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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hà Nội - 2024

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1

PGS.TS. Nguyễn Đăng Tôn

Người hướng dẫn 2

PGS.TS. Trần Đức Phấn

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Bạch Huy Anh, nghiên cứu sinh khoa Công nghệ sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, khóa 2018, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của PGS.TS. Nguyễn Đăng Tôn và PGS.TS. BS. Trần Đức Phấn.

2. Những kết quả thu được của luận án là mới, trung thực, chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác, được tài trợ một phần bởi Quỹ Phát triển Khoa học & Công nghệ Quốc gia (nhiệm vụ: 108.02-2019.05) và nhận hỗ trợ một phần từ đề tài cấp Bộ: "Nghiên cứu xác định đột biến/đa hình gen chuyển hóa xenobiotics ứng dụng trong chẩn đoán vô sinh nam". Chủ nhiệm đề tài: PGS. TS. Trần Đức Phấn, Bộ môn Y sinh học – Di truyền, Đại học Y Hà Nội.

3. Các kết quả công bố chung đã được cán bộ hướng dẫn và các đồng tác giả cho phép sử dụng trong luận án.

Hà Nội, ngày 03 tháng 03 năm 2024

Nghiên cứu sinh

Bạch Huy Anh

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, tôi xin được bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới: PGS.TS. Nguyễn Đăng Tôn, Trưởng phòng Phân tích hệ gen - Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và PGS. TS. BS. Trần Đức Phấn - Nguyên Chủ nhiệm Bộ môn Y sinh học – Di Truyền, Trường Đại học Y Hà Nội đã hướng dẫn, định hướng và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu cũng như thực hiện luận án.

Tôi xin được cảm ơn sự hỗ trợ, giúp đỡ, ủng hộ và tham gia nhiệt tình của các cán bộ thuộc Phòng Phân tích hệ gen - Viện Nghiên cứu hệ gen; và các cán bộ của Bộ môn Y sinh học-Di truyền, Trường đại học Y Hà Nội trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo Bệnh viện Bưu điện, cán bộ khoa Hỗ trợ sinh sản đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi về mọi mặt để hỗ trợ tôi thực hiện và hoàn thành chương trình học tập, cũng như luận án.

Tôi xin cảm ơn Ban Giám đốc và các cán bộ, giảng viện Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn Bộ phận Đào tạo - Viện Nghiên cứu hệ gen đã tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Đặc biệt nghiên cứu sinh bày tỏ lòng biết ơn vô hạn đối với gia đình: bố, mẹ, anh em, vợ, con và bạn bè đồng nghiệp đã luôn tin tưởng hỗ trợ-đây là nguồn động viên tinh thần lớn lao đối với tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu, hoàn thành luận án.

Hà Nội, ngày 03 tháng 03 năm 2024

Nghiên cứu sinh

Bạch Huy Anh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN i
LỜI CẢM ƠN ii
MỤC LỤC iii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT vi
DANH MỤC BẢNG vii
DANH MỤC HÌNH ix
MỞ ĐẦU 1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 5
1.1. Khái niệm vô sinh nam 5
1.2. Khái quát tình hình vô sinh và vô sinh nam tại Việt Nam 5
1.3. Những nguyên nhân bệnh sinh và yếu tố nguy cơ của vô sinh nam 6
1.3.1. Nguyên nhân không do di truyền 6
1.3.2. Nguyên nhân di truyền 7
1.3.3. Ảnh hưởng từ yếu tố di truyền ngoại gen 14
1.3.4. Đặc điểm lối sống và ảnh hưởng của môi trường 16
1.4. Stress oxy hóa và vô sinh nam 18
1.4.1. Ảnh hưởng của stress oxy hóa đến tình trạng vô sinh nam 18
1.4.2. Nguồn gốc của các ROS 20
1.4.3. Đa dạng di truyền một số gen chống oxy hóa liên quan đến vô sinh nam 24
1.5. Tình hình nghiên cứu bệnh vô sinh nam tại Việt Nam và trên thế giới 34
1.5.1. Những hướng nghiên cứu về nguyên nhân di truyền của bệnh vô sinh nam trên thế giới 34
1.5.2. Những hướng nghiên cứu về vô sinh nam tại Việt Nam 38
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 40
2.1. Đối tượng nghiên cứu và thời gian nghiên cứu 40
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu 40
2.1.2. Xây dựng phiếu thu thập thông tin nghiên cứu 40
2.1.3. Thời gian và địa điểm tiến hành nghiên cứu 42

2.1.4. Tiêu chuẩn chọn mẫu nghiên cứu 43
2.2. Thiết kế nghiên cứu và cỡ mẫu nghiên cứu 43
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu 43
2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu 43
2.3. Dụng cụ và hóa chất trong nghiên cứu 44
2.3.1. Dụng cụ được sử dụng trong nghiên cứu 44
2.3.2. Hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu 45
2.4. Phương pháp nghiên cứu 45
2.4.1. Xác định mức độ stress oxy hóa của mẫu tinh dịch 48
2.4.2. Tách chiết và xác định nồng độ DNA tổng số 49
2.4.3. PCR khuếch đại đặc hiệu các đoạn gen chứa biến thể quan tâm 51
2.4.4. Giải trình tự Sanger 52
2.5. Phân tích số liệu nghiên cứu 54
2.5.1. Phân tích kết quả giải trình tự Sanger 54
2.5.2. Phân tích thống kê 54
2.6. Đạo đức trong nghiên cứu 55
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU 56
3.1. Đặc điểm nhân khẩu học và các chỉ số lâm sàng của đối tượng nghiên cứu 56
3.2. Xác định mức độ stress oxy hoá của mẫu tinh dịch 59
3.3. Xác định các đa hình của một số gen chống oxy hóa 61
3.3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số và khuếch đại các đoạn gen chứa biến thể quan tâm 61
3.3.2. Phân tích biến thể gen của các đối tượng nghiên cứu 63
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. 70
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 70
3.4.2. Mối tương quan giữa đặc điểm di truyền và đặc điểm lâm sàng của tinh trùng ở nhóm bệnh nhân vô sinh nam. 73
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. 76

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..... 79
3.5. Khảo sát tác động các biến thể di truyền và yếu tố BMI đến tình trạng vô sinh nam 92
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN 96
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 96
4.1.1. Đa hình gen SOD1 96
4.1.2. Đa hình gen SOD2 97
4.1.3. Đa hình gen CAT 98
4.1.4. Đa hình gen NOS3 100
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 103
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..... 104
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 110
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 113
Kết luận 113
Kiến nghị 114
CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN..... 115
TÀI LIỆU THAM KHẢO 116
PHỤ LỤC 132

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Tên viết tắt	Tên đầy đủ tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
aa	Amino acid	
BMI	Body mass index	Chỉ số khối cơ thể
CAT	Catalase	
CNV	Copy number variant	Biến thể số bản sao
CSDL		Cơ sở dữ liệu
DMSO	Dimethyl sulfoxit	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	
ESE	Exonic Splicing Enhancers	
GPX	Glutathion peroxidase	
GST	Glutathion S-transferase	
GSTM1	Glutathione S-transferase Mu 1	
GSTT1	Glutathione S-Transferase Theta 1	
HET	Heterozygous	Dị hợp tử
HOM	Homozygous	Đồng hợp tử
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	
NGS	Next generation sequencing	Giải trình tự gen thế hệ mới
NOS	Nitric Oxide Synthase	
NOX5	NADPH oxydase	NADPH oxy hóa
NST		Nhiễm sắc thể
OR		Tỉ số nguy cơ
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi khuếch đại
PRX	Peroxydoxin	
qPCR	Quantitative PCR	PCR định lượng
ROS	Reactive oxygen species	Stress oxy hoá
RI	Reliability index	Chỉ số tin cậy
RG	Reaction gel	Gel phản ứng
RNA	Ribonucleic acid	
SNP	Single nucleotide polymorphism	Đa hình đơn nucleotide
SOD	Antioxidants-Related Superoxide Dismutase	
TRX	Thioredoxin	
WES	Whole exome sequencing	Giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các enzyme chống oxy hóa chính trong quá trình sinh tinh 26

Bảng 1.2. Những biến thể di truyền thuộc các gen mã hóa cho enzyme chống oxy hóa liên quan đến vô sinh nam 33

Bảng 2.1. Các chỉ số đánh giá chất lượng tinh trùng (Theo WHO 2010) 42

Bảng 2.2. Trình tự mồi sử dụng cho khuếch đại các đoạn gen mang biến thể thuộc *SOD1*, *SOD2*, *CAT* và *NOS3* 51

Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR giải trình tự 53

Bảng 3.1. Đặc điểm nhân khẩu học của các mẫu nghiên cứu 57

Bảng 3.2. Mức độ stress oxy hoá của các mẫu tinh trùng trong nhóm vô sinh nam 59

Bảng 3.3. Tần số allele và tần số kiểu gen của biến thể *SOD1* 7958 G>A (rs4998557) 64

Bảng 3.4. Tần số allele và tần số kiểu gen của biến thể *SOD2* c.47 T>C (rs4880) 65

Bảng 3.5. Tần số allele và tần số kiểu gen của biến thể *CAT* -262C>T (rs1001179)..... 68

Bảng 3.6. Tần số allele và tần số kiểu gen của biến thể *NOS3* -786C>T (rs2070744) 69

Bảng 3.7. Phân bố của các SNP (*SOD1* 7958G>A, *SOD2* c.47T>C, *CAT* -262C>T và *NOS3* -786C>T) trong nhóm bệnh nhân vô sinh nam và nhóm đối chứng..... 72

Bảng 3.8. Mối tương quan giữa đặc điểm của tinh trùng với kiểu gen ở nhóm bệnh nhân vô sinh nam 74

Bảng 3.9. Phân bố kiểu gen và allele của các gen *SOD1*, *SOD2*, *CAT* và *NOS3* .. 78

Bảng 3.10. Phân bố của các tổ hợp kiểu gen ở nhóm vô sinh nam và nhóm đối chứng 80

Bảng 3.11. So sánh tỉ suất chênh của các kiểu gen và tổ hợp gen tiềm năng liên quan đến nguy cơ vô sinh nam..... 83

Bảng 3.12. Sự phân bố của các tổ hợp kiểu gen ở giữa hai nhóm bệnh nhân vô sinh nam có mức độ stress oxy hoá tinh trùng cao và thấp 85

Bảng 3.13. Phân tích đa biến mối liên hệ giữa đa hình gen *SOD1* và yếu tố BMI với tình trạng vô sinh nam..... 93

Bảng 3.14. Phân tích đa biến mối liên hệ giữa đa hình gen *SOD2* và yếu tố BMI với tình trạng vô sinh nam..... 93

Bảng 3.15. Phân tích đa biến mối liên hệ giữa đa hình gen *NOS3* và yếu tố BMI với tình trạng vô sinh nam..... 94

Bảng 3.16. Phân tích đa biến mối liên hệ giữa các đa hình gen *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *NOS3* và yếu tố BMI với tình trạng vô sinh nam 94

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Mất đoạn trên nhiễm sắc thể Y trong vô sinh nam 13
Hình 1.2. Tóm tắt một số yếu tố góp phần gây stress oxy hoá ở tinh trùng người.20
Hình 1.3. Tiềm năng của NOX5 trong điều chỉnh khả năng thụ tinh của tinh trùng. 24
Hình 1.4. Một số enzyme chống oxy hóa quan trọng đối với quá trình sinh tinh. 26
Hình 1.5. Liên hệ giữa các enzyme chống oxy hoá, stress oxy hoá và vô sinh nam 29
Hình 2.1. Sơ đồ chi tiết thực hiện nghiên cứu..... 47
Hình 2.2. Các mức cường độ màu của stress oxy hóa. 49
Hình 3.1. Ảnh hưởng của BMI và uống rượu đến tình trạng vô sinh nam..... 58
Hình 3.2. Kết quả tách chiết DNA tổng số từ các mẫu máu. 62
Hình 3.3. Ảnh điện di sản phẩm PCR đặc hiệu các đoạn gen *SOD1*, *SOD2*, *CAT* và *NOS3*. 63
Hình 3.4. Kết quả giải trình tự xác định biến thể *SOD1* 7958G>A (rs4998557) .. 64
Hình 3.5. Kết quả giải trình tự xác định biến thể *SOD2* c.47 T>C (rs4880)..... 66
Hình 3.6. Kết quả giải trình tự xác định biến thể *CAT* -262C>T (rs4880)..... 68
Hình 3.7. Kết quả giải trình tự xác định biến thể *NOS3* -786C>T (rs4880) 70
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. 75
Hình 3.9. Mối liên hệ giữa thông số của tinh trùng trong nhóm bệnh nhân với mức độ stress oxy hóa..... 77
Hình 3.10. Biểu đồ Forest plot đánh giá mối tương quan giữa một số tổ hợp gen với tình trạng vô sinh nam..... 82
Hình 3.11. Tương quan *SOD1-SOD2* với các thông số của tinh trùng 88
Hình 3.12. Tương quan *SOD1-CAT* với các thông số của tinh trùng..... 89
Hình 3.13. Tương quan *SOD2-CAT* với các thông số của tinh trùng..... 90
Hình 3.14. Tương quan giữa *SOD1-SOD2-CAT* với các thông số của tinh trùng. 91

MỞ ĐẦU

Khái quát chung

Vô sinh (infertility) là tình trạng các cặp nam nữ mất hay giảm khả năng sinh sản, trong đó nam và nữ đóng vai trò như nhau. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), trong số các cặp vợ chồng ở độ tuổi sinh sản gặp vấn đề về việc sinh con thì khoảng 30 - 40% do nam giới, 40% do nữ giới, 10% do cả nam và nữ, 10% không rõ nguyên nhân. Xu hướng vô sinh ngày càng cao, để điều trị khắc phục cần chẩn đoán xác định rõ nguyên nhân. Mặc dù đã có nhiều tiến bộ trong chẩn đoán xác định nguyên nhân vô sinh, nhưng tỷ lệ vô sinh không rõ nguyên nhân vẫn còn khoảng hơn 10%.

Ngày nay, lĩnh vực di truyền y học phát triển đã phát triển mạnh mẽ; có nhiều kỹ thuật xác định được các nguyên nhân di truyền gây vô sinh mà trước đây được cho là vô sinh không rõ nguyên nhân, các xét nghiệm này đã và đang góp phần định hướng cho can thiệp và điều trị. Trong khoảng 10 năm trở lại đây, các nước trên thế giới bắt đầu nghiên cứu ảnh hưởng ảnh hưởng của stress oxy hóa lên chức năng của cơ thể. Các stress oxy hóa là hậu quả của sự mất cân bằng giữa sự hình thành các gốc tự do có oxy và cơ chế đề kháng oxy hóa của cơ thể. Stress oxy hoá được xem là có liên quan đến nguyên nhân của nhiều bệnh lý ở người như ung thư, xơ vữa động mạch, tiểu đường, tổn thương gan, đục thủy tinh thể, bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson và nhiều bệnh khác. Nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng stress oxy hóa cũng liên quan phần lớn đến tốc độ của quá trình lão hóa, được định nghĩa là sự tích tụ dần các tổn thương cơ bản. Đặc biệt trên hệ sinh sản nói chung và của nam giới nói riêng, các nhà khoa học đã chứng minh các chất oxy hóa gây tác động bất lợi trên cả cấu trúc và chức năng của tinh trùng.

Luận giải về tính cấp thiết của vấn đề nghiên cứu

Việc nghiên cứu toàn diện những dấu ấn phân tử nhằm đánh giá chất lượng tinh dịch, kết hợp với phương hướng và chiến lược điều trị phù hợp đối với những tình trạng khiếm khuyết tinh trùng trở thành yếu tố quyết định nhằm khắc phục những vấn đề trong sức khoẻ sinh sản của nam giới. Trong số đó, các dấu ấn về stress oxy hoá nổi bật là yếu tố liên quan đến khả năng sinh sản của nam giới vì chúng đóng vai

trò quan trọng trong sinh lý của tinh trùng. 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.

Cho tới nay, những nghiên cứu về vô sinh nam ở Việt Nam đã được tiến hành ở khá nhiều cơ sở nghiên cứu và đào tạo. Những đặc điểm then chốt có nguy cơ gây bệnh đã được làm rõ như tuổi cao, nghề nghiệp hay chất lượng cuộc sống của nam giới. Bên cạnh đó những khảo sát về các biến thể di truyền trực tiếp gây vô sinh nam thông qua cơ chế ảnh hưởng đến cấu trúc cơ quan sinh sản và hình dáng/chất lượng tinh trùng cũng đã đạt được khá nhiều kết quả. Tuy nhiên, 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. Cần cập nhật dữ liệu đa hình di truyền của nhóm gen nói trên, đây 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.

Cơ sở khoa học lựa chọn các nhóm gen nghiên cứu

Các gen *SOD1, SOD2*, *NOS3* và *CAT* mã hoá cho những enzyme xúc tác cho phản ứng khử các ion âm superoxide (O_2^-) thành H_2O_2 và phản ứng tạo thành NO từ L-arginine, đều nằm trong chu trình quan trọng bảo vệ tế bào khỏi tình trạng stress oxy hoá. Cho tới nay, đã có nhiều công bố quốc tế báo cáo mối liên quan giữa các biến thể di truyền của các gen chịu trách nhiệm chống oxy hóa như *SOD*, *NOS* và *CAT* với vô sinh ở nam giới trên nhiều quần thể người khác nhau. Kết quả đã cho thấy một số biến thể gen là nguy cơ của tình trạng này, trong đó có các biến thể đã được quan tâm nghiên cứu như *SOD2* (rs4880), *CAT* (rs1001179) và *NOS3* (rs2070744) có liên quan đến tình trạng vô sinh hay mật độ/độ phân mảnh DNA tinh

trùng. Các mô hình động vật đều cho thấy một kết quả thống nhất là thiếu hụt enzyme SOD1 gây nên tình trạng vô sinh ở chuột đực. Tính đến thời điểm này, thông tin về mối liên hệ giữa yếu tố di truyền mã hoá cho các thành phần quan trọng trong hệ thống chống stress oxy hoá bao gồm *SOD1, SOD2, CAT* và *NOS3* với nguy cơ vô sinh nam tại Việt Nam vẫn còn bỏ ngỏ.

