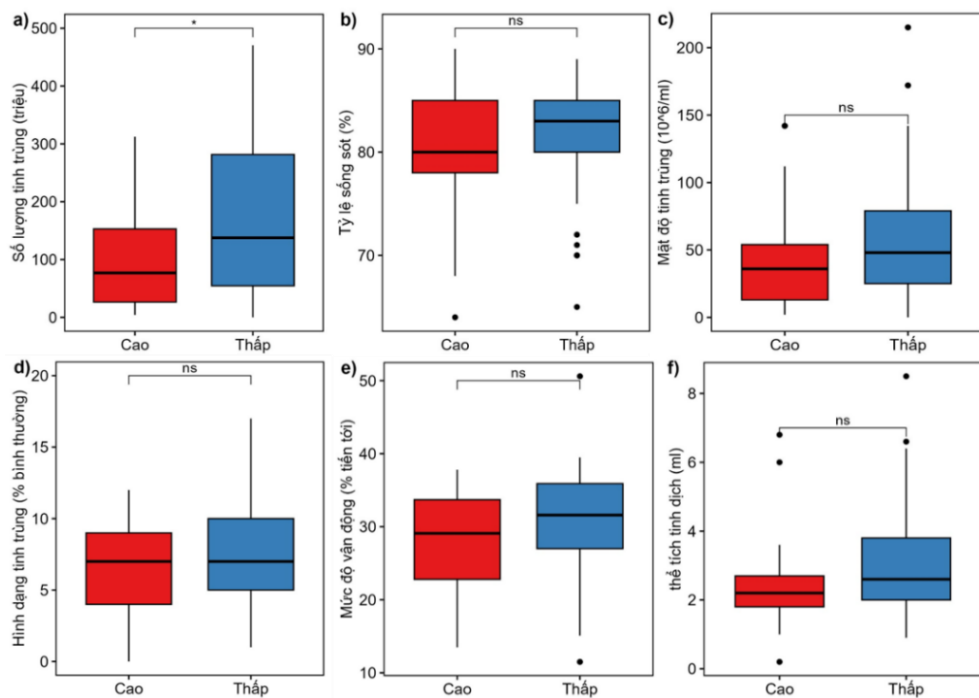
Hình 3.8. Mối liên quan giữa đa hình gen *SOD2* c.47T>C với các thông số lâm sàng của tinh trùng ở nhóm bệnh nhân vô sinh nam.

A) Tương quan giữa kiểu gen *SOD2* và tỉ lệ sống sót của tinh trùng, B) Tương quan giữa kiểu gen *SOD2* và độ di động của tinh trùng. Các box màu xanh nhạt: kiểu gen đồng hợp tử kiểu dại TT, box màu xanh lam đậm: kiểu gen đồng hợp tử đột biến CC, box màu xanh lá cây: kiểu gen dị hợp tử TC.

3.4.3. Đánh giá mối liên hệ giữa mức độ stress oxy hoá với chỉ số lâm sàng của tinh trùng và đặc điểm di truyền ở bệnh nhân nam vô sinh.

3.4.3.1. Mức độ stress oxy hoá của tinh trùng ở nhóm bệnh nhân nam vô sinh và mối liên quan với thông số của tinh trùng.

Chỉ có 90/107 mẫu tinh trùng của bệnh nhân nam vô sinh đủ điều kiện để đánh giá stress oxy hóa. Kết quả cho thấy ở những mẫu có mức độ stress oxy hóa cao thì tổng số tinh trùng thấp hơn đáng kể so với nhóm mẫu có mức độ stress oxy hóa thấp, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p = 0,0334$) (Hình 3.9a). Ngược lại thì khi đánh giá mối liên hệ giữa stress oxy hóa với các chỉ số khác của tinh trùng như thể tích tinh dịch, hình dạng, di động tiến tới, phần trăm sống và mật độ, quan sát thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm mẫu tinh trùng có mức độ stress oxy hóa cao và thấp.



Hình 3.9. Mối liên hệ giữa thông số của tinh trùng trong nhóm bệnh nhân với mức độ stress oxy hóa

Chú thích: Box màu đỏ đại diện cho nhóm có mức độ stress oxy hóa cao và box màu xanh đại diện cho nhóm có mức độ stress oxy hóa thấp. *: $p < 0,05$, ns: không đạt mức ý nghĩa thống kê.

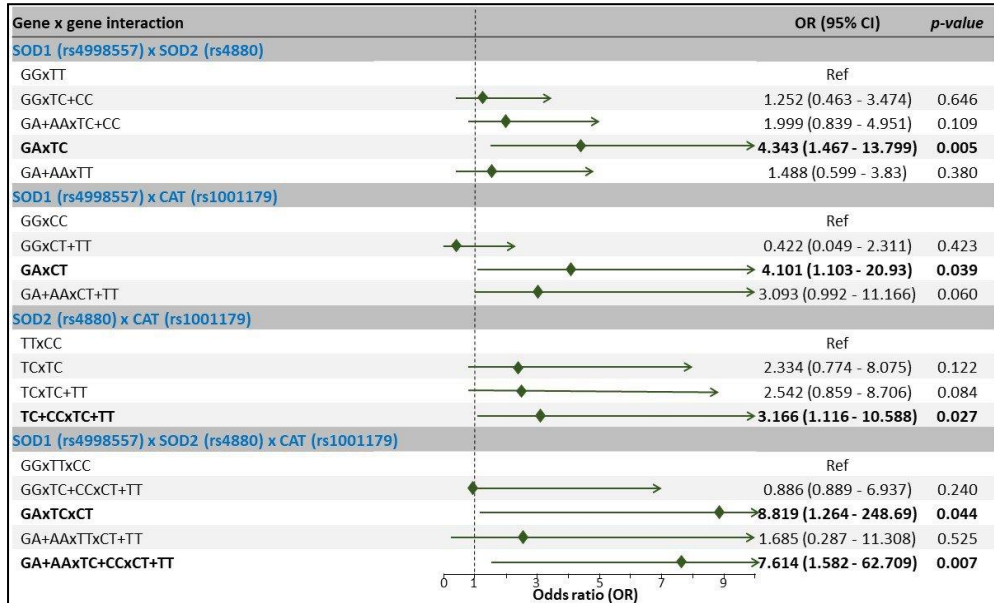
3.4.3.2. Mức độ stress oxy hoá của tinh trùng ở nhóm bệnh nhân nam vô sinh và mối liên quan với đặc điểm di truyền của nhóm gen chống oxy hoá.

Không có sự khác biệt đạt mức ý nghĩa thống kê khi so sánh tần số kiểu gen và tần số allele của các biến thể *SOD1* (rs4998557), *SOD2* (rs4880), *CAT* (rs1001179) và *NOS3* (rs2070744) giữa 2 nhóm vô sinh nam có mức độ stress oxy hoá tinh trùng cao và thấp.

3.4.4. Đánh giá mối liên hệ giữa một số tổ hợp kiểu gen nghiên cứu đến tình trạng vô sinh nam và mức độ stress oxy hoá của tinh trùng.

3.4.4.1. Khảo sát một số tổ hợp kiểu gen của SOD1, SOD2 và CAT giữa nhóm bệnh nhân và nhóm đối chứng.

Dữ liệu từ phân tích thống kê cho thấy những bệnh nhân mang cả 2 kiểu gen ở trạng thái dị hợp tử *SOD1* 7958GA và *SOD2* c.47TC có nguy cơ vô sinh cao hơn 2,5 lần so với người mang gen kiểu dại [$p = 0,006$; OR = 4,343 (1,467 – 13,799)] (Hình 3.11). Những bệnh nhân dị hợp tử ở cả 2 kiểu gen *SOD1* 7958GA và *CAT* -262CT có nguy cơ mắc bệnh cao hơn nhóm người có gen kiểu dại với [$p = 0,039$; OR = 4,101 (1,103 – 20,93)]. Đặc biệt, nguy cơ vô sinh nam ở người mang kiểu gen kết hợp *SOD1* 7958GA/AA, *SOD2* c.47TC/CC và *CAT* -262CT/TT tăng gấp 7 lần so với người mang gen kiểu dại [$p = 0,007$; OR = 7,614 (1,582 – 62,709)]. Ngược lại, hai tổ hợp gen cho thấy giảm nguy cơ vô sinh nam bao gồm tổ hợp gen kiểu dại của *SOD1* 7958 GG và *SOD2* c.47TT, tổ hợp gen kiểu dại của *SOD2* c.47TT và *CAT* -262 CC. Kết quả cụ thể được trình bày trong Hình 3.10.



Hình 3.10. Biểu đồ Forest plot đánh giá mối tương quan giữa một số tổ hợp gen với tình trạng vô sinh nam.

Chú thích: 95% CI: khoảng tin cậy 95%.

3.4.4.2. Tương quan giữa một số tổ hợp kiểu gen của SOD1, SOD2 và CAT với mức độ stress oxy hóa của tinh trùng.

Mối tương quan giữa các tổ hợp kiểu gen của các biến thể thuộc gen *SOD1*, *SOD2* và *CAT* với mức độ stress oxy hoá trong nhóm bệnh nhân vô sinh nam tiếp tục được đánh giá. Các tổ hợp kiểu gen được khảo sát mang các biến thể thuộc các cặp gen *SOD1-SOD2*, *SOD1-CAT*, *SOD2-CAT* hoặc cả ba gen *SOD1-SOD2-CAT*.

Cụ thể, xét tổ hợp 2 gen *SOD1* (rs4998557) và *SOD2* (rs4880), 5 tổ hợp kiểu gen GGxTT, GGxTC+CC, GA+AAxTC+CC, GAxTC, GA+AAxTT được khảo sát. Trong nhóm bệnh nhân có mức độ stress oxy hóa của tinh trùng cao, tần số của các tổ hợp này từ 4,76-42,9% và trong nhóm có mức độ stress oxy hóa tinh trùng thấp thì tần số của các tổ hợp này dao động từ 10,1-39,13%.