Mục tiêu nghiên cứu:

- Xác định được tỷ lệ đa hình ở một số gen chống oxy hoá ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh ở nam giới vô sinh nguyên phát.
- Xác định được mức độ stress oxy hoá trong tinh dịch ở nam giới vô sinh nguyên phát.
- Xác định được mối liên quan giữa các biến đổi gen chống oxy hoá với vô sinh nam.

Cách tiếp cận nghiên cứu:

Trong nghiên cứu này, 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.

Chỉ số phân tích tinh trùng của cả nhóm bệnh nhân và đối chứng được thu thập thông qua xét nghiệm tinh dịch đồ. Tiêu chuẩn đánh giá chất lượng tinh trùng được phân tích theo Tổ chức Y tế thế giới 2010 (World Health Organization-WHO). Mức độ stress oxy hoá trong các mẫu tinh dịch của nhóm bệnh nhân cũng được xác định bằng phương pháp oxysperm. Các biến thể di truyền được lựa chọn trong nghiên cứu này bao gồm: gen *SOD1* (rs4998557), *SOD2* (rs4880), *CAT* (rs1001179) và *NOS3* (rs2070744). Phương pháp giải trình tự Sanger được áp dụng để xác định 4 biến thể gen nói trên ở tất cả các mẫu nghiên cứu. Dữ liệu thu được tiếp tục được phân tích bằng các phương pháp thống kê sinh học để khảo sát mối tương quan giữa đặc điểm di truyền/tổ hợp kiểu gen với đặc điểm vô sinh cũng như các chỉ số quan trọng của

tinh trùng giữa nhóm bệnh và nhóm chứng. Trong nhóm bệnh nhân, mối liên hệ giữa sự phân bố của các kiểu gen/allele với đặc điểm lâm sàng của tinh trùng và mức độ stress oxy hóa cũng được phân tích.

Những đóng góp mới của luận án:

- Đã xác định được các biến thể các gen *SOD1*: 7958G>A, *SOD2*: c.47T>C, *CAT*: -262C>T có vai trò trong yếu tố tăng nguy cơ gây vô sinh nam.

- Đã xác định được các biến thể gen *SOD2*: 7958 G>A và *NOS3*: -786C>T là yếu tố đóng vai trò bảo vệ khỏi nguy cơ gây nguyên nhân bệnh vô sinh nam.

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 [1].

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 [2].

Vô sinh nam là vô sinh mà nguyên nhân do nam giới, người vợ có thể bình thường hoặc cũng bị vô sinh. Vô sinh không rõ nguyên nhân là các trường hợp vô sinh mà thăm khám lâm sàng và làm các xét nghiệm kinh điển ở cả vợ và chồng vẫn không phát hiện được nguyên nhân. Trong vô sinh nam, nguyên nhân do bất thường về số lượng tinh trùng thường hay gặp, bao gồm thiểu tinh và vô tinh. Theo WHO, vô tinh là tình trạng trong tinh dịch không có tinh trùng (azoospermia), thường gặp hơn cả là do tinh hoàn không có khả năng sản xuất tinh trùng. Thiểu tinh là tình trạng mẫu tinh dịch có mật độ tinh trùng ít hơn 15×10^6/ml (oligozoospermia). Ngoài ra, thiểu tinh nặng là những trường hợp tinh dịch có mật độ tinh trùng ít hơn 5×10^6 /ml [3-5].

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. Điều tra dân số năm 1980, tỉ lệ này chỉ ở mức 7 - 10%, đến năm 1982, tỉ lệ vô sinh tăng lên đến 13% [6]. Theo Phan Văn Quyền (2000) tỉ lệ vô sinh là 10 - 15% [7]. Theo báo cáo của Trần Thị Phương Mai (2001), vô sinh do nữ chiếm khoảng 30 - 40% các trường hợp, vô sinh nam chiếm tỉ lệ gần tương đương là 30%.

Khoảng 20% các trường hợp tìm thấy nguyên nhân vô sinh ở cả hai vợ chồng. Còn lại, vô sinh không rõ nguyên nhân chiếm tỉ lệ khá lớn là 20% [8]. Trần Thị Trung Chiến và cộng sự (2002) đã công bố tỉ lệ vô sinh trong độ tuổi sinh đẻ chiếm 5% trong đó nguyên nhân do nam giới chiếm 40,8% [9]. Báo cáo của Nguyễn Viết 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 [10].

Với các số liệu nên trên, rõ ràng vô sinh nói chung và vô sinh nam giới nói riêng đang trở thành một vấn đề đáng quan ngại của y học và xã hội Việt Nam.

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

1.3.1. Nguyên nhân không do di truyền

Các yếu tố rối loạn nội tiết ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh, cương dương, phóng tinh... đều ảnh hưởng đến vô sinh. Các bệnh tật thuộc nhóm này gồm:

- Các bệnh ảnh hưởng vùng dưới đồi, vùng tuyến yên như phẫu thuật vùng tuyến yên, tia xạ, nhồi máu (hội chứng Sheehan, đột quỵ tuyến yên), bệnh tự miễn, chấn thương sọ não, hội chứng hố yên rỗng, thiểu sản tuyến yên, và các nhiễm khuẩn hệ thần kinh: apxe, viêm màng não, viêm não, lao...
- Giãn tĩnh mạch thừng tinh (Varicocele): Là hiện tượng dòng máu tĩnh mạch thừng tinh bị nghẽn tắc làm tăng nhiệt độ gây giảm số lượng và giảm chất lượng tinh trùng.
- Lỗ đái lệch thấp (Hypospadias) là một rối loạn trong đó niệu đạo sẽ mở ra ở vị trí mặt dưới của dương vật hoặc ở gốc dương vật, tầng sinh môn chứ không phải đầu dương vật, khiến tinh trùng xuất ra khó đi vào lỗ cổ tử cung.
- Một số bệnh nhiễm trùng như quai bị có thể gây viêm teo tinh hoàn, sốt trên 38,5^{o}C có thể ức chế quá trình sinh tinh trong thời gian 6 tháng [11, 12].
- Viêm tuyến tiền liệt, viêm ống dẫn tinh, viêm niệu đạo, viêm bao quy đầu, viêm mào tinh hoàn, phẫu thuật, chấn thương... có thể gây ra sẹo ngăn chặn quá trình xuất tinh.

- Sử dụng một số thuốc điều trị bệnh nội khoa như: Nội tiết tố (corticoid, androgens), cimetidin, sulphasalazine, spironolactone, nitrofurantoin, niridazone, colchichine… đều trực tiếp hoặc gián tiếp ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh.
- Các nguyên nhân khác: Một số bệnh toàn thân như bệnh ác tính, tim mạch, đái tháo đường, suy gan, suy thận… tiếp xúc với hoá chất hay bức xạ, hút thuốc lá, nghiện các chất như: ma tuý, rượu… kháng thể kháng tinh trùng, chấn thương tinh hoàn, thoát vị bẹn, tinh hoàn lạc chỗ…

1.3.2. Nguyên nhân di truyền

Mặc dù vô sinh nam ngày càng xuất hiện với tỉ lệ lớn hơn, nguyên nhân của tình trạng này vẫn còn nhiều vấn đề chưa được làm sáng rõ. Tuy nhiên 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.

1.3.2.1. Những đột biến gen gây bất thường cấu trúc và chức năng của tinh trùng

Những đột biến và thay đổi trong cấu trúc DNA của các tế bào dòng mầm ở nam giới có thể gây ảnh hưởng đến chức năng của tinh trùng. Những ảnh hưởng đó bao gồm những thay đổi bất thường của chất lượng tinh trùng bao gồm hình thái và khả năng thụ tinh của chúng.

Loại bất thường cấu trúc tinh trùng đầu tiên là tinh trùng có dạng đầu tròn và thiếu cấu trúc acrosome (globozoospermia) là trường hợp hiếm gặp và chiếm 0,1% các trường hợp vô sinh nam. Những tế bào tinh trùng này không có khả năng bám vào lớp màng glycoprotein trên màng của tế bào trứng, thậm chí trong trường hợp được xử lý với calcium inophore. Đột biến trên 3 gen *STATA16*, *PICK1* và *DPY19L2* có thể là nguyên nhân di truyền của kiểu hình globozoospermia, trong đó, mất đoạn đồng hợp tử trong gen *DPY19L2* là nguyên nhân của hơn 70% số ca bệnh. Trong khi hầu hết các biến đổi di truyền gây nên vô sinh nam là rất hiếm (<1%) thì những mất đoạn của gen *DPY19L2* lại tồn tại ổn định ở mức thấp trong

quần thể. Lý do cho hiện tượng này là sự xuất hiện mới (*de novo*) của các alelle giúp cân bằng áp lực của chọn lọc tự nhiên lên những đột biến đồng hợp tử gây vô sinh nam [13]. Lý giải cho khả năng thụ tinh kém quan sát thấy ở những trường hợp globozoospermia đó là dường như những tinh trùng có tỉ lệ lớn DNA bị phân mảnh, sắp xếp cấu trúc của nhiễm sắc thể không ổn định và thiếu hụt protamine. Một hội chứng có liên quan là globozoospermia từng phần, trong đó có hơn 50% tế bào có kiểu hình đầu tròn và thiếu hụt cấu trúc acrosome.

Macrozoospermia là bất thường tinh trùng có nguyên nhân di truyền tiếp theo, đặc trưng với một lượng tinh trùng có đầu to và nhiều đuôi. Phần lớn các tế bào như vậy đều là lưỡng bội và căn nguyên bệnh sinh là do đột biến trong gen *AURKC*. Tỉ lệ các đột biến này khác nhau giữa các quần thể người. Dữ liệu từ một phân tích gần đây trên nam giới khu vực Bắc Phi cho thấy các đột biến trong *AURKC* là phổ biến nhất, chiếm 2,7% trong những người nam giới vô sinh, cao hơn so với đột biến mất đoạn ở gen *DPY19L2* và 0,2% do mất đoạn trên nhiễm sắc thể Y [14]. Kiểu hình macrozoospermia gây ra do tình trạng đột biến đồng hợp tử (di truyền lặn) của gen *AURKC*. Hai đột biến trong gen này đã được báo cáo bao gồm: đột biến vô nghĩa làm xuất hiện mã hết thúc sớm p.Y248* và đột biến dịch khung đồng hợp tử c.144delC. Đây là những đột biến đã được duy trì qua rất nhiều thế hệ, các nhà khoa học cho rằng trạng thái dị hợp tử của các đột biến này nhất định phải có một lợi thế sinh sản khiến cho chúng được chọn lọc tự nhiên giữ lại [15], tuy vậy cũng chưa có bằng chứng khoa học nào củng cố cho giả thuyết này.

Một đặc điểm lâm sàng quan sát thấy ở các nam giới thiểu tinh là bất thường hình thái với tinh trùng không đầu. Đột biến trong một số gen khác nhau đã được biết là nguyên nhân của kiểu hình này. Cụ thể, các đột biến trong các gen *PMFBP1*, *TSGA10*, *SUN5*, *BRDT* và *CEP112* đều đã được đánh giá có liên quan đến nguyên nhân gây nên tình trạng này. Các đột biến trong gen *SUN5* chiếm 50% các trường hợp bệnh nhân vô sinh có mang các tinh trùng không đầu. Trong một số trường hợp may mắn thì những bệnh nhân vô sinh nam mang đột biến trên *SUN5* có thể được can thiệp thành công nhờ ICSI, điều này phản ánh chức năng quan trọng của protein SUN5 trong việc kết nối phần đầu và đuôi của tinh trùng. Tuy nhiên các trường hợp mang đột biến trên *TSGA10* và *CEP112* thì việc can thiệp điều trị là không khả thi

thậm chí với can thiệp hỗ trợ thụ thai vì những tổn thương gen gây nên ảnh hưởng ở vị trí tâm động của tế bào tinh trùng.

Bên cạnh dị tật đầu tinh trùng gây vô sinh, những bất thường trong cấu trúc đuôi tinh trùng cũng dẫn tới vô sinh nam. Những khiếm khuyết trong cấu trúc axoneme-9 vi ống kép bao quanh 2 sợi đơn nằm ở trung tâm lần đầu được Afzelius nghiên cứu [16]. Trong đó những bất thường trong cấu trúc axoneme của đuôi các tinh trùng làm triệt tiêu hoàn toàn khả năng di động của chúng hoặc các tinh trùng di động bất thường nghiêm trọng. Hội chứng Kartegener (tỉ lệ 1:10.000 đến 1:40.000 trong số các ca sinh) là một ví dụ với đặc điểm các tinh trùng hoàn toàn không có khả năng chuyển động. Hội chứng này cũng đặc trưng bởi một số đặc điểm lâm sàng khác như phủ tạng đảo ngược (50% số ca bệnh), giãn phế quản, viêm xoang mạn tính. Rối loạn này là do di truyền lặn trên NST thường khi cơ thể mang hai bản sao hoặc dị hợp tử kép ở một số các gen như *CCDC40,* các gen mã hóa cho chuỗi nặng 1-5-11 của cấu trúc axoneme (*DNAH1*, *DNAH5*, *DNAH7* và *DNAH11*), *LRRC6*, *ZMYND10*, *ARMC4* và *TTC12*. Có hơn 40 gen được biết có liên quan đến rối loạn này. Theo thời gian, những hiểu biết về cấu trúc của các lông mao càng được bổ sung thì danh sách các gen liên quan càng rộng hơn. Về mặt lí thuyết những gen liên quan đến rối loạn PCD đều có thể có vai trò nhất định trong căn nguyên của tình trạng vô sinh nam. Tuy nhiên không phải tất cả các bệnh nhân biểu hiện PCD đều vô sinh. Quan trọng hơn, bên cạnh việc mất khả năng di động thì các tinh trùng từ bệnh nhân mắc hội chứng Kartagener cho thấy chức năng bình thường nếu được hỗ trợ tiếp xúc gần với màng sinh chất của tế bào trứng. Khi đó quá trình hợp nhất giữa trứng và tinh trùng vẫn đạt được bình thường. Ngay cả với những bệnh nhân PCD chỉ có mất một phần độ di động của tinh trùng thì vẫn có khả năng mang thai tự nhiên. Nhưng trong trường hợp đột biến xảy ra tại các gen *CCDC39*, *CCDC40*, *DNAAF1* và *LRRC6* thì ít có khả năng thụ thai tự nhiên hơn [17].

Có thể thấy, các đột biến gen không chỉ ảnh hưởng đến chức năng vận động của tinh trùng. Những khiếm khuyết trong gen *PLC3* làm hoạt hóa sự sản sinh can xi ở trứng đã được thụ tinh và từ đó ức chế quá trình thụ tinh. Đồng thời thụ tinh thất bại cũng có liên quan đến đột biến ở *CATPSERE*, mã hóa cho một thành phần

của kênh can xi của tinh trùng. Đa hình ở một số gen ti thể như *MT-ATP6* và *MT-CYB* cũng dẫn đến tình trạng tương tự [18].

Các thông tin nói trên cho thấy các khảo sát mới chỉ khu trú những đột biến có ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của tinh trùng, ngoài ra còn tồn tại nhiều đột biến gen khác ảnh hưởng đến quá trình sản xuất tinh trùng tại tinh hoàn.

1.3.2.2. Những đột biến gen gây bất thường ống dẫn tinh và tinh hoàn

Vô tinh do tắc nghẽn ống dẫn tinh chiếm khoảng 30% các trường hợp vô sinh nam và nguyên nhân do tắc nghẽn ống dẫn tinh xuất hiện sau nhiễm trùng, chấn thương hoặc phẫu thuật. Một nguyên nhân khác là do các đột biến của gen *CFTR* dẫn tới hình thành nên bất thường hoặc bất sản cả 2 ống dẫn tinh. Khoảng 70% bệnh nhân vô tinh không liên quan đến tắc nghẽn ống dẫn tinh là do bất thường nguyên phát từ quá trình sinh tinh. Hiện nay, số lượng các đột biến đơn gen được cập nhật nhiều hơn có liên quan đến tình trạng không có tinh trùng và không tắc nghẽn ống dẫn tinh. Rất nhiều đột biến gen dẫn tới suy tinh hoàn và tần suất xuất hiện không phổ biến, trạng thái di truyền của các đột biến này thường là di truyền lặn, được truyền từ cha mẹ có chức năng sinh sản bình thường. Thế hệ sau vô sinh sẽ mang kiểu gen đồng hợp tử, dị hợp tử kép hoặc bán hợp tử. Mặc dù vậy, các đột biến đơn gen di truyền theo mô hình trội trên NST thường cũng có thể là nguyên nhân dẫn tới vô sinh như đột biến của các gen *SYCP3*, *NR5A1* và *WT1* [19].

Một phân tích gần đây về nguyên nhân di truyền của các trường hợp vô tinh không do tắc nghẽn ống dẫn tinh đã kết luận rằng các đột biến đơn gen quan sát được ở những ca bệnh này chủ yếu liên quan đến các giai đoạn phát sinh tinh trùng. Cụ thể là phần lớn đóng vai trò trong kỳ đầu của giảm phân hoặc là các chất điều hòa phiên mã và nội tiết của quá trình sinh tinh [20]. Thực tế, không phải tất cả các đột biến gen gây nên vô tinh-không liên quan đến tắc nghẽn ống dẫn tinh đều được biểu hiện ở tinh hoàn. Có một số gen mã hóa cho các thành phần then chốt của trục dưới đồi-tuyến yên-tuyến sinh dục và tham gia vào cơ chế điều hòa nội tiết quá trình sinh tinh. Gen mã hóa cho thụ thể GNRHR là một trường hợp điển hình. Đây là một protein G kết hợp với thụ thể biểu hiện trên bề mặt của tuyến yên đáp ứng với kích thích GnRH bằng cách thúc đẩy quá trình tiết các hóc môn sinh dục là FSH

và LH. Có ít nhất 19 đột biến đã được xác định ở gen *GNRHR* và gây bệnh ở trạng thái dị hợp tử kép [19]. Ngoài ra, còn có các đột biến có tác động can thiệp vào quá trình biệt hóa của hệ sinh sản nam bao gồm đột biến trên gen *CYB5A* ức chế có chọn lọc hoạt tính của enzyme 17,20 lyase dẫn tới rối loạn phát triển giới tính [21].