Xét tổ hợp 2 gen *SOD1* (rs4998557) và *CAT* (rs1001179), có 4 tổ hợp kiểu gen được khảo sát bao gồm GGxCC, GGxCT+TT, GAxCT và GA+AAxCT+TT. Trong nhóm bệnh nhân có mức độ stress oxy hóa của tinh trùng cao, tần số của các tổ hợp kiểu gen dao động từ 4,76-19%, tần số này trong nhóm có mức độ stress oxy hóa thấp dao động từ 1,4-20,29%.

Xét tổ hợp 2 gen *SOD2* (rs4880) và *CAT* (rs1001179), có 4 tổ hợp kiểu gen được khảo sát bao gồm TTxCC, TCxTC, TCxTC+TT,

TC+CCxCT+TT. Tần số của các tổ hợp kiểu gen này trong nhóm bệnh nhân có mức độ stress oxy hóa tinh trùng cao khá phổ biến, từ 19-42,9%. Trong nhóm bệnh nhân có mức độ stress oxy hóa tinh trùng thấp, tổ hợp chiếm tỉ lệ cao nhất là tổ hợp mang đồng hợp tử kiểu dại của hai gen (44,9%), thấp nhất là TCxTC (7,2%).

Xét tổ hợp 3 gen *SOD1* (rs4998557), *SOD2* (rs4880) và *CAT* (rs1001179), có 4 tổ hợp kiểu gen được khảo sát bao gồm GGxTTxCC, GGcTC+CCxCT+TT, GAxTCxCT, GA+AAxTTxCT+TT. Trong nhóm bệnh nhân có mức độ stress oxy hóa tinh trùng cao, hai tổ hợp kiểu gen có tần số thấp nhất là GA+AAxTTxCT+TT và GGxTTxCC (4,76 %), hai tổ hợp kiểu gen có tần số cao nhất là GGxTC+CCxCT+TT và GAxTCxCT (9,52%). Trong khi đó ở nhóm bệnh nhân có mức độ stress oxy hóa tinh trùng thấp, tổ hợp kiểu gen GA+AAxTTxCT+TT có tần số thấp nhất (4,35%) và tổ hợp kiểu gen GGcTC+CCxCT+TT có tần số cao nhất (11,59%).

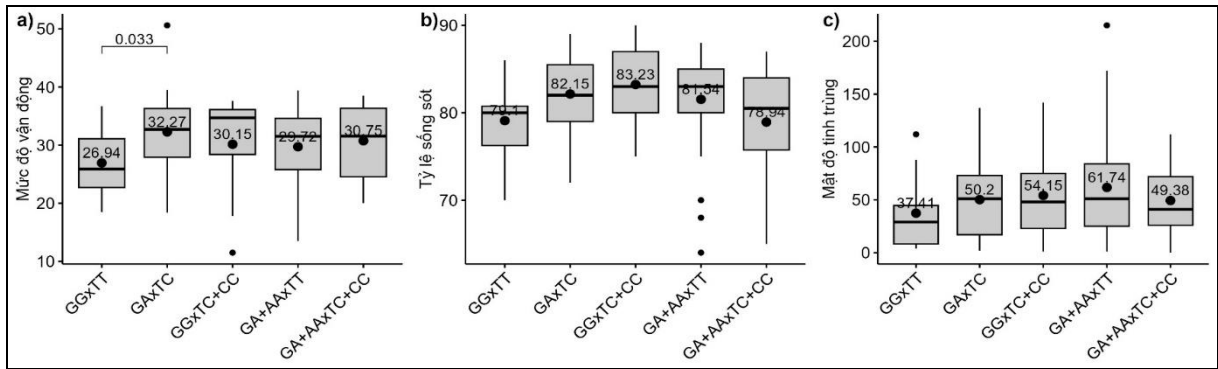
3.4.4.3. Tương quan giữa một số tổ hợp gen chống oxy hóa và đặc điểm lâm sàng của tinh trùng trong nhóm bệnh nhân.

Trong phần này, các tổ hợp gen mang biến thể của *SOD1*, *SOD2* và *CAT* được khảo sát bao gồm: 4 tổ hợp gen của *SOD1* (rs4998557)-*SOD2* (rs4880), 2 tổ hợp gen của *SOD1* (rs4998557)-*CAT* (rs1001179), 2 tổ hợp gen của *SOD2* (rs4880)-*CAT* (rs1001179) và 3 tổ hợp gen của *SOD1* (rs4998557)-*SOD2* (rs4880)-*CAT* (rs1001179).

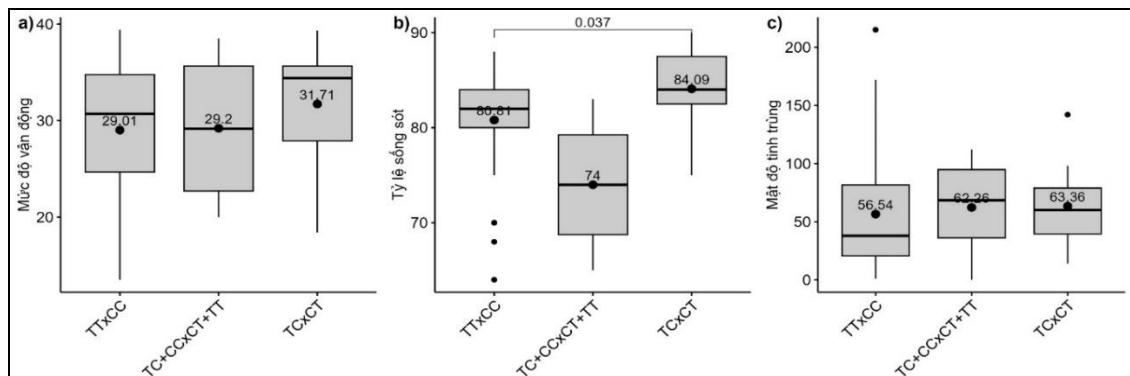
Xét tổ hợp gen bao gồm 2 gen *SOD1* và *SOD2*: so với tổ hợp gen tham chiếu GGxTT, chỉ có thông số độ di động của tinh trùng ở những người mang tổ hợp gen dị hợp tử ở cả 2 gen *SOD1* và *SOD2* là GAxTC là thể hiện sự khác biệt đạt mức ý nghĩa thống kê ($p = 0,032$) (Hình 3.11).

Xét tổ hợp gen bao gồm 2 gen *SOD2* và *CAT*: so với tổ hợp gen tham chiếu TTxCC là tổ hợp gen tham chiếu, tỉ lệ sống của tinh trùng ở nhóm bệnh nhân mang tổ hợp gen TCxCT (84,09%) cao hơn so với nhóm đối chứng (80,81%) ($p = 0,036$) (Hình 3.12).

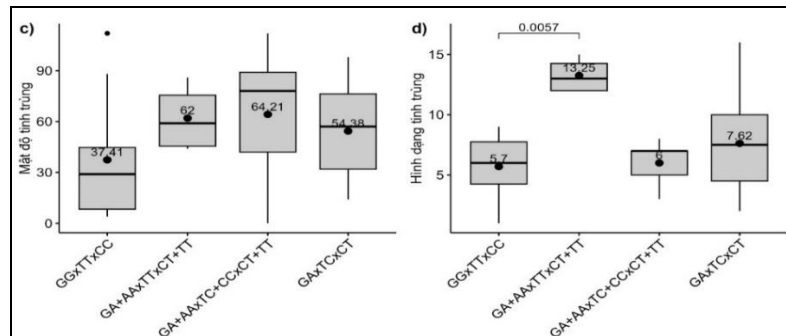
Xét tổ hợp gen bao gồm 3 gen *SOD1*, *SOD2* và *CAT*: tỉ lệ phần trăm hình thái tinh trùng bình thường ở nhóm bệnh nhân mang tổ hợp gen GA+AAxTTxCT+TT cao hơn so với nhóm bệnh nhân mang tổ hợp gen kiểu dại ($p = 0,0057$) (Hình 3.14).



Hình 3.11. Tương quan *SOD1-SOD2* với các thông số của tình trạng



Hình 3.12. Tương quan *SOD2-CAT* với các thông số của tình trạng



Hình 3.14. Tương quan giữa *SOD1-SOD2-CAT* với các thông số của tình trạng.

3.5. Khảo sát tác động các biến thể di truyền và yếu tố BMI đến tình trạng vô sinh nam

Chúng tôi tiếp tục đánh giá mối tác động giữa kiểu gen nguy cơ vô sinh đã được phân tích ở nội dung trước và chỉ số BMI đối với tình trạng vô sinh nam. Trên cơ sở lấy giá trị BMI = 18,5-24,9 là chỉ số bình thường cho người Việt Nam, nhóm bệnh nhân vô sinh nam được phân thành 2 nhóm là BMI thấp/bình thường ($\leq 24,9$) và BMI cao ($> 24,9$).

Các giá trị -2LL, R Square, BIC, AIC của 4 mô hình đều cho thấy tính phù hợp của các mô hình hồi quy nhị phân logistic. Cụ thể giá trị -2LL trong mô hình hồi quy trống đều giảm đi khi đưa các biến độc lập vào mô hình.

Kết quả phân tích hồi quy nhị phân logistic cho thấy kiểu gen *NOS3* -786CT vẫn có tác động đến nguy cơ vô sinh nam ở cả 2 mô hình đánh giá riêng *NOS3* -786CT với BMI ($p = 0,003$) và mô hình đánh giá tất cả 4 biến thể gen cùng với BMI ($p = 0,007$). Trong mô hình đánh giá tác động của kiểu gen dị hợp tử *SOD1* GA và BMI tới vô sinh thì kiểu gen này không có ảnh hưởng đến nguy cơ vô sinh ($p > 0,05$), tuy nhiên khi đánh giá tổng thể cả 4 biến thể gen cùng với yếu tố BMI thì *SOD1* GA vẫn có tác động đến nguy cơ vô sinh nam ($p = 0,049$).