Các đột biến trên NST giới tính X có liên quan đến vô sinh nam bao gồm các gen như: *ANOS1* gây hội chứng Kallmann [22], *TEX11* làm ức chế quá trình giảm phân [23] và *NR0B1* có liên quan đến tăng sản tuyến thượng thận và vô tinh [24]. Các đột biến trên gen mã hóa cho thụ thể androgen cũng được biết đến là gây vô sinh ở khoảng 2% các bệnh nhân [25].

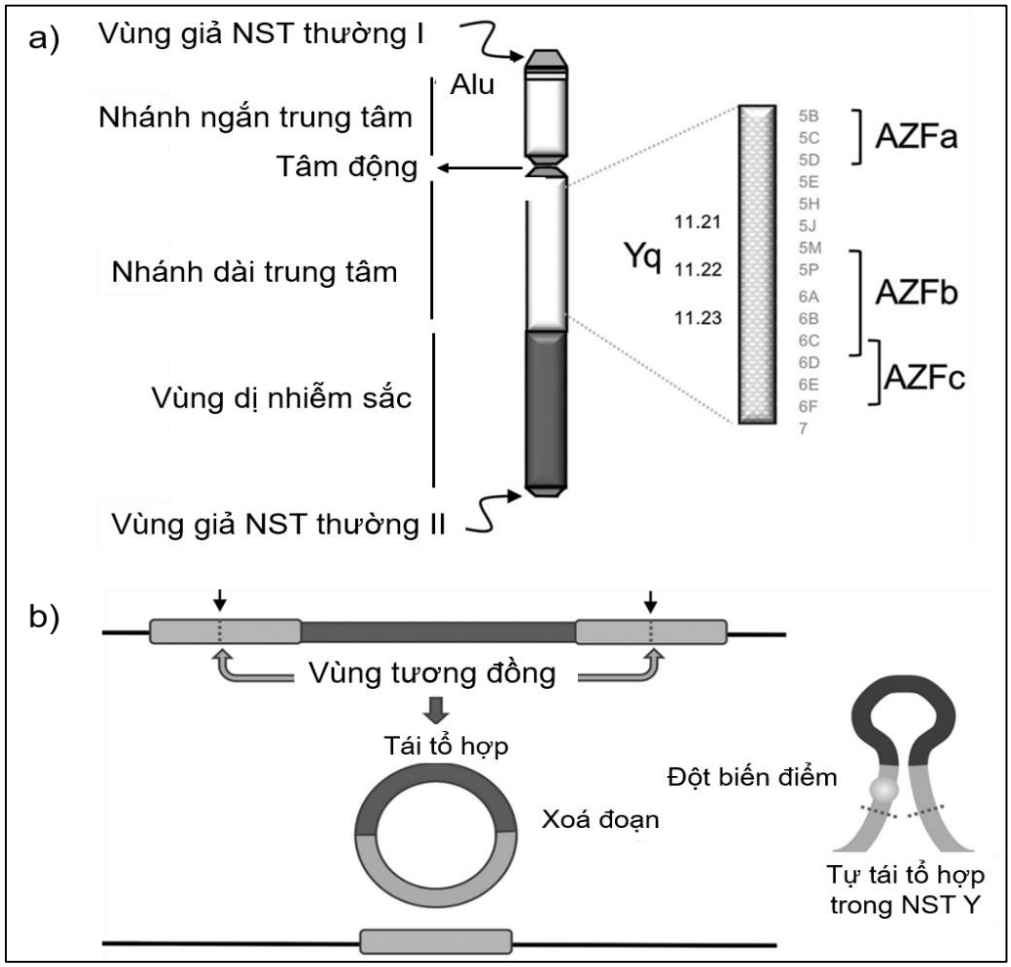
Nhìn chung, những nội dung tổng hợp trên cho thấy mức độ ảnh hưởng rất rộng của các đột biến đơn gen gây vô sinh nam trong các giai đoạn phát triển và chức năng của tuyến sinh dục. Ảnh hưởng này bao trùm từ giai đoạn phát sinh hình thái ban đầu của đường sinh dục nam trong bào thai, giai đoạn biệt hóa và trưởng thành của tinh trùng. Tuy nhiên, đáng chú ý là nguyên nhân vô sinh nam do di truyền phổ biến nhất lại không phải là các đột biến từ gen đơn lẻ mà là bất thường số lượng NST. Trong đó hội chứng Klinfelter (bộ NST XXY) mang bất thường NST phổ biến nhất, chiếm tới 10% các bệnh nhân vô sinh nam không có tắc nghẽn ống dẫn tinh hay thiểu tinh nặng [26, 27].

Từ quan điểm của chọn lọc tự nhiên, áp lực chọn lọc có xu hướng tác động tiêu cực đến các cá thể vô sinh. Vì vậy việc duy trì trên diện rộng các đột biến gen và bất thường nhiễm sắc thể gây vô sinh ở dân số nói chung có thể liên quan đến những sự xuất hiện phổ biến của những tổn thương mới phát sinh ảnh hưởng đến các gen và nhiễm sắc thể tham gia vào quá trình sinh tinh.

1.3.2.3. Những bất thường trên nhiễm sắc thể Y

Ở người, trong khi 22 cặp NST thường tồn tại thành từng cặp và mỗi cặp có sự tương đồng di truyền, nhờ đó mà quá trình tự sửa sai DNA có thể diễn ra thông qua tái tổ hợp tương đồng giữa hai NST trong mỗi cặp. Nhưng đối với NST Y thuộc cặp NST giới tính thì không có trình tự tương đồng, do đó sự ổn định của NST được duy trì thông qua hiện tượng tự tái tổ hợp. Thường thì các gen trên NST Y tồn tại thành nhiều bản sao như một cách thức để đối phó với sự tích tụ của những đột biến

gen có hại tự phát sinh. Một số yếu tố lặp lại này đã đảo ngược và tạo thành các trình tự palindromic, tạo điều kiện cho sự kiện tái tổ hợp xảy ra. Hiện tượng tự tái tổ hợp trong một NST đã cho phép NST Y đạt sự ổn định di truyền qua quá trình tiến hóa. Tuy nhiên, tồn tại của những trình tự lặp lại như vậy trên NST Y cũng là một yếu tố thuận lợi cho tình trạng mất đoạn xảy ra-là kết quả của hiện tượng trao đổi chéo bất thường. Có 3 đột biến mất đoạn thường gặp của NST Y tồn tại ở nam giới vô sinh đó là mất đoạn AZFa, AZFb và AZFc (Hình 1.1). Ngoài ra, sự kết hợp của những mất đoạn bao gồm AZFbc, AZFabc và một phần AZFc cũng được quan sát [28, 29]. Các mất đoạn dạng AZFa và AZFb thường tạo nên hiện tượng không có tinh trùng, đây là tình trạng vô sinh không thể can thiệp y học. Tuy nhiên, những bệnh nhân mang mất đoạn dạng AZFc lại đặc trưng bởi tình trạng thiểu tinh nghiêm trọng, một số lượng rất nhỏ tinh trùng với chức năng bình thường vẫn có thể tồn tại sau những lần xuất tinh hay sinh thiết tinh hoàn. ICSI là một lựa chọn điều trị phù hợp trong những trường hợp như vậy. Và kết quả tất yếu là thế hệ sau đó nếu là con trai sẽ thừa hưởng mất đoạn NST Y từ người cha, và cũng sẽ vô sinh.



Hình 1.1. Mất đoạn trên nhiễm sắc thể Y trong vô sinh nam

a) Vi mất đoạn ở vùng Yq11 chiếm 2-10% các ca vô sinh nam. Các vi mất đoạn này được phân thành 3 nhóm là *AZFa, AZFb* và *AZFc*. Nam giới mất hoàn toàn vùng AZFa và AZFb không có tinh trùng, còn những người bị mất vùng AZFc có thể bị thiểu tinh (có thể can thiệp hỗ trợ sinh sản). b) Tái tổ hợp trong NST Y tạo ra sự ổn định di truyền, tuy nhiên cũng mang nguy cơ tái tổ hợp bất thường và tạo ra các vi mất đoạn [30].

Tỉ lệ các vi mất đoạn NST Y được ước tính từ 1:2000 đến 1:3000 nam giới. Trái ngược với các đột biến đơn gen gây hậu quả ảnh hưởng tới quá trình sinh tinh hoặc suy tinh hoàn nguyên phát, những đột biến trên NST Y không duy trì trong quần thể ở trạng thái dị hợp tử. Với rất ít ngoại lệ thì một số những mất đoạn NST Y đã xảy ra theo cơ chế tự phát trong các tế bào sinh dục của nam giới khỏe mạnh. Thực tế thì có đến 75% các đột biến mới phát sinh ở các tế bào sinh dục của nam giới là do hệ quả của lỗi sao chép [31].

1.3.3. Ảnh hưởng từ yếu tố di truyền ngoại gen

Hiện nay, có một số nghiên cứu bắt đầu hướng đến vai trò của hệ di truyền ngoại gen trong quá trình sinh tinh và ảnh hưởng của chúng với vô sinh nam. Những nghiên kết quả nghiên cứu cũng đã củng cố cho giả thuyết rằng methyl hóa DNA tinh trùng có liên quan đến sự thay đổi của chất lượng tinh trùng cũng như khả năng sinh sản. Việc methyl hóa chính xác các vị trí trình tự trên DNA đảm bảo cho quá trình cuộn xoắn của nhiễm sắc thể ở đầu tinh trùng, giúp tinh trùng trưởng thành và có khả năng thụ tinh với trứng. Ngược lại, nếu như nhiễm sắc thể của tinh trùng cuộn xoắn sai cách hoặc không hoàn toàn sẽ dẫn tới DNA tổn thương, ảnh hưởng tới khả năng thụ tinh với trứng và giảm khả năng mang thai thành công. Trong khía cạnh này, một số nghiên cứu đã tiến hành phân tích mức độ methyl hóa gen và hệ gen của DNA tinh trùng trong mối liên quan với tình trạng giảm khả năng sinh sản của nam giới. Những kết quả nghiên cứu chủ yếu cho thấy mối liên hệ giữa quá trình methyl hóa không chính xác với các thông số quan trọng của tinh dịch như: nồng độ (thiểu tinh), hình thái (quái tinh) và khả năng vận động tiến tới (kém di động). Methyl hóa DNA là quá trình gắn một nhóm methyl (-CH_3) vào vị trí 5'C của cytosine, quá trình này chủ yếu xảy ra ở các vùng lặp CpG. Các khu vực giàu CpG được gọi là đảo CpG và thường khu trú ở vùng promoter-vùng điều hòa biểu hiện gen. Nếu như vùng CpG tại promoter bị methyl hóa, thường sẽ dẫn đến làm giảm/tắt sự biểu hiện của gen, trong một vài trường hợp có thể liên quan đến giảm khả năng kết hợp với các yếu tố phiên mã.

Một số biến thể trong gen *MTHFR* là những nguyên nhân phổ biến đã biết làm giảm hoạt động của enzyme *MTHFR* trong các tế bào tinh trùng. Từ đó giảm khả năng cung cấp amino acid Methionine và cũng làm giảm quá trình methyl hóa [32, 33]. Ví dụ methyl hóa quá mức đã được phát hiện trong mẫu tinh hoàn của nam giới thiểu tinh không do tắc nghẽn ống dẫn tinh cũng như từ các tế bào tinh trùng ở nam giới những nam giới vô sinh vô căn [34-36]. Gần đây, một nhóm nghiên cứu đã khảo sát tình trạng methyl hóa của gen *MLH1* ở nhóm bệnh nhân thiểu tinh so với nhóm đối chứng [37]. Đây là gen chịu trách nhiệm cho quá trình sửa chữa sai hỏng khi bắt cặp DNA. Dữ liệu thu được đã chỉ ra mối liên hệ giữa methyl hóa quá

mức *MLH1* và vô sinh nam, từ đó gợi ý rằng gen *MLH1* có thể chịu sự điều hòa của yếu tố di truyền ngoại gen trong quá trình phát triển của các tế bào sinh dục [37].

Ngoài ra, sự mất cân bằng trong methyl hoá của các gen bất hoạt (imprinted gene-theo dòng bố hoặc mẹ) cũng có khả năng ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh và xu hướng gây vô sinh nam. Trong số các gen bất hoạt thì *MEST* và *H19* là hai gen được khảo sát rộng rãi nhất. Cụ thể, methyl hoá quá mức gen *MEST* đã nhiều lần được xác định là yếu tố liên quan đến vô sinh nam [38, 39]. Những dữ liệu về quá trình methyl hoá sai cách ở gen *MEST* đã cho thấy mối liên hệ với: (i) nồng độ tinh trùng thấp, giảm khả năng vận động và sai khác trong hình thái ở những nam giới vô sinh vô căn [40], (ii) được phát hiện trong tế bào sinh tinh sơ cấp ở những nam giới vô tinh [41], (iii) giảm thể tích hai tinh hoàn [40] và (iv) liên quan đến tỉ lệ protamine bất thường ở những nam giới thiểu tinh [42]. Những dữ liệu này đã được xác nhận thêm bằng một nghiên cứu phân tích tổng hợp [43]. Gần đây, methyl hoá quá mức gen *MEST* được phát hiện ở tinh trùng của người chồng mà những cặp vợ chồng này sảy thai liên tiếp [44].

Những biến động trong quá trình methyl hoá của gen *H19* đã được báo cáo rộng rãi là có liên quan tới vô sinh nam. Cụ thể là những trường hợp thiểu tinh, tinh trùng dị dạng, số lượng tinh trùng thấp và khả năng di chuyển kém hoặc tỉ lệ tinh trùng có hình dạng bình thường thấp hoặc tất cả các thông số của tinh trùng đều bất thường [45-47]. Ngoài ra, nghiên cứu trên những nam giới vô sinh vô căn với thông số tinh dịch bình thường cũng phát hiện những khiếm khuyết trong methyl hoá gen *H19* trong tinh trùng [48]. Nhìn chung, 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 hoặc tinh trùng yếu. Trong số đó thì *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 hai gen này đóng vai trò là yếu tố nguy cơ của tình trạng vô sinh nam. Một điều đáng chú ý là sự bất thường methyl hoá này đã được xác định ở những nam giới vô sinh nhưng không thể hiện bất thường nào trong các thông số tinh trùng trong tinh dịch. Đây là một khía cạnh đáng lưu ý trong công tác chẩn đoán vô sinh. Cho tới nay, có đến 30% số ca vô sinh nam vẫn chưa lý giải được nguyên nhân. Những nghiên cứu tiếp tục triển khai trong tương lai hứa hẹn sẽ

đem lại những bổ sung quan trọng làm sáng tỏ nguyên nhân liên quan đến những gen bất hoạt theo dòng cha/mẹ ở những trường hợp vô sinh nam vô căn.

1.3.4. Đặc điểm lối sống và ảnh hưởng của môi trường

Sự suy giảm chất lượng tinh dịch là yếu tố bất lợi tác động trực tiếp đến khả năng sinh sản. Trong vòng vài thập kỷ qua, đã có những báo cáo cho thấy chất lượng tinh dịch nam giới giảm dần. Một nghiên cứu hệ thống đã khảo sát trong khung thời gian 40 năm, đánh giá mật độ tinh trùng ở những nam giới có khả năng sinh sản bình thường và những nam giới chưa rõ thông tin. Kết quả cho thấy, trong khoảng thời gian đánh giá, mật độ tinh trùng giảm hẳn từ 113 triệu/ml đến 66 triệu/ml và thể tích tinh dịch giảm từ 3,4 ml xuống 2,75 ml [49]. Nhóm nghiên cứu của Springart và cộng sự cũng đã đánh giá thay đổi chất lượng tinh dịch theo thời gian từ giai đoạn 1976 đến 2009. Những thông số về tổng lượng tinh trùng, khả năng vận động và khả năng sống đều sụt giảm [50]. Ngày nay, những yếu tố thuộc về môi trường, nghề nghiệp và lối sống đều có thể có ảnh hưởng xấu đến khả năng sinh sản của cả nam giới, nữ giới và khả năng thành công của những phương pháp hỗ trợ sinh sản. Những yếu tố có ảnh hưởng nghiêm trọng đến khả năng sinh sản nam giới trong cuộc sống hiện đại đó là 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 nguồn tiếp xúc với bức xạ điện từ, thói quen uống nhiều rượu.

Dựa trên một phân tích tổng hợp của Campbell và cộng sự (111.158 người tham gia) trên các cặp vợ chồng mà nam giới bị béo phì thì có khả năng bị vô sinh cao hơn đáng kể so với các cặp vợ chồng mà người chồng có cân nặng bình thường (OR = 1,66). Nghiên cứu này cho thấy mối tương quan giữa béo phì ở tuổi trưởng thành và xác suất có con. Ngoài ra, khi can thiệp hỗ trợ sinh sản thì các cặp vợ chồng mà người chồng bị béo phì cũng có nguy cơ không mang thai thành công cao hơn so với nhóm mà người chồng có cân nặng bình thường (OR = 2,87) [51]. Ngược lại, việc giảm cân lại có mối liên quan đến giảm những tổn thương DNA và tăng tổng số tinh trùng di động (chương trình giảm cân trong 14 tuần) [52].

Hiện nay đang nảy sinh mối quan tâm xung quanh việc sử dụng điện thoại di dộng và các thiết bị điện tử khác như một nguồn điện trường tần số thấp và mối

liên quan với giảm chất lượng tinh dịch. Các thiết bị điện này có thể có những tác dụng nhiệt và phi nhiệt lên các mô sinh học. Hiệu ứng phi nhiệt được cho là tăng nguy cơ sản xuất các gốc oxy hoạt động, từ đó gây tổn thương phá huỷ DNA [53]. Hiệu ứng nhiệt có thể tăng nhiệt độ tinh hoàn. Hai phân tích tổng hợp đã đánh giá chất lượng tinh trùng liên quan đến tình trạng sử dụng thiết bị di động. Nghiên cứu của Adams và cộng sự đã báo cáo mối liên hệ giữa việc phơi nhiễm với điện thoại di động và sự sụt giảm trong độ di động của ti trùng và tỷ lệ sống của tinh trùng. Các tác giả đã tổng hợp các kết quả từ cả các nghiên cứu trên mô hình *in vivo* và *in vitro* cho thấy tiếp xúc với điện thoại di động có ảnh hưởng tiêu cực đến chất lượng tinh trùng [54]. Phân tích tổng hợp thứ hai của Liu và cộng sự cho thấy bức xạ tần số vô tuyến là có hại đến khả năng vận động và tỷ lệ sống của tinh trùng trong ống nghiệm; hơn nữa, phơi nhiễm với nguồn tần số vô tuyến cũng ảnh hưởng tiêu cực đến mật độ tinh trùng động vật và khả năng di động [55].