Tuy nhiên chỉ số BMI cao vẫn có tác động đến nguy cơ vô sinh nam ở cả 4 mô hình đánh giá từng biến thể gen và mô hình đánh giá tác động của tất cả 4 biến thể gen nghiên cứu *SOD1*, *SOD2*, *CAT* và *NOS3* ($p < 0,05$).

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Vai trò của biến đổi di truyền trong các gen tham gia con đường chống stress oxy hoá với nguy cơ vô sinh nam

4.1.1. Đa hình gen *SOD1*

Cho đến nay, mặc dù chưa có nghiên cứu nào về ảnh hưởng của đa hình gen *SOD1* đối với vô sinh ở người, nhưng các nghiên cứu trên chuột đã chỉ ra rằng có sự suy giảm khả năng sinh sản ở tinh trùng chuột thiếu hụt *SOD1* hoặc giảm tế bào sinh tinh ở chuột bị chịu tác động của nhiệt độ cao. Nghiên cứu bệnh/chứng của chúng tôi đã xác định được kiểu gen dị hợp tử 7958 GA của gen *SOD1* ở nam giới vô sinh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng, phản ánh kiểu gen dị hợp tử GA có thể là yếu tố nguy cơ gây vô sinh nam. Đây là quan sát đầu tiên rất đáng giá, do tần số của rs4998557A là rất phổ biến ở các khu vực địa lý trên thế giới, đặc biệt cao ở châu Á (52,9% ở Đông Á và 20% ở Tây Á). Tuy nhiên cần tiến hành những khảo sát ở quy mô lớn hơn cũng như trên nhiều quần thể người khác nhau để kiểm chứng lại ảnh hưởng của rs4998557 thuộc gen *SOD1* với vô sinh nam vô căn.

4.1.2. Đa hình gen *SOD2*

Kết quả của nghiên cứu này chỉ ra rằng tần số kiểu gen TT-đồng hợp tử kiểu dại và allele T ở nhóm vô sinh nam thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng, cho thấy vai trò bảo vệ của allele T. Ngược lại, người mang allele C và kiểu gen dị hợp tử TC có nguy cơ vô sinh cao hơn, quan sát này cũng phù hợp với kết quả của những nghiên cứu trước đó. Xu hướng này có thể lý giải thông qua sự giảm hoạt tính một phần của enzyme SOD2 trong ti thể sẽ tạo điều kiện cho sự tích tụ các ROS, từ đó gây mất cân bằng oxy hóa, kết quả là tổn hại đến chất lượng của tinh trùng của những nam giới mang kiểu gen dị hợp tử TC. Như mong đợi, phân tích mô hình di truyền trội của tất cả những người mang allele C (TC+CC/TT) cũng cho thấy mô hình di truyền trội có xu hướng gây vô sinh nam. Tuy nhiên, nghiên cứu này không cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tần số kiểu gen đồng hợp tử đột biến CC giữa hai nhóm bệnh-chứng. Mặc dù không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê, tỉ lệ người mang kiểu gen CC ở nhóm bệnh nhân (7,48%) vẫn cao hơn so với nhóm đối chứng (2,35%). Đáng chú ý là dữ liệu từ nghiên cứu này cho thấy kiểu gen CC là yếu tố nguy cơ làm giảm tỉ lệ sống của tinh trùng trong nhóm bệnh nhân vô sinh nam. Trong đó, tỉ lệ tinh trùng sống ở nhóm bệnh nhân mang kiểu gen CC thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm bệnh nhân mang kiểu gen TT hoặc TC. Như vậy, nguy cơ gây vô sinh nam của allele c.47C có thể liên quan đến giảm chất lượng tinh trùng ở nam giới.

4.1.3. Đa hình gen CAT

Đối với biến thể CAT -262C>T (rs1001179), đây là biến thể nằm ở vùng promoter của gen *CAT*. Một số phân tích cho thấy hoạt tính enzyme CAT cũng giảm rõ rệt ở một số phân nhóm trong nhóm vô sinh nam so với nhóm đối chứng. Với vai trò quan trọng của tinh dịch đối với chức năng của tinh trùng, biểu hiện của enzyme CAT trong tinh dịch được báo cáo là có mối tương quan dương với khả năng di động tiến tới của tinh trùng. Trong giới hạn cỡ mẫu của nghiên cứu là 107 bệnh-85 đối chứng, dữ liệu thống kê không phản ánh mối liên hệ giữa biến thể -262C>T của gen *CAT* với đặc điểm vô sinh và các thông số lâm sàng của tinh trùng cũng như mức độ stress oxy hóa của tinh trùng. Tuy vậy, kiểu gen dị hợp tử -262CT có xu hướng cao hơn trong nhóm bệnh nhân, ngược lại kiểu gen đồng hợp tử -262CC lại có xu hướng cao hơn trong nhóm đối chứng. Trong 107 mẫu bệnh nhân và 85 đối chứng, chỉ có 1 bệnh nhân mang kiểu gen đồng hợp tử đột biến -262TT. Do tần số allele -262T của CAT ở khu vực châu Á và