Năm 2012, Hiệp hội Y học Sinh sản Hoa Kỳ đã có báo cáo về thông số tinh dịch và chức năng của tinh trùng ở những nam giới hút thuốc suy giảm 22% so với nam giới không hút thuốc, tuân theo liều lượng [56]. Một phân tích tổng hợp (ở tổng cộng 5.865 người), những người đàn ông hút thuốc vừa phải và nghiện thuốc lá nặng có nhiều khả năng cao bị giảm các thông số của tinh trùng như số lượng và khả năng vận động. Tiếp xúc với khói thuốc lá có liên quan đến giảm số lượng tinh trùng (chênh lệch trung bình: -9,72 triệu/ml; KTC 95% -13,32 đến -6,12), khả năng vận động (chênh lệch trung bình: -3,84%; KTC 95% -5,53 đến -1,44) và hình thái (sự khác biệt trung bình: -1,37%; 95%CI -2,63 đến -0,11) [57]. Mostafa và cs thấy có khả năng vận động tăng ($p \leq 0,001$), tỷ lệ các dạng bình thường ($p \leq 0,001$) và khả năng sống tăng ($p = 0,002$) ở những người vô sinh không hút thuốc so với người hút thuốc vô sinh. Hơn nữa, nồng độ chất nhiễm sắc tinh trùng bất thường tăng ở những người hút thuốc so với những người không hút thuốc ($p \leq 0,001$) [58]. Theo báo cáo bởi Sepaniak và cs, tỷ lệ phân mảnh DNA trung bình là 25,9% đối với người không hút thuốc và 32% đối với người hút thuốc ($p <,001$) [58]. Nguyên nhân khiến chất lượng tinh trùng ở những nam giới có thói quen hút thuốc suy giảm còn chưa được làm rõ và các công bố khoa học về vấn đề này chưa đưa ra kết luận

thống nhất. Một số lý thuyết đề xuất về cơ chế tiềm ẩn dẫn tới làm suy giảm phản ứng acrosome, hoạt hoá tinh trùng và tăng mức độ stress oxy hoá [59].

1.4. Stress oxy hóa và vô sinh nam

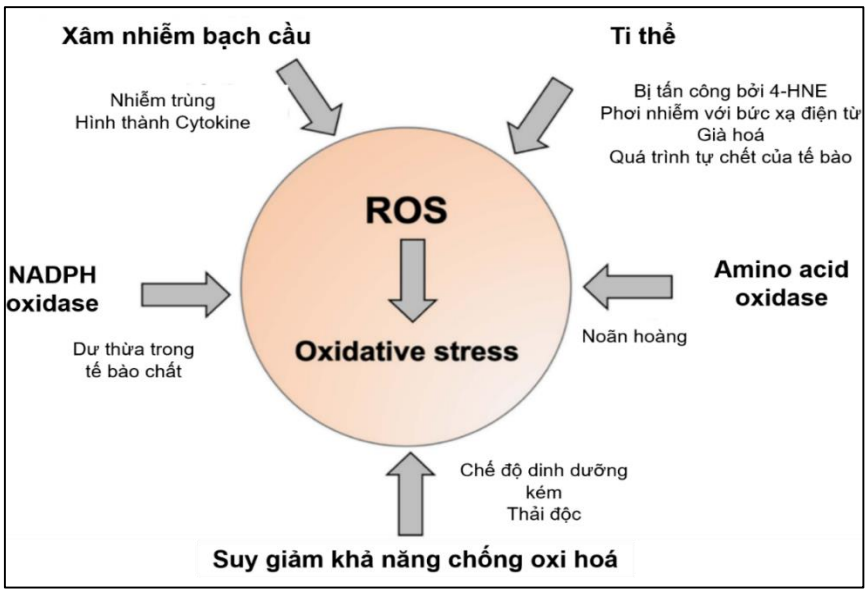
1.4.1. Ảnh hưởng của stress oxy hóa đến tình trạng vô sinh nam

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. Các ROS ở mức độ nhất định là cần thiết cho sự trưởng thành của tinh trùng, phản ứng acrosome, hoạt hoá và dung hợp với trứng. Tuy nhiên ROS được tạo ra quá mức sẽ lấn át khả năng trung hoà của các chất chống oxy hoá có trong tinh dịch.

Tầm quan trọng của stress oxy hóa trong căn nguyên của khiếm khuyết chức năng tinh trùng đã được công nhận kể từ những nghiên cứu tiên phong của Thaddeus Mann và các cộng sự tại Đại học Cambridge. Những nghiên cứu này đã chứng minh rằng tinh trùng của các động vật có vú nhạy cảm với quá trình peroxid hóa, quá trình này tấn công những phân tử acid béo không bão hòa trong tế bào tinh trùng, từ đó phá hủy màng tế bào và làm hạn chế chức năng của chúng [60]. Những quá trình kích thích liên tục như vậy có thể liên quan đến việc tăng cường sản sinh các gốc tự do (reactive oxygen species-ROS) bởi các tế bào này hoặc giảm hiệu quả bảo vệ chống lại stress oxy hóa [61]. Ảnh hưởng của stress oxy hóa dẫn tới những hệ quả như mất khả năng vận động của tinh trùng, hạn chế phản ứng acrosome để tiến tới dung hợp màng, gây bất thường trong khả năng dung hợp với màng vitelline của trứng hoặc gây phá hủy DNA [62, 63].

Tinh trùng có rất ít tế bào chất và do đó, chúng thiếu hụt các enzyme bảo vệ hầu hết các tế bào khỏi stress oxy hóa. Điều này không có nghĩa là những tế bào tinh trùng hoàn toàn thiếu các yếu tố bảo vệ nội bào nào bởi vì thực tế chúng cũng có một số enzyme chống oxy hóa quan trọng như peroxiredoxin 6, superoxide dismutase, glutathione cặp peroxidase-reductase [64-66]. Mặc dù vậy, mức độ bảo vệ được tạo ra bởi các hệ thống này là rất hạn chế và như vậy tinh trùng phần nhiều

phụ thuộc vào các chất chống oxy hóa ngoại bào hiện diện tại ống dẫn tinh [67] huyết tương mào tinh [68], tinh dịch [69] và tử cung [70], từ đó cung cấp cho các tế bào tinh trùng sự bảo vệ toàn vẹn hơn trong quá trình di chuyển của chúng từ các ống dẫn tinh đến màng vitelline của tế bào trứng. Kết quả là, bất kỳ yếu tố nào tác động đến tình trạng chống oxy hóa tổng thể của một cơ thể cũng như sinh khả dụng của các chất chống oxy hóa ngoại bào đều có thể có tác động đến mức độ stress oxy hóa, từ đó ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh cũng như khả năng sinh sản của nam giới [71, 72]. Một số ví dụ về các yếu tố ảnh hưởng bao gồm chế độ ăn uống, hiện tượng giãn tĩnh mạch thừng tinh, hút thuốc lá, béo phì, căng thẳng nhiệt, và các chất độc hại từ môi trường như như bisphenol A. Tất cả các yếu tố này đều có thể tác động đến chất chống oxy hóa trong cơ thể và từ đó khiến cho tinh trùng trở nên nhạy cảm đối với tình trạng stress oxy hóa. Hệ thống chống oxy hóa nội bào và ngoại bào không được toàn vẹn có thể là một yếu tố chính trong căn nguyên của cả vô sinh ở nam giới và tổn thương DNA do oxy hóa. Rõ ràng nếu cho rằng stress oxy hóa chịu trách nhiệm cho hậu quả rối loạn chức năng sinh sản ở nam giới, thì một trong những hướng khắc phục tình trạng trên chính là sử dụng chất chống oxy hóa như là một phần của phương pháp chữa bệnh. Một số nghiên cứu tiên phong đầy hứa hẹn đã được thực hiện với kết quả tích cực và cho thấy hiệu quả rõ ràng trên các mô hình động vật [73]. Tuy nhiên, những nghiên cứu đáp ứng tiêu chuẩn vàng như thử nghiệm ngẫu nhiên, thử nghiệm mù đôi, thử nghiệm lâm sàng có đối chứng với giả dược vẫn chưa được tiến hành. Một phần lí do là vì hiện nay chưa có sự đồng thuận về các dấu ấn stress oxy hóa nên được sử dụng làm tiêu chuẩn để chọn lọc bệnh nhân thích hợp cho liệu pháp chống oxy hóa. Nguồn gốc hình thành nên các ROS đã có rất nhiều nghiên cứu và được thể hiện tóm tắt ở Hình 1.2 cũng như trình bày chi tiết ở các phần sau.



Hình 1.2. Tóm tắt một số yếu tố góp phần gây stress oxy hoá ở tinh trùng người. Nguồn gốc sản sinh ROS chính bao gồm các dòng chảy điện tử bị xáo trộn trong ti thể tinh trùng, tăng cường hoạt tính của các amino acid oxy hoá, dư thừa NADPH oxy hoá (ví dụ NOX5). Stress oxy hoá cũng có thể xuất hiện nếu cơ thể thiếu hụt sự bảo vệ của các chất chống oxi hoá thông qua dinh dưỡng hay mắc bệnh như béo phì, giãn tĩnh mạch thừng tinh [74].

1.4.2. Nguồn gốc của các ROS

1.4.2.1. Nguồn gốc từ sự xâm lấn của các tế bào bạch cầu

Nguồn ROS tạo ra stress dạng này rất phức tạp, có thể có nguyên nhân nội sinh hoặc ngoại sinh. Các yếu tố ngoại sinh là sự thâm nhiễm của các tế bào bạch cầu vào trong tinh dịch vào thời điểm xuất tinh tại các tuyến sinh dục thứ cấp, phần lớn là các bạch cầu trung tính. Sự hiện diện của các tế bào này phản ánh sự tiềm ẩn của nhiễm trùng đường sinh sản, mặc dù cũng không loại trừ các yếu tố khác như chấn thương, phẫu thuật và tự miễn. Trong trình huống số lượng tế bào bạch cầu tương đối thấp (< 1 triệu/ml) thì lượng ROS tạo ra sẽ không gây ảnh hưởng đến chức năng của tinh trùng bởi lúc này các tế bào tinh trùng vẫn được bảo vệ đầy đủ bởi các chất chống oxi hoá trong tinh dịch. Tuy nhiên nếu lượng tế bào bạch cầu vượt quá ngưỡng nói trên sẽ xuất hiện tình trạng stress oxi hoá, can thiệp vào chức

năng của tinh trùng. Nếu như bạch cầu vẫn tồn tại với số lượng lớn trong dịch huyền phù tinh trùng đã rửa sạch sử dụng trong quy trình hỗ trợ thụ thai thì trạng thái stress oxi hoá sẽ tái diễn do thiếu hụt các yếu tố chống oxi hoá trong môi trường nuôi cấy IVF thông thường. Sự tồn tại với nồng độ thấp của bạch cầu trong huyền phù tinh trùng người đã rửa sạch là một yếu tố quan trọng gây ảnh hưởng tiêu cực đến tỉ lệ thụ tinh sau IVF [75]. Vấn đề này có thể được giải quyết bằng cách kết hợp với các chất chống oxy hoá như N-acetylcysteine được bổ sung trong môi trường nuôi cấy. Mặt khác cũng có thể loại bỏ có chọn lọc tình trạng nhiễm bạch cầu bằng cách sử dụng các hạt từ tính phủ một kháng thể đơn dòng đặc hiệu với các kháng nguyên bạch cầu thông thường.

1.4.2.2. Nguồn gốc từ tinh trùng

Bên cạnh nguyên nhân do quá trình thâm nhiễm bạch cầu, phần lớn các ROS gây tổn hại đến chức năng của tinh trùng có nguồn gốc nội sinh từ nhiều con đường khác nhau thông qua đáp ứng với nhiều loại kích thích. Tuy nhiên nguồn gốc ROS từ tinh trùng ít hơn các ROS có nguồn gốc từ bạch cầu. Đây là lý do vì sao phương pháp đo tế bào dòng chảy rất hữu ích để đánh giá lượng ROS trong tinh dịch vì phương pháp này cho phép tách tinh trùng khỏi các loại tế bào khác và đơn giản hoá việc giải thích dữ liệu. Ngược lại phương pháp khác như đo độ sáng có nguy cơ bị nhiễu loạn do sự hiện diện của các tế bào bạch cầu. Vẫn còn nhiều tranh cãi quanh vấn đề ROS loại nào thật sự đóng vai trò quan trọng đối với chức năng của tinh trùng, superoxide, hydrogen peroxide, nictric oxide hay là peroxynitrite. Thực tế thì tất cả các chất oxi hoá và gốc tự do đều có thể phản ứng mạnh đến mức chúng liên tục chuyển đổi lẫn nhau và cùng góp phần gây ra stress oxy hoá cho giao tử đực. Loại ROS nào thực sự chiếm ưu thế trong quá trình này cho đến nay vẫn còn chưa thực sự rõ ràng.

Ngoài ra, ti thể của tinh trùng cũng là một nguồn chính tạo ra các superoxide [76]. Đây là bào quan tạo ra các ROS như một sản phẩm của quá trình trao đổi chất hiếu khí từ chuỗi vận chuyển điện tử. Các ROS cũng được tạo nên khi các con đường tự chết nội sinh bị kích hoạt. Những con đường này có liên quan tới tình trạng mất di động nhanh chóng của tinh trùng, tạo thành ROS từ ti thể và oxi hoá

phá huỷ DNA. Bởi vậy, bất kỳ yếu tố gây stress nào gây kích hoạt một đáp ứng tự chết theo chương trình cũng sẽ hình thành nên các ROS của ti thể và từ đó gây mất chức năng của tinh trùng.

Hình thành các ROS của ti thể và tự chết theo chương trình là một cơ chế quan trọng gây già hoá tinh trùng. Tất cả các tinh trùng của động vật có vú đều chỉ có thời gian sống hữu hạn vài ngày (tuỳ từng loài), chúng sẽ trở nên già hoá cả ở trạng thái *in vivo* hay trong ống nghiệm, mất khả năng sống, di chuyển và giảm tính toàn vẹn DNA theo thời gian. Stress oxy hoá dường như là một phần rất quan trọng của quá trình già hoá tinh trùng, xuất phát từ đánh giá thực tế là khả năng di chuyển của tinh trùng và tính toàn vẹn của DNA có thể được cải thiện đáng kể trong môi trường ống nghiệm nếu như các chất chống oxy hoá được kết hợp vào môi trường nuôi dưỡng [77]. Sự tạo thành ROS của ti thể cũng bị kích thích bởi sản phẩm cuối cùng của quá trình peroxid hoá lipid là các lipid aldehyde. Không phải tất cả các lipid aldehyde đều có liên quan trong quá trình này, trong đó acrolein và 4-hydroxynonenal là những chất kích thích mạnh mẽ nhất, hoạt hoá sản sinh ROS của ti thể thông qua kết hợp với với các thành phần cấu thành của chuỗi vận chuyển điện tử, đặc biệt là acid succinic dehydrogenase. Khả năng các lipid aldehyde được tạo ra do ảnh hưởng của stress oxy hoá, từ đó liên kết với các thành phần của chuỗi vận chuyển điện tử ti thể và kích thích hình thành ROS đồng nghĩa với việc một khi quá trình này khởi phát thì nó sẽ trở thành một quá trình tự duy trì, trừ khi có chất chống oxy hoá can thiệp.

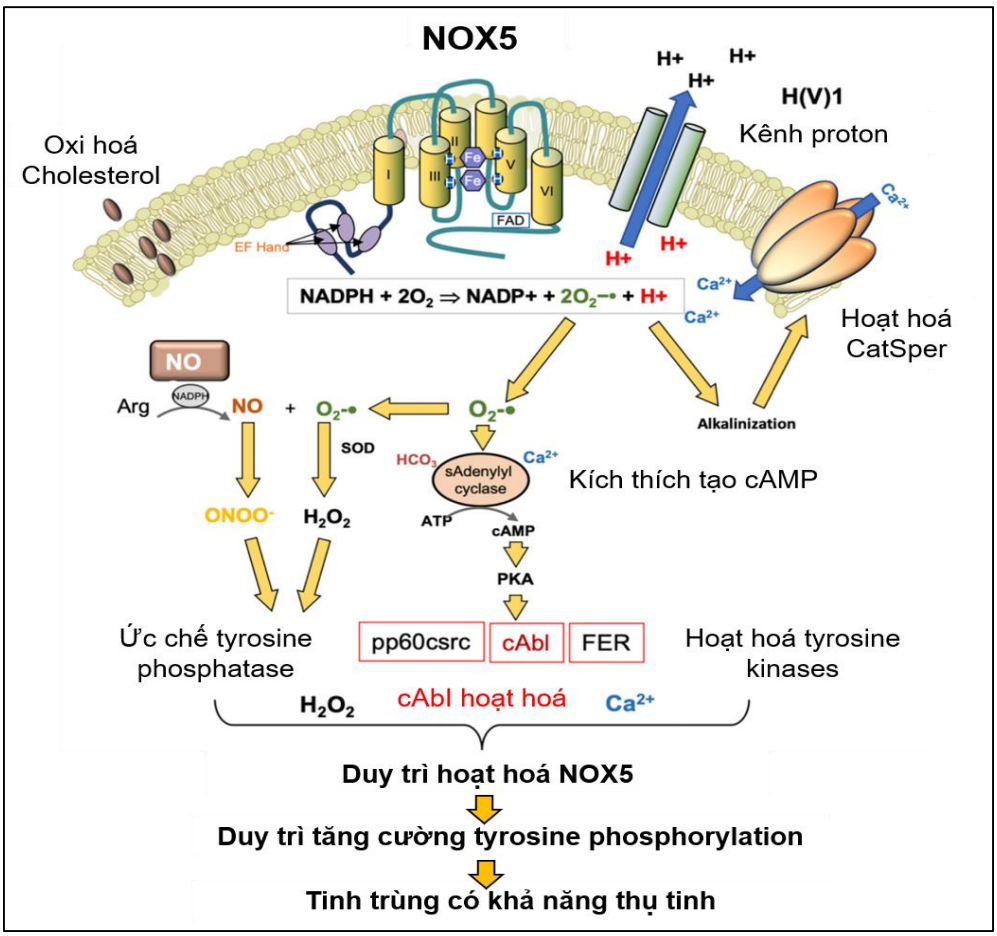
1.4.2.3. Nguồn gốc từ NAD(P)H oxy hóa

Một nguồn khác tạo nên ROS ở tinh trùng người chính là các NADPH oxy hoá (NOX5). Vai trò quan trọng của NOX5 thể hiện qua mức độ biểu hiện cao trong tinh trùng của những nam giới có tinh trùng kém di động cùng với sự tăng cường của các superoxide, hydrogen peroxide và sự phá huỷ DNA [78]. Biểu hiện của NOX5 cũng tăng cao trong những bệnh nhân có tinh trùng hình dạng bất thường. Về mặt sinh lý, các kênh proton H(V)1 vốn dĩ có chức năng điều tiết độ di động của tinh trùng, nhưng các kênh này lại cần thiết cho việc sản sinh các superoxide

thông qua NOX5 nhằm chống lại mức độ acid của tế bào chất. Phương trình cụ thể như sau:

$$NADPH + 2O_2 => NADP^+ + 2O_2^{-\cdot} + H^+$$

Hơn nữa, có bằng chứng cho thấy NOX5 và H(V)1 có liên quan trong việc tạo ra tín hiệu canxi thông qua Catsper để đáp ứng với kích thích progesterone [79], một lần nữa phản ánh thực tế là hoạt động của kênh canxi này rất nhạy cảm với những thay đổi về độ pH và NOX5 đạt được kiềm hóa nội bào bằng cách kích hoạt kênh proton H(V)1. Như vậy, có thể NOX5 là chất điều chỉnh chính chức năng tinh trùng cũng như tiềm năng trung gian của stress oxy hóa và bệnh lý tinh trùng . Tuy nhiên, vẫn còn chưa rõ cơ chế tại sao hoạt động của NOX5 lại tăng cao trong tinh trùng của nam giới vô sinh. Có thể cho rằng tốc độ cung cấp NADPH bị giới hạn trong tình huống này và đồng thời các tế bào sở hữu một lượng lớn tế bào chất còn sót lại có thể thúc đẩy hoạt động oxy hóa bởi vì chúng được cung cấp quá nhiều glucose-6-phosphate dehydrogenase, một chìa khóa chịu trách nhiệm cho điều hòa tạo NADPH. Tuy nhiên cũng chưa rõ làm thế nào tinh trùng chuột có lại thể hiện mối quan hệ tương tự giữa cAMP, sự tạo thành ROS và khả năng thụ tinh của chúng [80] nhưng chúng không sở hữu NOX5 - như vậy có thể thấy vai trò của các chất oxy hoá khác tồn tại ở loài này.



Hình 1.3. Tiềm năng của NOX5 trong điều chỉnh khả năng thụ tinh của tinh trùng.

NOX5 xúc tác tạo ra các ion âm và proton superoxide. Các proton superoxide kích hoạt kênh proton H(V)1 dẫn tới các proton vận chuyển ra ngoài tế bào và gây kiềm hoá tế bào chất. Sự thay đổi pH này hoạt hoá kênh CatSperm và tế bào nhận thêm calcium, từ đó càng thúc đẩy hơn nữa hoạt động của NOX5. Các ion âm superoxide cũng tham gia quá trình kích hoạt adenylyl cyclase hoà tan và sự tạo thành cAMP, từ đó tiếp tục kích hoạt PKA và tyrosine kinase. Một trong những kinase được kích hoạt là cAbl lại tiếp tục kích thích NOX5. Kết quả của chuỗi các kích thích này giúp duy trì trạng thái hoạt hoá liên tục của NOX5, tiếp tục điều khiển chuỗi tyrosine phosphoryl hoá và cuối cùng duy trì trạng thái tốt nhất của tinh trùng [81].

1.4.3. Đa dạng di truyền một số gen chống oxy hóa liên quan đến vô sinh nam

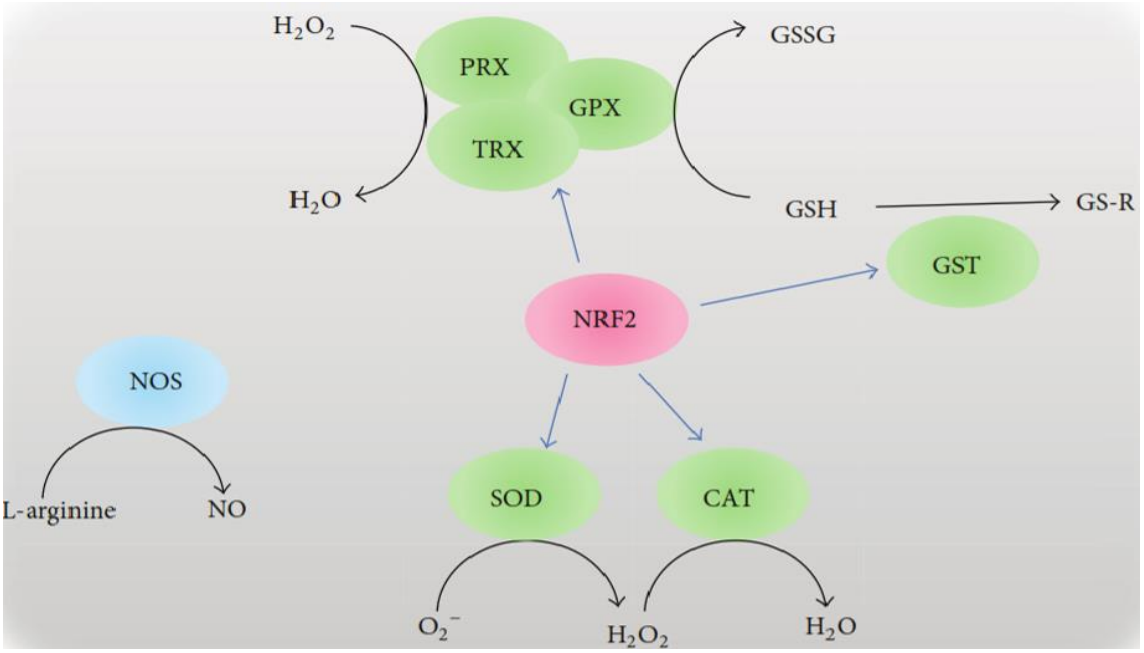
Con đường tín hiệu của yếu tố liên quan yếu tố nhân (nuclear factor erythroid 2-related factor-NRF2) và chức năng điều hòa các enzyme chống oxy hóa của con

đường này đã được báo cáo là đóng vai trò then chốt trong hàng rào chống stress oxy hóa của quá trình sinh tinh và thụ tinh [82, 83]. Một số enzyme chống oxy hóa khác như superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) và catalase (CAT) tồn tại lượng lớn trong tinh dịch hoặc các tế bào tinh trùng. Hầu hết các gen mã hóa cho các enzyme nói trên bao gồm *NRF2*, *SOD*, *CAT*, *GST*, *GPX* và *NOS* đều mang nhiều biến thể, mà từ đó dẫn đến hiện tượng vô sinh nam.

Các biến thể di truyền là một yếu tố 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. Trong tình hình tỉ lệ vô sinh nam tiếp tục gia tăng, những khảo sát về mối liên hệ của tình trạng vô sinh nam với các biến thể di truyền của các gen chống oxy hóa không những giúp tìm hiểu mạng lưới chống oxy hóa liên quan đến ROS mà đồng thời có thể khám phá ra những dấu ấn phân tử tiềm năng cho chẩn đoán cũng như đánh giá nguy cơ vô sinh nam trong thực hành lâm sàng.

Các enzyme chống oxy hóa trong quá trình sinh tinh

Như đã trình bày ở nội dung trước, 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*, *GPX*, *GST*, 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 (Hình 1.4 và Bảng 1.1).



Hình 1.4. Một số enzyme chống oxy hóa quan trọng đối với quá trình sinh tinh.

NRF2 điều hòa sự biểu hiện của rất nhiều enzyme chống oxy hóa bao gồm peroxydoxin (PRX), thioredoxin (TRX), glutathion peroxidase (GPX), glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutasese (SOD) và catalase (CAT). Nguồn gốc của các ROS là các ion âm superoxide (O2-), từ đó có thể được chuyển thành H2O2 thông qua sự xúc tác của SOD. Đồng thời H2O2 có thể được phân hủy thành H2O thông qua CAT, TPX hoặc PRX. Các GST tham gia chuyển hóa các mối liên kết của GSH dạng khử thành các cơ chất khác. NOS xúc tác cho sự tạo thành NO từ L-arginine.

Bảng 1.1. Các enzyme chống oxy hóa chính trong quá trình sinh tinh

Enzyme	**Tên**	**Đồng phân ở người**	**TLTK**
NRF2	Nuclear factor rythroid 2-related factor	NRF2	[84]
SOD	Superoxide dismutase	SOD1, SOD2, SOD3	[85]
CAT	Catalase	CAT	[66]
NOS	Nitric oxide synthase	NOS-1, NOS-2, NOS-3	[86]
GST	Glutathione S-transferase	GSTA1-GSTA5, GSTZ1, GSTM1-	[87]

		GSTM5, GSTO1-GSTO2, GSTP1, GSTT1-GSTT4	
PRX	Peroxiredoxin	PRX1-PRX6	[88, 89]
GPX	Glutathione peroxidase	GPX1-GPX8	[90]
TRX	Thioredoxin	TRX1, TRX2	[91]

Enzyme NRF2 là enzyme then chốt trong hàng rào chống oxy hóa, đây là yếu tố phiên mã kích thích các enzyme chống oxy hóa thông qua yếu tố đáp ứng với stress oxy hóa (Antioxidant response element-ARE). Trong phản ứng với tình trạng stress oxy hóa, NRF2 liên kết với ARE, trở thành trung gian cho quá trình hoạt hóa phiên mã các gen đáp ứng và điều chỉnh các cơ chế bảo vệ *in vivo* khỏi tác hại của quá trình oxy hóa. Trong số nhóm gen được điều hòa bởi con đường tín hiệu NRF2-ARE, SOD và CAT là các enzym có chức năng bảo vệ tinh trùng khỏi tác hại của stress oxy hóa gây ra bởi superoxide và H_2O_2. Nhóm SOD tham gia xúc tác cho phản ứng dị phân superoxide tạo thành O_2 hoặc H_2O_2. Ba họ enzyme SOD bao gồm SOD1 (dạng tan), SOD2 (tồn tại ở ty thể) và SOD3 (ngoại bào), trong số đó thì enzyme SOD2 biểu hiện mạnh ở tinh dịch. Đối với enzyme CAT, nhóm này đóng vai trò xúc tác cho sự phân hủy H_2O_2 thành O_2 và H_2O, từ đó giúp ổn định lượng ROS ở mức độ bình thường và bảo vệ các tế bào tinh trùng khỏi nguy cơ bị ngộ độc bởi các ROS.

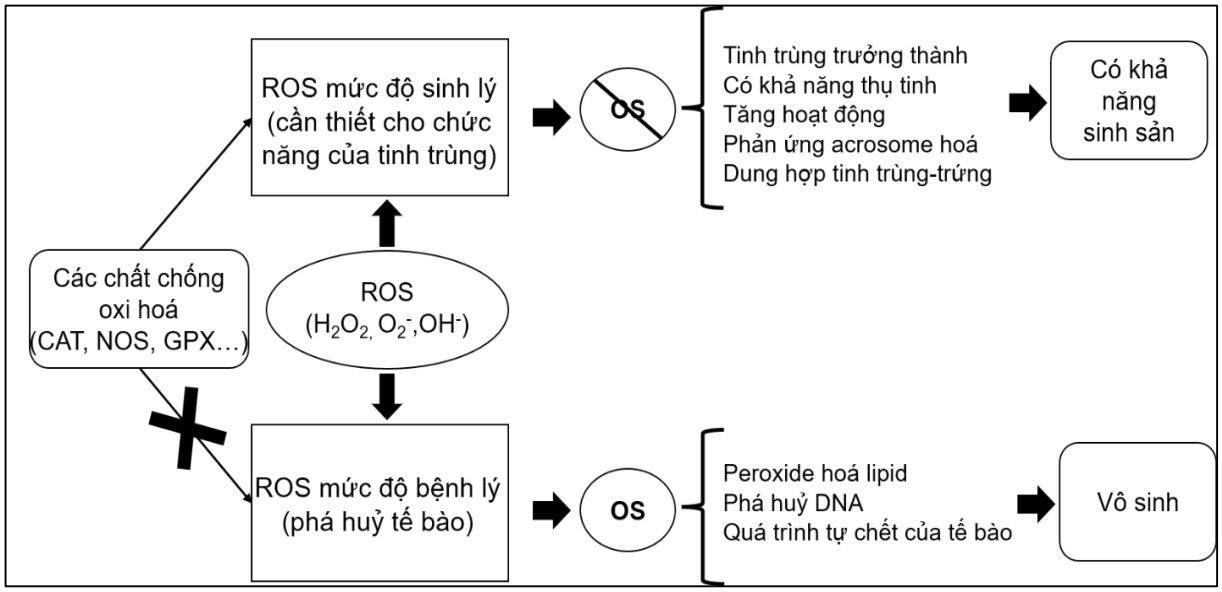
Đối với NOS, đây là một họ gồm các enzyme xúc tác cho quá trình hình thành NO từ L-arginine, đây là chất chống oxy hóa nhờ loại bỏ các ROS khi ở nồng độ thấp [92]. Vai trò của NO trong tính di động của tinh trùng và ảnh hưởng của NO lên khả năng sinh sản đã được chứng minh trong khả năng di chuyển và tỷ lệ sống của tinh trùng, quá trình trao đổi chất và phản ứng acrosome. Có ba isoenzyme thuộc họ NOS đã được xác định ở động vật có vú, bao gồm NOS thần kinh (nNOS; NOS1), NOS cảm ứng (iNOS; NOS2) và NOS nội mô (eNOS; NOS3) [93].

Các GST là các protein tồn tại phong phú ở tế bào chất, có chức năng xúc tác cho sự gắn kết của GSH với các cơ chất tích điện ngoại lai, quá trình này thường

tạo ROS *in vivo*. Họ protein GST bao gồm 3 siêu họ như sau: thuộc tế bào chất, thuộc ty thể và thuộc microsome. Ở người, các GST bao gồm GSTK1 (ty thể), MGST1-MGST3 (microsome) và GSTA1-GSTA5, GSTZ1, GSTM1-GSTM5, GSTO1-GSTO2, GSTP1 và GSTT1-GSTT4 (tế bào chất) [94].

TPX, PRX và GRX là các enzyme tham gia vào quá trình khử các nhóm thiol trong tế bào. TRX và GRX đồng thời xúc tác cho phản ứng khử các protein chứa lượng nhỏ các disulfide [95]. TRX1 nằm ở khu vực tế bào chất và nhân, trong khi đó TRX2 biểu hiện chính ở ty thế. Các enzyme PRX là một nhóm enzyme oxy hóa mạnh với lượng lớn nhằm tách hydroperoxidase và H_2O_2. Họ protein GPX xúc tác cho phản ứng khử thiol với glutathione [90]. Trong số các protein thuộc họ này, GPX4 biểu hiện mạnh ở tinh hoàn và hiện nay được coi là yếu tố rất quan trọng đối với quá trình sinh tinh. Trong khi đó GPX5 lại chỉ biểu hiện đặc trưng ở mào tinh hoàn và có khả năng đóng vai trò duy trì tính toàn vẹn của DNA tinh trùng [96].

Một số nghiên cứu trên mô hình động vật đã khẳng định thêm các mRNA mã hóa cho một số gen chống oxy hóa có thể được duy trì với mức độ ổn định trong tinh hoàn của chuột [97]. Ví dụ như mức mRNA của *SOD2* được điều chỉnh để đạt mức biểu hiện cao nhất trong giai đoạn kỳ sau của giảm phân ở các tế bào sinh dục, trong khi đó thì mức độ mRNA của *GPX* và *CAT* lại khá ổn định [97]. TPX và PRX lại biểu hiện mạnh ở tinh hoàn và chức năng của 2 enzyme này trong quá trình sinh tinh đã được nghiên cứu sâu trên mô hình chuột thông qua cơ chế bất hoạt gen [88, 91]. Tóm lại, các gen chống oxy hóa bao gồm *NRF2*, *GPX*, *PRX*, *GRX*, *TRX* và *NOS* đóng vai trò ở những giai đoạn khác nhau trong quá trình sinh tinh, và những khiếm khuyết trong biểu hiện của các gen này đều có thể góp phần đáng kể vào tiến triển của căn bệnh vô sinh nam.



Hình 1.5. Liên hệ giữa các enzyme chống oxy hoá, stress oxy hoá và vô sinh nam
Các enzyme chống oxy hoá như CAT, NOS, GPX… giúp cân bằng các ROS ở mức độ sinh lý. Trường hợp thiếu hụt các enzyme chống oxy hoá, ROS trở nên dư thừa và gây nên tình trạng stress oxy hoá, dẫn tới vô sinh thông qua các quá trình peroxide hoá lipid, phá huỷ DNA tinh trùng và tế bào tự chết [98].

NRF2

Thiếu hụt chức năng NRF2 đã được chứng minh là có ảnh hưởng tới quá trình sinh tinh và phụ thuộc độ tuổi trên mô hình chuột knock-out [83]. Một nghiên cứu về cơ chế đã chỉ ra rằng chuột bị knoc-out gen *Nrf2* có mức độ peroxy hóa lipid cao trong tinh hoàn và mào tinh hoàn của chúng. Mặt khác tốc độ tự chết của các tế bào mầm sinh tinh tăng lên và các chất chống oxy hóa giảm xuống so với những con chuột không mang đột biến ở cùng độ tuổi [83].