châu Phi chỉ khoảng 2-3%, xu hướng nói trên có thực sự trái ngược với những công bố trước đó trên người châu Âu và Tây Á (tần số allele -262T của CAT > 20%) hay không cần được kiểm chứng lại với cỡ mẫu lớn hơn. Đồng thời, những dữ liệu không thống nhất về sự ảnh hưởng của biến thể rs1001179 thuộc gen *CAT* đến tình trạng vô sinh nam và chất lượng tinh trùng nên tiếp tục khảo sát rộng trên nhiều quần thể người khác nhau.

4.1.4. Đa hình gen *NOS3*

Các biến thể di truyền của gen *NOS3* có thể liên quan đến bất thường hình thái tinh trùng. Các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng allele *NOS3* -786C có liên quan đến chất lượng tinh dịch kém ở người Iran hoặc tăng nguy cơ phân mảnh DNA tinh trùng và vô sinh nam ở nam giới Trung Quốc.

Về mặt cơ chế, *NOS3* là enzyme quan trọng xúc tác cho quá trình tổng hợp nên NO, đây là một chất chống oxy hoá quan trọng vì chất này giúp giảm sự hình thành của các ion âm superoxide. Tuy nhiên, tình trạng dư thừa NO cũng là nguyên nhân gây nên tình trạng stress oxy hoá. Cụ thể, nồng độ NO ở mức độ sinh lý sẽ bảo vệ các mô khỏi sự tổn thương gây nên bởi stress oxy hoá, trong khi đó NO ở nồng độ cao lại kích hoạt sự phá huỷ DNA của tinh trùng và quá trình tự chết của các tế bào sinh dục nam. Dựa trên cơ chế này, chúng tôi giả định rằng, sự thay thế -786C>T tại vùng promoter của *NOS3* làm giảm biểu hiện của enzyme *NOS3*. Do đó những người mang allele kiểu dại -786C có sự tích tụ NO cao hơn so với người có kiểu gen đồng hợp tử -786TT từ đó gây mất cân bằng oxy hóa.

Quan sát thấy tần số kiểu gen dị hợp tử *NOS3* -786 CT và allele -786C ở nhóm bệnh nhân cao hơn so với nhóm đối chứng, cho thấy kiểu gen dị hợp tử CT và allele C là yếu tố tăng nguy cơ vô sinh nam. Đa hình *NOS3* -786 C>T không thể hiện mối liên quan có ý nghĩa thống kê với các thông số của tinh trùng. Trong tương lai, cần quan tâm làm rõ biến thể *NOS3* -786C>T có tác động đến thông số nào của tinh trùng ở những trường hợp vô sinh nam vô căn và có sự khác biệt giữa những trường hợp chịu mức stress oxy hóa cao-thấp khác nhau hay không. Ngoài ra, việc kiểm chứng ảnh hưởng của biến thể -786C>T cần được tiến hành trên mẫu tinh dịch của những người mang biến thể này thông qua đánh giá mức độ biểu hiện của *NOS3*.

Một giới hạn trong nghiên cứu này là mối liên hệ giữa các biến thể di truyền của các gen nghiên cứu với một thông số quan trọng của tinh trùng

là mức độ phân mảnh DNA chưa được khảo sát do hạn chế của phòng thí nghiệm. Mặt khác khi đối chiếu với dữ liệu về mức độ stress oxy hóa trong 90 bệnh nhân vô sinh nam thì lại không có mối liên hệ nào giữa các biến thể di truyền cũng như tổ hợp các biến thể gen với stress oxy hóa của tinh trùng. Ảnh hưởng của mức độ stress oxy hóa đến độ phân mảnh của tinh trùng do đó cũng chưa có điều kiện để khảo sát trong nhóm bệnh nhân tham gia nghiên cứu. Như vậy đây là một nội dung quan trọng cần triển khai trong những thiết kế nghiên cứu sau nhằm làm sáng tỏ mối liên quan trực tiếp của những biến thể di truyền đến chất lượng tinh trùng, mà đó có thể là yếu tố ảnh hưởng đến sức khỏe sinh sản của nam giới.