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 [99]. Hơn nữa, kiểu gen *NRF2* rs6721961 TT tồn tại với tần số cao hơn ở những người nghiện thuốc lá, có chất lượng tinh dịch kém hơn so với những người mà chất lượng tinh dịch tốt hơn. Đồng thời những người nghiện thuốc lá mang kiểu gen *NRF2* rs6721961 TT cũng cho thấy mật độ và số lượng tinh trùng

trong tinh dịch kém hơn so với những người nghiện thuốc lá nhưng không mang kiểu gen này [84].

Ở mức độ mRNA, biểu hiện của *NRF2* ở nhóm vô sinh nam thấp hơn so với nhóm đối chứng [100], đồng thời cũng có mối liên hệ giữa mức độ biểu hiện của *NRF2* mRNA và những thông số đặc thù của tinh trùng như nồng độ, độ di động, và tỉ lệ sống [100]. Đáng chú ý, một protein là DJ-1 giúp ổn định NRF2 cũng có liên quan tới tình trạng vô sinh nam. Cụ thể, nồng độ của DJ-1 trong các tế bào tinh trùng thuộc nhóm bệnh nhân tinh trùng yếu thấp hơn so với nhóm đối chứng khỏe mạnh [101]. Do vậy, biến thể gen ảnh hưởng tới chức năng và mức độ biểu hiện của *NRF2* cũng như những yếu tố điều hòa protein này đều có mối liên hệ mật thiết tới sự bất thường trong quá trình sinh tinh ở nam giới.

GST

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 một quần thể phía bắc Ấn Độ, khảo sát cho thấy kiểu gen *GSTT1* null có liên quan tới tình trạng vô tinh mà không do tắc nghẽn ống dẫn tinh [102]. Tại Đài Loan, những bệnh nhân mắc bệnh giãn tĩnh mạch thừng tinh mang kiểu gen *GSTM1* null có mức độ 8-OhdG trong DNA tinh trùng cao hơn và lượng các thiol cùng với acid ascobic trong tinh dịch thấp hơn so với những bệnh nhân mang gen *GSTM1* kiểu dại [103].

Ở quần thể người Thổ Nhĩ Kỳ, tác động có hại của stress oxy hóa đến tinh trùng được đánh giá là cao hơn ở những bệnh nhân có kiểu gen *GSTM1*-null so với nhóm đối chứng mang 2 bản sao bình thường của gen này [104]. Nghiên cứu trên quần thể người Trung Quốc cho thấy các kiểu gen *GSTM1* null và *GSTT1* null là yếu tố gây tăng nguy cơ nhạy cảm với sự suy yếu của quá trình sinh tinh như chứng vô tinh vô căn hoặc tinh mật độ tinh trùng thấp [105, 106].

Các enzym GST rất quan trọng trong việc bảo vệ tinh trùng từ việc bảo quản lạnh tinh dịch, vì quá trình này có thể tạo ra lượng lớn ROS. Trong tinh dịch bò đực đông lạnh đã rã đông, một biến thể rs135955605 trong gen *GSTM1* có liên quan

đến hàm lượng ATP của tế bào và tổng số tinh trùng nhu động [33]. Do đó, các biến thể di truyền trong nhóm các gen *GST* có thể ảnh hưởng đến khả năng sinh sản của nam giới, bao gồm cả chất lượng tinh trùng và kết quả của bảo quản lạnh tinh dịch.

GPX

Có ba dạng đồng phân của prtotein GPX khu trú ở những vị trí khác nhau trong tế bào là tế bào chất, ty thể và nhân. Nghiên cứu trên mô hình chuột cho thấy, protein GPX4 thuộc tế bào chất rất cần thiết cho sự phát triển của phôi thai và quá trình sinh tinh [53], và mất GPX4 trong ty thể (mGPX4) cũng gây vô sinh ở chuột đực. Điều này dẫn đến làm suy giảm chất lượng tinh trùng và các bất thường về cấu trúc nghiêm trọng, giảm khả năng vận động của tinh trùng và chức năng màng ty thể [52, 88].

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 [90]. Một nghiên cứu khác đã gợi ý rằng sự biểu hiện của PHGPx-một selenoprotein thuộc về họ peroxidase glutathione, có thể liên quan đến giảm số lượng và khả năng di chuyển của tinh trùng. Tuy nhiên, cho đến nay, không có đa hình nào của *GPX* được báo cáo là có liên quan đến vô sinh nam [91]. Bởi vậy, cần truy tìm các biến thể *GPX4* trên quy mô lớn hơn nhằm đưa ra kết luận về nguyên nhân tiềm ẩn của vô sinh nam liên quan đến gen này.

SOD

Hoạt động của SOD được biết đến là có mối tương quan thuận với mật độ tinh trùng và khả năng vận động của tinh trùng, nhưng lại có mối liên hệ nghịch với sự phân mảnh DNA của tinh trùng. 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 [107]. Trong các nghiên cứu bệnh-chứng, sự có mặt của Ala-MnSOD allele làm tăng nguy cơ vô sinh nam [108]. Những nam giới mang kiểu gen *SOD2* c.47CC cũng thể hiện mức hoạt tính thấp của enzyme tương ứng. Ở một quần thể người Trung Quốc, khảo sát về biến thể rs4880 của *SOD2* cho thấy biến thể di truyền này không những gây tăng nguy cơ vô sinh mà

còn làm tăng mức độ phân mảnh của DNA tinh trùng cũng như giảm hoạt tính của enzyme SOD [108, 109]. Trên mô hình chuột, người ta đã xác định được SOD đóng vai trò quan trọng đối với sự phát triển của tinh hoàn cũng như quá trình sinh tinh. Những bản phiên mã của *SOD* được phát hiện với mức độ nhiều nhất ở các ống dẫn tinh, ở giai đoạn ngay trước thời điểm các tinh trùng trưởng thành được giải phóng từ các tế bào Sertoli vào lòng ống dẫn tinh [110]. Trên mô hình ruồi giấm, những đột biến mất chức năng hoàn toàn của *Sod* dẫn tới vô sinh ở chuột đực, đồng thời gen chuyển *Sod1* của bò đã giúp khắc phục kiểu hình vô sinh ở chuột đực [111]. Bên cạnh đó, sự suy giảm nhanh chóng các tế bào sinh tinh đã được quan sát thấy ở chuột bị knockout *Sod1* trong tình trạng chịu căng thẳng nhiệt [112]. Bởi vậy, sự bất hoạt hoặc mang các biến thể gây ảnh hưởng tới chức năng trong các gen *SOD1* và *SOD2* đều có thể dẫn tới những bất thường trong quá trình sinh tinh.

NOS

Trong tinh hoàn, NOS chịu trách nhiệm sản xuất NO trong suốt quá trình sinh tinh. Đồng thời những biến đổi di truyền của NOS có thể là yếu tố tiềm ẩn gây sai hỏng quá trình sinh tinh. Một số allele của *NOS* đã được báo cáo là liên quan tới giảm chức năng của tinh trùng. Ở những nam giới vô sinh người Hy Lạp, có mối tương quan giữa các biến thể -786T>C và c.894G>T (p.298Glu>Asp) với sự suy giảm các đặc điểm lâm sàng quan trọng của tinh trùng, đồng thời mức độ stress oxy hóa của tinh trùng cũng tăng lên [113]. Nghiên cứu trên quần thể người Ý cũng cho thấy biến thể c.894G>T (p.298Glu>Asp) có liên hệ với suy giảm độ di động của tinh trùng [114]. Những bằng chứng này cũng đã được lặp lại khi nghiên cứu trên quần thể người Trung Quốc.

CAT

Hoạt động của các enzyme thủy phân đã được chứng minh là có mối liên quan tới chất lượng tinh trùng kém [115, 116]. Đồng thời một nghiên cứu đã báo cáo rằng kiểu gen *CAT* -262TT có mối quan hệ nghịch với khả năng sinh sản ở những nam giới vô sinh vô căn [115].

Một số biến thể di truyền là yếu tố nguy cơ gây vô sinh nam thuộc nhóm các gen mã hoá cho các enzyme cần thiết bảo vệ cơ thể khỏi stress oxy hoá được tổng hợp tại Bảng 1.2.

Bảng 1.2. Những biến thể di truyền thuộc các gen mã hóa cho enzyme chống oxy hóa liên quan đến vô sinh nam

Gene	Biến thể	Ảnh hưởng	Chú thích	TLTK
NRF2	Xoá gen	Vô sinh	Chuột	[83]
	rs6721961 g.178130037T>G	Tinh trùng yếu	Người	[99]
	rs35652124 g.178130073T>C	Tinh trùng yếu	Người	[99]
GST	Xoá gen *GSTM1*	Vô sinh, tinh trùng yếu, giãn tĩnh mạch thừng tinh	Người	[102, 103, 106, 117]
	Xoá gen *GSTT1*	Vô sinh, giãn tĩnh mạch thừng tinh	Người	[118]
	GSTM1 rs135955605 C>G	Nhu động của tinh trùng sau bảo quản lạnh	Bò	[119]
	GSTP1 p.*105*Ile>Val	Vô sinh, thiểu tinh, vô tinh	Người	[120]
	GSTP1 p.114Ala>Val	Vô sinh kèm theo giãn tĩnh mạch thừng tinh	Người	
SOD	*SOD2* rs4880 c.47CC	Vô sinh vô căn, mật độ tinh trùng, độ nhu động của tinh trùng, phân mảnh DNA của tinh trùng	Người	[121]

	Xoá gen *SOD1*	Phá huỷ tế bào tinh trùng khi chịu stress nhiệt	Chuột	[112]
CAT	-262C>T	Vô sinh vô căn	Người	[115]
NOS	*eNOS* 786C>T	Vô sinh vô căn	Người	[122]
	eNOS 894G>T	Tinh trùng yếu, vô sinh vô căn	Người	
GPX	Xoá *GPX4*	Vô sinh, cô đặc chất nhiễm sắc của tinh trùng	Chuột	[123]
	Xoá *GPX5*	Độ toàn vẹn của tinh trùng	Chuột	[96]

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

1.5.1. Những hướng nghiên cứu về nguyên nhân di truyền của bệnh vô sinh nam 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 [124]. 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*.

Lập nhiễm sắc thể đồ: Hội chứng Klinefelter là hội chứng thường bắt gặp bất thường nhiễm sắc thể nhất. Bất thường di truyền gây ra hội chứng Klinefelter ảnh hưởng đến 1:660 nam giới và cũng là nguyên nhân di truyền phổ biến nhất của nam giới vô tinh không do tắc nghẽn. Ngoài ra, nam giới mắc hội chứng de la Chappelle với bộ nhiễm sắc thể 46 XX là một hội chứng hiếm gặp với tỉ lệ 1:20.000 nam giới. Nguyên nhân do một vùng trên nhiễm sắc thể Y bao gồm cả gen *SRY* bị chuyển sang một nhiễm sắc thể thường khác trong quá trình giảm phân [125]. Có những bằng chứng thuyết phục cho thấy bất thường nhiễm sắc thể phổ biến ở nhóm nam giới thiểu tinh và vô tinh so với nhóm đối chứng (0,4% ở quần thể chung, 3,6% ở nam giới thiểu tinh và 15% ở nam giới vô tinh) [126]. Tuy vậy, phương pháp lập

nhiễm sắc thể đồ có hạn chế là độ phân giải thấp, không thể phát hiện được các đột biến điểm, dịch khung hay các vi mất đoạn.

Xét nghiệm vi mất đoạn trên nhiễm sắc thể Y: Khoảng 90% chiều dài của nhiễm sắc thể Y chứa các vật chất di truyền đặc trưng cho giới tính nam, có khoảng 80 gen chịu trách nhiệm quan trọng đối với sự phát triển giới tính và quá trình sinh tinh [127]. Vùng trình tự quan trọng nhất có thể kể đến là vùng chứa yếu tố gây vô tinh (AZF) bao gồm ba phân vùng là: *AZFa, AZFb* và *AZFc* có kích thước khoảng 1,5 Mb. Các vi mất đoạn không thể phát hiện được bằng việc lập nhiễm sắc thể đồ mà cần phải thực hiện kĩ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu. Cho tới nay, Viện Hàn lâm nam khoa Châu Âu và Mạng lưới di truyền phân tử Châu Âu đã có chỉ dẫn về 6 cặp mồi đặc hiệu cho các gen *AZFa, AZFb, AZFc,* với các kết quả lặp lại khả quan giữa nhiều phòng thí nghiệm [128]. Có khoảng 7,5% nam giới vô tinh và thiểu tinh mang vi mất đoạn trên nhiễm sắc thể Y, con số này cũng dao động giữa các quần thể khác nhau trên thế giới. Tỉ lệ này cao hơn ở nhóm nam giới vô tinh không do tắc nghẽn và thiểu tinh nặng (10-15%) [129].

Sàng lọc đột biến gen *CFTR*: có khoảng 80% nam giới được chẩn đoán không có ống dẫn tinh bẩm sinh (một hoặc hai bên) mang đột biến trên gen *CFTR*. Cho tới nay có hơn 2000 biến thể di truyền thuộc gen này đã được báo cáo với những quan sát kiểu hình đa dạng từ nhẹ đến nghiêm trọng [130]. Biến thể của CFTR được xác định bằng cách giải trình tự gen trực tiếp. Hiện nay có nhiều kit xét nghiệm đã được thương mại hoá có khả năng sàng lọc từ 20-60 biến thể phổ biến nhất trong gen này [131]. Công nghệ giải trình tự thế hệ mới đã cải thiện đáng kể tính chính xác trong chẩn đoán và giảm giá thành xét nghiệm [132].

Có thể thấy các xét nghiệm di truyền là một công cụ không thể thiếu trong quá trình theo dõi, chẩn đoán và điều trị vô sinh nam những vẫn còn những trường hợp không thể xác định được nguyên nhân vô sinh. 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).

Nghiên cứu liên kết toàn bộ hệ gen (Genome Wide Association Study-GWAS) là hướng nghiên cứu dựa trên nền tảng SNP array đã được áp dụng trong nghiên cứu về vô sinh nam gần đây. Nhiều locus gen mới liên quan tới đặc điểm vô sinh nam đã được phát hiện từ các nghiên cứu GWAS. Trong một nghiên cứu thuần tập lớn ở nam giới châu Âu, 172 biến thể gen ứng viên liên quan đến đặc điểm thiểu tinh hoặc vô tinh đã được khảo sát. Kết quả phân tích thống kê xác định được một số SNP có mối liên hệ đạt mức ý nghĩa thống kê với tình trạng thiểu tinh hoặc vô tinh [133]. Một nghiên cứu GWAS khác đã phát hiện các gen ứng viên có mối liên hệ với đặc điểm vô sinh nam, trong đó có 9 SNP được xác định là liên quan tới tình trạng giảm khả năng sinh sản [134]. Trong các năm 2011 và 2014, hai nghiên cứu GWAS quy mô lớn trên quần thể người Trung Quốc lần đầu tiên xác nhận một số locus gen mới có mối liên quan tới đặc điểm vô tinh không có nguyên nhân do tắc ống dẫn tinh. Nghiên cứu trên 2.927 bệnh nhân vô tinh không do tắc nghẽn ống dân tinh và 5.734 đối chứng cho thấy mối liên hệ có ý nghĩa thống kê giữa nguy cơ mắc bệnh với một số các biến thể bao gồm *PRMT6* (rs12097821), *PEX10* (rs2477686) và *SOX5* (rs10842262) [135]. Giai đoạn sau đó, kiểm chứng rộng hơn với 3.608 ca vô sinh nam không do tắc nghẽn ống dẫn tinh và 5.909 đối chứng đã phát hiện những locus gen nguy cơ mới, trong đó có một gen mới là *GEK*, đây cũng là gen gây vô sinh trên mô hình ruồi giấm đực [136].

Tuy nhiên cho tới nay, các con đường tín hiệu chống oxy hóa tham gia vào đặc điểm vô sinh nam vẫn chưa được triển khai phân tích theo phương pháp GWAS. Ngoài ra, chỉ có một số tình trạng bệnh như vô tinh hoặc thiểu tinh là đã được khảo sát mối liên hệ kiểu gen-kiểu hình ở mức độ toàn hệ gen. Những rối loạn phổ biến như tinh trùng kém di động hay tinh trùng yếu vẫn chưa được quan tâm nghiên cứu. Dó đó, cần tiến hành áp dụng các công nghệ phân tích di truyền hiện đại trong những nghiên cứu về đa dạng di truyền các gen chống oxy hóa trong mối liên quan với các đặc điểm vô sinh nam ở mức độ toàn bộ hệ gen.

Exome array là một nền tảng khá mới, được tiến hành phân tích dựa trên dữ liệu giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hoá (Whole Exome Sequencing-WES). Không như SNP array, phương pháp này cho phép phân tích những biến thể di truyền với

tần số thấp hoặc hiếm trong vùng mã hoá. Một phân tích 240.000 biến thể có tần số dưới 5% thuộc vùng mã hoá trên 962 bệnh nhân vô tinh không do tắc nghẽn ống dẫn tinh và 1348 đối chứng khoẻ mạnh người Trung Quốc đã xác định ba yếu tố nguy cơ. Cụ thể là các biến thể rs2298090, rs200847762 và rs11754464 thuộc vùng 6p21.33 có liên quan đến nguy cơ vô tinh không do tắc ống dẫn tinh [137].

Lai so sánh hệ gen dựa trên microarray (aCGH-array Comperative Genomic Hybridization) là kĩ thuật thế mạnh trong việc phát hiện các biến thể về số lượng bản sao (Copy number variant-CNV). Các CNV là những phân đoạn NST mang ít nhất 1000 cặp bazo, và số lượng các CNV khác nhau giữa từng cá thể. Mất gen *AZF* là một ví dụ điển hình về ảnh hưởng của mất đoạn đến chức năng sinh tinh. Các nền tảng aCGH đã được áp dụng ở năm nghiên cứu khác nhau để xác định các CNV mới ở những bệnh nhân có rối loạn sinh tinh [23, 138-141]. Trong đó, phân tích CNV từ mẫu máu của 15 nam giới châu Âu vô tinh cho thấy mất đoạn bán hợp tử kích thước 90 kb, bao gồm một phần gen *TEX11* trên NST X ở một bệnh nhân vô tinh. Những nghiên cứu sau đó cũng giả định đột biến gen *TEX11* đã can thiệp vào quá trình giảm phân ở người và ở chuột [23, 142].

NGS là công nghệ giải trình tự thông lượng cao cho phép giải mã nhanh chóng và hiệu quả toàn bộ vùng mã hoá hoặc toàn bộ hệ gen người. Cơ sở dữ liệu tạo ra cho phép phân tích sàng lọc những yếu tố di truyền mới. Trong lĩnh vực vô sinh nam, giải trình tự 261 gen đích đã phát hiện 18 gen ứng viên mới liên quan đến suy sinh dục nam và hội chứng Kallmann. Đồng thời hai đột biến mới gây bệnh của gen *FGFR1* cũng đã được xác định [143]. WES đã được xem xét trong mục tiêu sàng lọc di truyền ở những khía cạnh nguyên nhân bệnh sinh khác nhau của quá trình sinh tinh (chất lượng, số lượng, tắc ống dẫn tinh, trục hạ đồi-tuyến yên). Phương pháp này đã chỉ ra một số gen ứng viên mới như *MAGEB4*, *SUN5*, *SRA1* và *ADGRD* [144-147].

Bên cạnh những chiến lược tiếp cận bằng nhiều phương pháp sàng lọc di truyền khác nhau nhằm làm sáng tỏ yếu tố gây bệnh/nguy cơ tiềm ẩn về mặt di truyền của bệnh vô sinh nam, stress oxy hoá và đa hình di truyền của các gen tham gia vào các con đường tín hiệu chống oxy hoá cũng đã được triển khai nghiên cứu

rất rộng rãi. Như đã trình bày ở những nội dung trước, một số biến thể phổ biến thuộc các gen *SOD, NOS, GST, NRF2, CAT* đã cho thấy bằng chứng có liên quan với vô sinh nam vô căn. Hầu hết những nghiên cứu trên nhóm gen chống oxy hoá đã được tiến hành khu trú ở những quần thể người nhất định. Trong tương lai, những kế hoạch hợp tác nghiên cứu mang tính tổng thể và toàn diện về các con đường tín hiệu sinh học then chốt của quá trình sinh tinh cũng như tập hợp số liệu từ đa trung tâm rất cần được lưu ý định hướng và tiếp tục khảo sát để cơ sở xây dựng nguyên nhân điều trị và sản xuất các chế phẩm điều trị vô sinh.

1.5.2. Những hướng nghiên cứu về vô sinh nam 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 [148]. Nghiên cứu này đã xác định được 12/30 nam giới vô sinh có mất đoạn gen *AZF* bao gồm cả vùng cơ bản và mở rộng bao gồm có *AZFb* và *AZFc*. Bên cạnh đó, mức độ đứt gãy DNA tinh trùng cũng được cho là yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh sản tự nhiên hoặc các trường hợp cần hỗ trợ sinh sản của nam giới. Nghiên cứu của Dương Thị Nhàn và cs đã báo cáo mối liên quan giữa mức độ phân mảnh của tinh trùng với độ di động và tỉ lệ sống của tinh trùng [149]. Cụ thể nhóm có tỉ lệ tinh trùng sống thấp (dưới 68%) có mức độ phân mảnh tinh trùng cao hơn đáng kể.

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 nguyên tố vi lượng (kẽm) hoặc fructose trong huyết thanh/tinh dịch với đặc điểm vô sinh nam [150, 151]. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ fructose trong tinh dịch có giá trị định hướng cho chẩn đoán vô sinh nam không có tinh trùng do tắc nghẽn [150]. Hướng nghiên cứu về đa hình di truyền một số gen như *FSIP2* rs4666689, *PON2* rs7493, *DNAH1* rs12163565 trong mối liên quan tới tình trạng vô sinh nam nguyên phát đã được tiến hành bởi Viện Nghiên cứu hệ gen kết hợp với Đại học Y Hà Nội. Tuy nhiên không có biến thể nào trong ba gen nói trên được báo cáo là có mối liên hệ với vô sinh nam [152, 153]. 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 [154]. Kết quả

nghiên cứu cho thấy các kiểu gen CT và TT của *NAT2* (481 C>T), GA và AA của *NAT2* (590 G>A), GA + AA của *GSTP1* (313G>A) và CT + TT của *GSTP1* (341C>T) là những yếu tố tăng nguy cơ của vô sinh nam. Mức độ stress oxy hoá của các mẫu tinh dịch cũng cao hơn ở những nam giới mang các biến thể gen này. Như vậy 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* và *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

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu bao gồm các nam giới trong độ tuổi sinh sản: 107 nam giới (tuổi từ 21-50) được chẩn đoán vô sinh nguyên phát và nhóm đối chứng là 85 nam giới có khả năng sinh sản (tuổi từ 23-43). Các tình nguyện viên tham gia nghiên cứu đã được kiểm tra các chỉ số tinh dịch đồ về mật độ, độ nhớt, tính di động, tỉ lệ sống và hình thái tinh trùng tại Trung tâm tư vấn di truyền thuộc Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

Đối với nhóm vô sinh nam, các xét nghiệm di truyền và tế bào học đã được thực hiện nhằm loại bỏ những nguyên nhân gây vô sinh do bất thường nhiễm sắc thể và những mất đoạn nhỏ trên nhiễm sắc thể Y. Ngoài ra, những đối tượng nam vô sinh mắc các bệnh có thể ảnh hưởng đến khả năng sinh sản như ung thư tiền liệt tuyến, đái tháo đường và giãn tĩnh mạch thừng tinh cũng được sàng lọc và loại bỏ khỏi nghiên cứu. Nghiên cứu này đã được thông qua bởi hội đồng Y đức thuộc Đại học Y Hà Nội (76/HMU-IRB). Mục tiêu và ý nghĩa của nghiên cũng như tính bảo mật của thông tin cá nhân và dữ liệu nghiên cứu đã được giải thích đầy đủ với các cá nhân tình nguyện viên trước khi tiến hành thu mẫu.

2.1.2. Xây dựng phiếu thu thập thông tin nghiên cứu

Mẫu phiếu thu thập thông tin được thiết lập trước giai đoạn thu mẫu, được sự tư vấn và xem xét của các chuyên gia di truyền y học từ Trung tâm tư vấn Di truyền thuộc Đại học Y Hà Nội. Hồ sơ bao gồm thông tin chi tiết của các tình nguyện viên tham gia nghiên cứu được bảo mật và lưu trữ tại Đại học Y Hà Nội.

Các thông tin/tiêu chí cụ thể trong phiếu thu thập thông tin và phiếu xét nghiệm nghiên cứu bao gồm:

- Thông tin hành chính bao gồm các dữ liệu về nhân khẩu học của các cặp vợ chồng: tuổi, năm kết hôn, nghề nghiệp đặc điểm lối sống của người chồng, bệnh mắc phải.
- Phiếu thông tin xét nghiệm tinh dịch đồ.
- Phiếu thông tin xét nghiệm stress oxy hóa.

Mẫu phiếu thu thập thông tin được xây dựng cho riêng nghiên cứu này và được sử dụng trong khai báo các thông tin hành chính cũng như khai thác tiền sử cá nhân/gia đình của nhóm bệnh nhân vô sinh (Phụ lục 1).

- Phần hành chính: Các bệnh nhân nam được lập hồ sơ bệnh án.

- Phần tiền sử: Bệnh nhân được phỏng vấn trực tiếp và trả lời đầy đủ các câu hỏi về tiền sử bản thân và gia đình, nghề nghiệp, môi trường làm việc, tiền sử mắc bệnh, nhiễm độc, chấn thương bộ phận sinh dục, tình trạng uống rượu, tình trạng hút thuốc lá, đặc điểm tiếp xúc với hóa chất, tia phóng xạ, mắc một số bệnh tật liên quan đến vô sinh.

- Xét nghiệm tinh dịch đồ được thực hiện tại Trung tâm tư vấn di truyền thuộc Bệnh viện Đại học Y Hà Nội với quy trình cụ thể như sau: Để đảm bảo tính chính xác của kết quả và chất lượng của tinh trùng, bệnh nhân được kiêng xuất tinh 3-5 ngày (ít nhất là 2 ngày, nhiều nhất là 7 ngày) và không sử dụng chất kích thích hay đồ uống có cồn trước khi lấy mẫu xét nghiệm. Mẫu tinh dịch được đựng trong lọ vô trùng đặc biệt và phân tích trong vòng 2 tiếng ngay sau khi đã hóa lỏng (ly giải) hoàn toàn. Sử dụng máy CASA để phân tích các chỉ số tinh dịch đồ bao gồm: tổng thể tích mẫu tinh dịch thu được, đặc điểm về hình dạng, độ nhớt, mật độ tinh trùng, số lượng tinh trùng di động, mức độ vận động của tinh trùng ... Tiêu chuẩn đánh giá chất lượng tinh trùng đã được xây dựng bởi Tổ chức Y tế thế giới - 2010 (World Health Organization-WHO) dựa trên chỉ số lâm sàng của những nam giới có khả năng sinh sản bình thường.

Bảng 2.1. Các chỉ số đánh giá chất lượng tinh trùng (Theo WHO 2010)

Chỉ số	Giá trị bình thường
Sự ly giải	Ly giải ở nhiệt độ thường trong 15-60 phút
Màu sắc	Xám đục hoặc trắng đục và có tính đồng nhất
Thể tích tinh dịch	>1,5 mL
Độ pH	≥ 7,2
Tổng số tinh trùng	≥ 29 x 10^6 tinh trùng/ lần xuất tinh
Mật độ tinh trùng	≥ 16 x 10^6/ml tinh dịch
Mức độ di động của tinh trùng -Di động tiến tới: PR -Di động không tiến tới NP -Mất động: NR	PR > 32% hoặc NP + PR > 40%
Tỉ lệ sống của tinh trùng	≥ 58%
Hình dạng tinh trùng	≥ 4% Các bộ phận đầu, cổ, đuôi bình thường

2.1.3. Thời gian và địa điểm tiến hành nghiên cứu

❖ Thời gian tiến hành nghiên cứu

- Từ tháng 1/2019-12/2020: thu thập mẫu vô sinh nam nguyên phát (107 mẫu) và nam giới khoẻ mạnh làm nhóm đối chứng (85 mẫu). Đánh giá mức độ stress oxy hoá của các mẫu tinh dịch thu được từ 107 bệnh nhân.
- Từ tháng 12/2020-8-2021: Xác định các SNP thuộc các gen *SOD1*, *SOD2*, *NOS3* và *CAT* từ mẫu máu của bệnh nhân vô sinh nam và nhóm đối chứng.

❖ Địa điểm tiến hành nghiên cứu:

- Mẫu máu và mẫu tinh dịch của các đối tượng nghiên cứu được thu thập tại Trung tâm tư vấn di truyền thuộc Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

- Các thí nghiệm được tiến hành tại Trung tâm tư vấn di truyền thuộc Bệnh viện Đại học Y Hà Nội và Phòng Phân tích hệ gen, Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.1.4. Tiêu chuẩn chọn mẫu nghiên cứu

- *Nhóm vô sinh nguyên phát:*
- Nam giới trong độ tuổi sinh sản, vô sinh không có tinh trùng hoặc tinh trùng ít (< 5 triệu/ml).
- Không rõ nguyên nhân vô sinh
- Đồng ý tham gia nghiên cứu
- *Nhóm đối chứng:*
- Nam giới trong độ tuổi sinh sản và không có bất thường nào về chức năng sinh sản
- Có ít nhất 01 con sinh học
- Đồng ý tham gia nghiên cứu
- *Tiêu chuẩn loại trừ:*

- Nam giới vô sinh đã được xác định nguyên nhân: mất đoạn nhỏ trên NST Y, có bất thường NST, tắc nghẽn đường dẫn tinh, giãn tĩnh mạch tinh...
- Nam giới đang mắc các bệnh cấp tính hoặc có vấn đề về sức khỏe tâm thần.
- Nam giới mắc các bệnh ảnh hưởng đến sức khỏe sinh sản.
- Những người không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Thiết kế nghiên cứu và cỡ mẫu nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu có nhóm bệnh và nhóm chứng cắt ngang

- Thiết kế nghiên cứu: Đây là nghiên cứu cắt ngang có đối chứng.

2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

- 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 α = 0,05 và β = 0,20 thì C = 7,85; OR: Tỉ số nguy cơ; p: tần số xuất hiện đa hình gen.

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành phân tích đa hình của các gen *SOD1*, *SOD2*, *CAT* và *NOS3*. Để đảm bảo số lượng cỡ mẫu phù hợp và có thể bao phủ được số lượng đa hình của cả 3 đa hình trên chúng tôi áp dụng tính OR và p theo nghiên cứu Aydes và CS [155] trên đa hình gen CYP1A1 với tần số xuất hiện p = 0,29 và OR= 3,9 đối với kiểu gen Ile/Val và Val/Val (đây là nghiên cứu có p và OR nhỏ nhất, do vậy cỡ mẫu sẽ lớn, đảm bảo được giá trị của nghiên cứu).

+ Thay các giá trị vào được n= 82,5, làm tròn là 83.

Thực tế, trong nghiên cứu này chúng tôi đã thực hiện trên nhóm vô sinh cho các gen *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *NOS3* là 107 và nhóm đối chứng là 85.

2.3. Dụng cụ và hóa chất trong nghiên cứu

2.3.1. Dụng cụ được sử dụng trong nghiên cứu

Các máy móc thiết bị sử dụng trong xét nghiệm tinh dịch đồ thuộc Trung tâm tư vấn di truyền thuộc Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Các thiết bị chính bao gồm: máy CASA, tủ đông -20^{o}C, tủ đông -80^{o}C.

Các máy móc, thiết bị các xét nghiệm sinh học phân tử trong nghiên cứu này thuộc Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, cụ thể như sau:

Các thiết bị sử dụng chính bao gồm:

Máy spindown (Wealtec, Mỹ), Máy vortex (Dragon, Trung Quốc), Tủ đông -20^{o}C (Sanaky, Trung Quốc), Cân kĩ thuật (Ohaus, Mỹ), Tủ mát có ngăn đông (Electrolux, Thụy Điển), Máy ly tâm (Eppendorf, Đức) và máy ly tâm lạnh đa năng (5810R-Đức), Máy PCR Mastercycler pro S (Đức), Máy điện di (Bio-Rad), Máy

soi gel và chụp ảnh tự động DigiDoc-It® Imaging System của Ultra-violet production (Mỹ), Máy cô quay chân không-SpeedVac (Eppendorf, Đức), Máy đo quang phổ (UV-Vis BioSpectrometer Basic, Đức), Máy đo huỳnh quang Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), Máy giải trình tự gen ABI 3500 Genetic Analyzer của (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

Các dụng cụ thí nghiệm được sử dụng bao gồm:

Ống chứa máu EDTA-K2 (Việt Nam), Hộp đựng mẫu (Simport, Canada), Micropipette đơn kênh và đa kênh (Eppendorf, Đức), stepper pipette (Eppendorf, Đức), combitips dùng cho stepper piptte (Eppendorf, Đức), Ống eppendorf đựng mẫu thể tích 1,5ml (Corning, Mỹ), ống ly tâm falcon thể tích 15ml-50ml (Biologix, Mỹ), Ống PCR (Sorenson, Mỹ), đầu côn 1000 µl, đầu côn 200 µl (Corning, Mỹ) và 10 µl (QSP, Mỹ), Đĩa chạy PCR 96 giếng (Biologix-Mỹ), Đĩa giải trình tự 96 giếng (ABI-Mỹ), Đĩa tinh sạch sản phẩm PCR 96 giếng (Merck-Milipore, Mỹ), Cột tinh sạch sản phẩm PCR (Omega Biotek, Mỹ). Hóa chất kiểm tra mức độ stress oxy hóa tinh dịch Oxisperm (Halotech, Tây Ban Nha).

2.3.2. Hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu bao gồm:

Kit tách chiết DNA tổng số Exgene^{TM} Blood SV mini Kit (GeneAll, Hàn Quốc), RNAse (Roche, Thụy Sĩ), Kit xác định nồng độ DNA tổng số Qubit dsDNA HS Assay (Life Technologies, Mỹ), hóa chất cho phản ứng PCR GreenTaq Mastermix (ThermoFisher Scientific, Mỹ), Hóa chất giải trình tự BigDye Terminator (ThermoFisher Scientific, Mỹ), Ethanol (Merck, Mỹ), DMSO (Bioworld, Mỹ), EDTA (Invitrogen, Mỹ), Nước khử ion (Life Technologies, Mỹ), Agrarose (Invitrogen, Mỹ), HiDi formamide (ThermoFisher Scientific, Mỹ), Mồi cho phản ứng PCR và giải trình tự (Phù Sa, Cần Thơ).