4.2. Tương tác qua lại giữa các nhóm gen chống oxy hoá trong mối liên quan với mức độ stress oxy hoá và tình trạng vô sinh nam

Tương tác qua lại giữa các đa hình của những gen liên quan đến chống oxy hóa có thể ảnh hưởng đến vô sinh nam. Về sự đa hình của ba gen *SOD1*, *SOD2* và *CAT* trong nghiên cứu này, sau khi phân tích dữ liệu đơn gen, phân tích theo hướng kết hợp những tổ hợp kiểu gen có xu hướng gây vô sinh nam cũng đã thu được một số kết quả nhất định. Chúng tôi nhận thấy rằng bệnh nhân mang cả hai kiểu gen *SOD1* 7958 GA và *SOD2* c.47TC, bệnh nhân có kiểu gen *SOD1* 7958GA × *CAT* -262 CT, và những bệnh nhân có kiểu gen *SOD1* 7958GA/AA × *CAT* -262CT/TT đều tăng nguy cơ vô sinh nam. Đặc biệt, tổ hợp gen *SOD1* 7958GA/AA, *SOD2* c.47TC/CC và *CAT* -262CT/TT có nguy cơ vô sinh cao hơn gần 8 lần so với người mang tổ hợp gen kiểu dại. Đáng chú ý, tổ hợp kiểu gen dị hợp tử của cả ba gen *SOD1*, *SOD2*, *CAT* là GAxTCxCT có nguy cơ vô sinh cao nhất trong số các tổ hợp gen đã khảo sát (OR = 8,819). Khi kết hợp đánh giá tổ hợp các kiểu gen nguy cơ, dữ liệu thu được sẽ mang dấu ấn cá thể và có ý nghĩa dự đoán cao hơn khi đánh giá riêng lẻ từng biến thể di truyền.

Như vậy, kết quả trên đưa ra gợi ý quan trọng cho những hình thức tư vấn di truyền liên quan đến các gen chống oxy hoá trong các trường hợp vô sinh nam không rõ nguyên nhân. Trong điều kiện cho phép, những yếu tố di truyền liên quan đến vô sinh nam vô căn cần được đánh giá một cách tổng thể vì yếu tố di truyền nguy cơ ở mỗi người bệnh có thể không hoàn toàn tương tự nhau.

4.3. Tầm quan trọng của dấu ấn phân tử liên quan đến stress oxy hoá/vô sinh nam và phương hướng áp dụng trong điều trị vô sinh nam vô căn

Trong thụ thai tự nhiên, chất lượng tinh trùng có liên quan chặt chẽ đến tỉ lệ mang thai thành công, qua đó có thể thấy nếu cải thiện chức năng và sức sống của tinh trùng bằng cách bổ sung các chất chống oxy hoá sẽ tạo hiệu quả tích cực trong thụ tinh thành công. Tổng kết mới nhất của thư viện Cochrane trên các nghiên cứu có chất lượng tốt đã kết luận rằng việc bổ sung các chất chống oxy hoá ở các bệnh nhân nam vô sinh đã làm tăng tỉ lệ sinh con từ 12% lên 14-26% (tăng từ 1,2-2,1 lần).

Can thiệp hỗ trợ sinh sản (Assisted reproductive technique-ART) là một lựa chọn hỗ trợ điều trị cho các cặp vợ chồng được xác định là vô sinh và tính khả dụng của các phương pháp ART đã liên tục tăng lên với tốc độ từ 2,4-18,3% mỗi năm ở châu Âu, Úc và New Zealand trong giai đoạn 2012-2016. Stress oxy hóa là một yếu tố có ảnh hưởng quan trọng đến hiệu quả của các phương pháp ART. Trong điều kiện thực hiện ART, các tế bào trứng và tinh trùng đã không còn ở trong môi trường tự nhiên và trở nên nhạy cảm hơn với sự có mặt của các ROS, do lúc này hàng rào chống oxy hoá đã mất đi phần nào. Ba phân tích tổng hợp đã báo cáo mối liên hệ giữa sự tăng mức độ phân mảnh tinh trùng với việc giảm tỉ lệ mang thai sau khi sử dụng các phương pháp tiêm tinh trùng vào tử cung (intrauterine insemination-IUI) và thụ tinh nhân tạo (in vitro fertilization-IVF). Trong môi trường phòng thí nghiệm được thiết lập để thực hiện các phương pháp ART, một số yếu tố có thể góp phần gây nên tăng sản sinh các ROS có thể bắt nguồn từ phôi hoặc những yếu tố ngoại sinh như lượng O_2 trong không khí, nhiệt độ, độ ẩm, các vật dụng thiết bị sử dụng, chất lượng môi trường nuôi cấy phôi, ống bảo quản phôi đông lạnh. Bởi vậy, chiến lược nhằm làm giảm stress oxy hóa thường hướng đến hạn chế sản sinh các ROS hoặc tăng cường khả năng chống oxy hóa, từ đó hỗ trợ kiểm soát mất cân bằng oxy hóa trong ART.

Tuy nhiên cho tới nay, bằng chứng về mối liên hệ trực tiếp giữa đa hình nhóm gen chống oxy hóa với hiệu quả can thiệp ART như tỉ lệ mang thai thành công, tỉ lệ sinh vẫn còn rất hạn chế. Những bằng chứng tích lũy bởi nhiều nhóm nghiên cứu trên nhiều quần thể đã cho thấy mối liên hệ giữa các biến thể thuộc nhóm gen chống oxy hóa với tình trạng vô sinh nam, chất lượng tinh trùng, stress oxy hóa. Việc bổ sung thông tin về dữ liệu đa dạng di truyền nhóm gen quan trọng này kèm theo tỉ lệ thành công của các ca ART sẽ là những cơ sở khoa học quan trọng để từ đó sử dụng các dấu ấn phân tử làm một phần căn cứ trong công tác hỗ trợ sinh sản.

Trong tương lai, cần những nghiên cứu thuần tập lớn cùng với kết hợp nghiên cứu nhiều quần thể người từ đa trung tâm nhằm tiếp tục khám phá những biến thể gen của nhóm gen chống oxy hóa là nguy cơ tiềm ẩn của vô sinh ở nam giới.

4.4. Những giới hạn trong sàng lọc đa hình gen chống oxy hóa liên quan tới vô sinh nam vô căn và xu hướng khắc phục

Trong lĩnh vực vô sinh nam, hiện nay chưa có nghiên cứu tổng thể nào được tiến hành để đánh giá tác động của yếu tố di truyền ngoại gen lên biểu hiện của nhóm gen chống oxy hóa. Đây sẽ là hướng tiếp cận quan trọng trong tương lai, nhằm đào sâu thông tin và khai thác toàn diện bộ dữ liệu về hệ gen chịu trách nhiệm chống oxy hóa và cơ chế liên quan đến vô sinh nam nói riêng cũng như cơ chế gây nên nhiều bệnh tật khác. Phân tích toàn bộ hệ gen mã hóa được dự đoán sẽ là cách tiếp cận khả thi do chi phí phù hợp, độ tin cậy cao với lượng dữ liệu lớn về toàn bộ các vùng mã hóa đặc biệt bao gồm cả các biến thể mới. Với mức độ phức tạp về tình trạng vô sinh nam và nhóm đa dạng các gen chống oxy hóa, nên cần nhắc hướng sàng lọc này đối với con cháu của các gia đình có tiền sử hiếm muộn. Hệ thống chống oxy hóa của cơ thể có vai trò phối hợp phức tạp để thực hiện chức năng, do đó việc khảo sát các biến thể gen riêng rẽ không có ý nghĩa thuyết phục vì một gen đơn lẻ không chắc chắn mang tính quyết định tới kiểu hình. Cần tiến hành nghiên cứu GWAS tập trung vào các gen nằm trong các con đường tín hiệu bảo vệ cơ thể khỏi stress oxy hóa.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

1. Đã khảo sát tần số kiểu gen, tần số allele của các biến thể thuộc 4 gen *SOD1* 7958G>A, *SOD2* c.47T>C, *CAT* -262C>T và *NOS3* -786C>T trong nhóm 107 bệnh nhân vô sinh nam vô căn và 85 mẫu đối chứng.

2. Đã xác định được mức độ stress oxy hoá của các mẫu tinh dịch của 90 nam giới thiếu tinh năng: có 21/90 (23,3%) mẫu có mức độ stress oxy hoá cao và 86/90 (76,7%) mẫu có mức độ stress oxy hoá thấp. Mức độ stress oxy hoá cao có mối liên hệ với giảm tổng số tinh trùng trong tinh

dịch ở nhóm bệnh nhân vô sinh nhưng độc lập với các thông số khác về cấu trúc và chất lượng tinh trùng.

3.Xác định được mối liên hệ giữa đa hình các gen chống oxy hoá đối với tình trạng vô sinh nam nguyên phát.

4.Xác định được các tổ hợp gen chống oxy hoá là nguy cơ vô sinh nam.

Kiến nghị

1.Cần tiếp tục triển khai những nghiên cứu bổ sung trên quy mô mẫu lớn tập trung vào nhóm gen chống oxy hóa chưa được khảo sát ở người Việt Nam. Đồng thời, mối liên hệ giữa yếu tố di truyền với mức độ phân mảnh tinh trùng trên bệnh nhân vô sinh cũng cần được quan tâm nghiên cứu.

2.Cơ chế ảnh hưởng đến nguy cơ vô sinh nam của biến thể *SOD1* 7958G>A có thể liên quan đến sự thay đổi chức năng của enzyme SOD1 và cần được làm rõ trong những mô hình nghiên cứu chức năng phù hợp.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Huy Anh Bach**, Phuong Nhung Vu, Thi Huyen Thuong Ma, Hai Ha Nguyen, Phan Tran Duc, Duc Bui Minh, Van Hai Nong, Dang Ton Nguyen (2023) Genetic variations of antioxidant genes and their association with male infertility in Vietnamese men. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, DOI: 10.1002/jcla.24829.
2. Lê Thị Quyên, **Bạch Huy Anh**, Trần Đức Phấn, Nguyễn Thị Trang (2021) Khảo sát đa hình gen *SOD2* C47T và *CAT* C262T ở nam giới vô sinh nguyên phát. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 507(2):119-123.
3. **Bạch Huy Anh**, Trần Văn Khôi, Trần Đức Phấn, Lê Thị Minh Phương, Lê Thị Quyên, Vũ Thị Huyền, Nguyễn Thị Trang (2020) Nghiên cứu đa hình gen *SOD1* ở nam giới vô sinh nguyên phát. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 493, tháng 8, số 2.