2.4. Phương pháp nghiên cứu

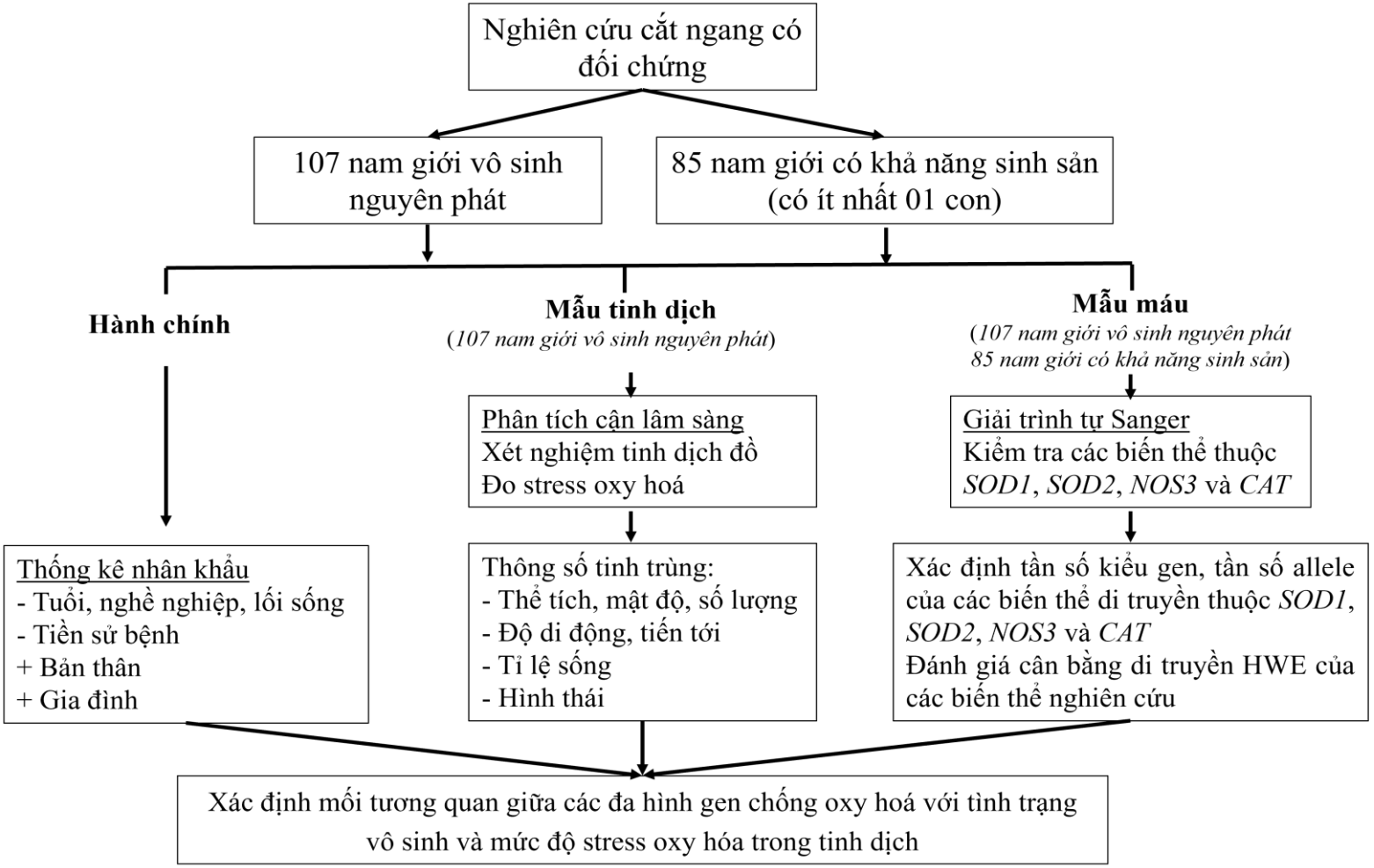
Nghiên cứu này được thực hiện trên cơ sở các phương pháp sau:

- Xét nghiệm tinh dịch đồ

- Phương pháp xác định tình trạng stress oxy hoá của các mẫu tinh trùng
- Phương pháp sinh học phân tử
- Phương pháp phân tích thống kê

Chi tiết các bước nghiên cứu được thể hiện ở Sơ đồ trong hình 2.1

Các bước trong quá trình thực hiện nghiên cứu được thể hiện trong sơ đồ sau:



Hình 2.1. Sơ đồ chi tiết thực hiện nghiên cứu

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

Để xác định mức độ stress oxy hóa, chúng tôi sử dụng bộ kit Oxisperm (Halotech, Tây Ban Nha). Bộ kit này cung cấp xét nghiệm nhằm đánh giá 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.

Nguyên lý chung của phương pháp dựa trên phản ứng của nitro tetrazolium (NBT) trong gel phản ứng (RG) của bộ kit với các phân tử liên quan đến tình trạng stress oxy hóa trong tinh dịch mà được chuyển đổi bởi các anion superoxide. Những phản ứng này sẽ tạo tinh thể màu xanh không tan trong nước gọi là formazan. Đối với tinh trùng, sản phẩm của phản ứng này gắn trên màng tinh trùng và có thể dễ dàng quan sát được dưới kính hiển vi quang học. Những tinh thể này có thể bắt màu trong gel phản ứng với dải màu từ vàng cho tới màu xanh tím ở các cấp độ đậm nhạt khác nhau. Quan sát bằng mắt thường thông qua sử dụng bảng màu cũng có thể định lượng tương đối kết quả (do vậy chỉ có thể thực hiện được trên những bệnh nhân có ít tinh trùng trong tinh dịch). Cường độ của màu sắc sẽ phản ánh mức độ stress oxy hóa của mẫu tinh dịch (thông qua mức độ dư thừa các anion superoxide).

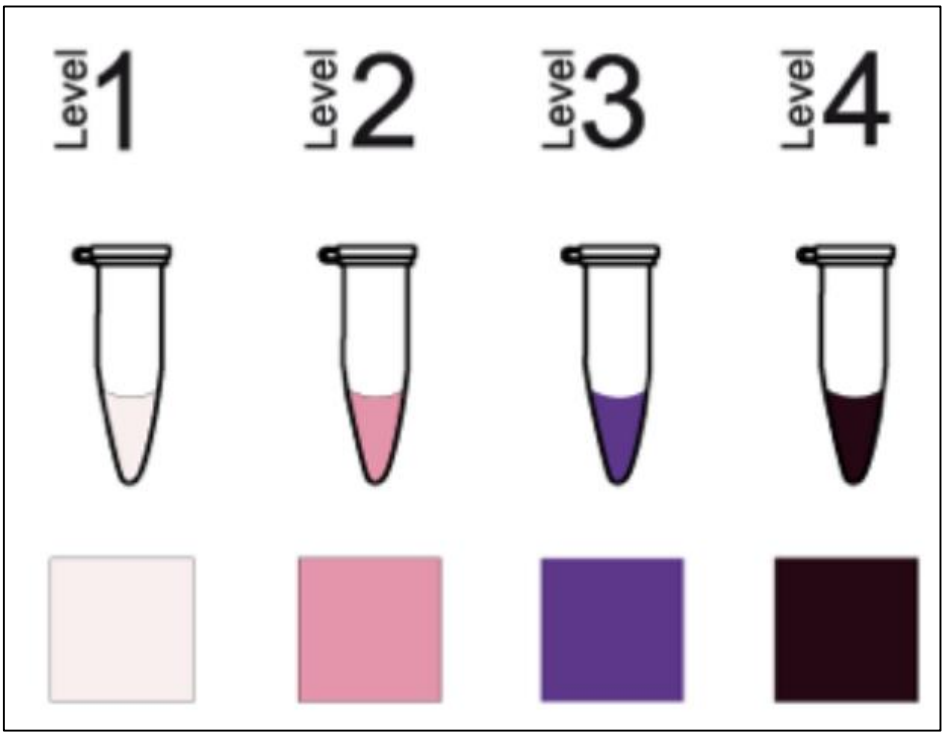
Quy trình cụ thể được thực hiện như sau:

- Hóa lỏng RG trong 1 phút với nhiệt độ cao nhất bằng lò vi sóng.
- Sau đó giảm nhiệt độ xuống 37^{o}C trong bể ổn nhiệt. Trộn RG với mẫu tinh dịch theo tỉ lệ 1:1, tránh tạo bọt.
- Ủ hỗn hợp này ở 37^{o}C trong 45 phút và đánh giá độ chuyển màu của hỗn hợp so với thang đo màu.
- Thể tích của tinh dịch cần dùng = 1000/mật độ tinh trùng (triệu)

Có 4 cấp độ bắt màu như sau (Hình 2.2):

+ Màu hồng nhạt: mức độ stress oxy hóa thấp
+ Màu hồng tím: mức độ stress oxy hóa trung bình thấp
+ Màu xanh tím: mức độ stress oxy hóa trung bình

+ Màu đen: mức độ stress oxy hóa cao



Hình 2.2. Các mức cường độ màu của stress oxy hóa.

Cấp độ 1 (hồng nhạt): stress oxy hóa thấp, cấp độ 2 (hồng đậm): stress oxy hóa trung bình thấp, cấp độ 3 (xanh lam): stress oxy hóa trung bình, cấp độ 4 (đen): stress oxy hóa cao.

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

Mẫu máu ngoại vi (2-3 ml mỗi người) được thu vào ống chứa máu EDTA K2/K3 và lưu ở -20^{o}C cho đến khi sử dụng. 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^{TM} Blood SV mini Kit (GeneAll, Hàn Quốc).

Quy trình cụ thể như sau:

Chuẩn bị 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) trong ống eppendorf 1,5 ml. Ống chứa máu được rã đông ở nhiệt độ phòng, bổ sung 200 µl máu vào ống eppendorf đã có Proteinase K, đồng thời bổ sung thêm 20 µl Rnase (20 mg/ml). Hỗn hợp được trộn đều bằng vortex và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 phút. Tiếp theo thêm 200 µl buffer

BL vào hỗn hợp và trộn đều, tiếp tục ủ ở 56^{o}C trong 10 phút. Thêm 200 µl ethanol 100% và trộn đều hỗn hợp, ly tâm nhanh sau đó chuyển hỗn hợp lên cột tách chiết và ly tâm với tốc độ 8000 rpm trong 1 phút. Cột tách chiết sau đó được chuyển sang ống thu mới, bổ sung thêm 600 µl buffer BW và ly tâm với tốc độ 8000 rpm trong 1 phút. Tiếp tục chuyển cột sang ống thu mới, bổ sung 700 µl buffer TW và ly tâm với tốc độ 8000 rpm trong 1 phút. Đổ bỏ dịch trong ống thu, tiếp tục ly tâm thêm 7000 rpm trong 2 phút để làm khô hoàn toàn cột. Lúc này tiếp tục chuyển cột sang ống eppendorf 1,5 ml mới. Bổ sung 60 µl buffer Tris-EDTA (TE) vào trung tâm ở đáy cột, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ly tâm với tốc độ 10.000 rpm trong 1 phút, nhiệt độ phòng để thu mẫu. Lúc này DNA tổng số đã hòa tan trong TE sau khi đi qua cột ở bước ly tâm cuối cùng. DNA tổng số sau khi tách chiết được điện di kiểm tra trên gel Agarose 0,8% và đo nồng độ.

Nồng độ DNA tổng số được đánh giá bằng bộ kit Qubit dsDNA HS Assay (Life Technologies, Mỹ). Đây là phương pháp có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn so với kiểm tra nồng độ DNA bằng cách đánh giá thường quy thông qua độ hấp thụ của phân tử ở bước sóng 260 nm. Thuốc nhuộm trong bộ kit sẽ kết hợp đặc hiệu với DNA mạch đôi và cường độ phát huỳnh quang sẽ tỉ lệ thuận với nồng độ DNA tổng số. Quy trình cụ thể như sau: pha loãng thuốc thử Qubit dsDNA HS Reagent trong dung dịch Qubit dsDNA HS Buffer (tỉ lệ 1:200), lúc này ta được dung dịch Qubit working. Bộ kit cung cấp 2 mẫu chuẩn đã biết trước nồng độ là Std#1 và Std#2. Đối với mẫu chuẩn, tỉ lệ thể tích của dung dịch Qubit working: mẫu là 190 µl: 10 µl. Đối với mẫu DNA tổng số, tỉ lệ thể tích của dung dịch Qubit working : mẫu là 198 µl : 2 µl. Tổng thể tích cuối cùng của mỗi ống chứa mẫu chuẩn/DNA tổng số với dung dịch chứa thuốc thử là 200 µl. Các ống mẫu được trộn đều, ủ trong ở nhiệt độ phòng trong 2 phút, tránh ánh sáng. Nồng độ DNA tổng số được đo bởi máy Qubit 2.0 Fluorometer, cường độ phát huỳnh quang sẽ tỉ lệ thuận với nồng độ của DNA mạch đôi. Từ đây, máy đo sẽ tính toán nồng độ DNA mạch đôi dựa trên đường chuẩn được xây dựng từ 2 mẫu chuẩn và số lần pha loãng của DNA tổng số.

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

2.4.3.1. Thiết kế mồi

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 tham khảo tại cơ sở dữ liệu National Center for Biotechnology Information (NCBI). Những thông số quan trọng của mỗi cặp mồi (tỉ lệ nucleotide G và C, nhiệt độ nóng chảy, khả năng tự bắt cặp, khả năng tạo cấu trúc mạch đôi giữa hai mồi, khả năng tạo cấu trúc kẹp tóc) đều được kiểm tra bằng phần mềm IDT OligoAnalyzer Tool. Phần mềm *in silico* PCR amplification được sử dụng để kiểm tra tính đặc hiệu của mỗi cặp mồi (sản phẩm khuếch đại là sản phẩm suy nhất, không có sản phẩm phụ tạo ra do cặp mồi được thiết kế). Các mồi được tổng hợp nhân tạo bởi công ty PHUSA Biochem (Cần Thơ, Việt Nam). Thông tin về các cặp mồi được trình bày trong Bảng 2.2.

Bảng 2.2. Trình tự mồi sử dụng cho khuếch đại các đoạn gen mang biến thể thuộc *SOD1*, *SOD2*, *CAT* và *NOS3*

Biến thể gen (rs ID)	**Trình tự mồi (5'-3')**	**Kích thước lý thuyết (bp)**
SOD1 rs4998557 7958G>A	F :TGGCCGTATTTGAAAACAAACCA(*) R :TTATATTCCACTGCCCCCAGG	298
SOD2 rs4880 c.47 T>C (p.16Val>Ala)	F :CAACGCCTCCTGGTACTTCT(*) R :GGCTGTGCTTTCTCGTCTTC	218
CAT (rs1001179) -262C>T	F :GGCCTGAAGGATGCTGATAA R :GACTTCAGGCTCAGCCAATC(*)	282
NOS3 rs2070744 -786C>T	F :CCCTCAGATGGCACAGAACT(*) R :ATGACTCAAGTGGGGACAC	280

F: Forward Primer - Mồi xuôi, R: Reverse Primer - Mồi ngược, (*) Mồi được sử dụng cho phản ứng giải trình tự.

2.4.3.2. PCR khuếch đại đặc hiệu các đoạn gen chứa các biến thể

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.

Đối với *SOD1*, phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là 20 µl bao gồm các thành phần sau: 1 µl DNA tổng số (10 ng); 10 µl GreenTaq Mastermix (ThermoFisher Scientific, Mỹ); 1 µl mỗi mồi (nồng độ 10 pmole/µl); 7,5 µl nước khử ion (Life Technologies, Mỹ). Chu trình nhiệt được tiến hành như sau: 95^{o}C -2 phút, 40 chu kỳ (95^{o}C-30 giây, 58^{o}C-30 giây, 72^{o}C-20 giây), kéo dài ở 72^{o}C trong 2 phút và giữ ở 4^{o}C. Đối với gen *SOD2* và *NOS3*, phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là 20 µl bao gồm các thành phần sau: 1 µl DNA tổng số (10ng), 10 µl GreenTaq Mastermix (ThermoFisher Scientific, Mỹ), 1 µl mỗi mồi (nồng độ 10 pmole/µl), 0,5 µl $MgCl_2$ (ThermoFisher Scientific, Mỹ), 0,5 µl DMSO (Bioworld, Mỹ), 7,5 µl nước khử ion (Life Technologies, Mỹ). Chu trình nhiệt được tiến hành như sau: 95^{o}C -2 phút, 40 chu kỳ (95^{o}C-30 giây, 58^{o}C-30 giây, 72^{o}C-20 giây), kéo dài ở 72^{o}C trong 2 phút và giữ ở 4^{o}C.

Đối với gen *CAT*, phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là 20 µl bao gồm các thành phần sau: 1 µl DNA tổng số (10ng), 10 µl GreenTaq Mastermix (ThermoFisher Scientific, Mỹ), 0,75 µl mỗi mồi (nồng độ 10 pmole/µl); 0,5 µl DMSO (Bioworld, Mỹ), 7 µl nước khử ion (Life Technologies, Mỹ). Chu trình nhiệt được tiến hành như sau: 95^{o}C -2 phút, 40 chu kỳ (95^{o}C-30 giây, 60^{o}C-30 giây, 72^{o}C-20 giây), kéo dài ở 72^{o}C trong 2 phút và giữ ở 4^{o}C.

2.4.4. Giải trình tự Sanger

Tất cả sản phẩm PCR được tiến hành tinh sạch sử dụng đĩa tinh sạch Multiscreen PCR 96 Filter Plate (Merck-Milipore, Mỹ) tuân theo quy trình chuẩn của nhà sản xuất:

Bổ sung 80-100 µl nước khử ion vào mỗi giếng mẫu, trộn đều đĩa mẫu bằng máy vortex và ly tâm lắng mẫu. Chuyển sản phẩm PCR từ đĩa đựng mẫu 96 giếng sang đĩa tinh sạch tương ứng bằng multipipette. Tiến hành ly tâm các đĩa tinh sạch chứa mẫu với tốc độ 3000 rpm trong 30 phút, nhiệt độ phòng. Lúc này các sản phẩm dư thừa của phản ứng PCR cùng với nước sẽ đi qua cột lọc, sản phẩm PCR được giữ lại trên màng lọc. Trong bước tiếp theo, bổ sung 30-50 µl nước khử ion vào mỗi giếng chứa mẫu trên đĩa tinh sạch. Tiếp tục trộn đều mẫu trong các giếng bằng pipette, tránh tiếp xúc trực tiếp đầu côn với màng lọc. Sau đó chuyển mẫu sang các

đĩa lưu mẫu 96 giếng và lưu ở -20^{o}C. Khuôn dùng cho phản ứng giải trình tự Sanger là sản phẩm PCR đặc hiệu đã tinh sạch trước đó. Phản ứng PCR giải trình tự sử dụng bộ kit BigDye Terminator v3.1 (ThermoFisher Scientific, Mỹ), trong đó có sử dụng huỳnh quang cho mỗi loại nucleotide nên trong quá trình thao tác tránh tiếp xúc với ánh sáng mạnh. Phản ứng được tiến hành trên đĩa PCR 96 giếng với chu trình nhiệt như sau: 96^{o}C-1 phút, 25 chu kỳ (96^{o}C-10 giây, 50^{o}C-5 giây, 60^{o}C-4 phút), kết thúc phản ứng giữ ở 4^{o}C. Thành phần chi tiết của phản ứng được chú thích trong Bảng 2.3.

Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR giải trình tự

Thành phần	**Thể tích (µl)**
Sản phẩm PCR đã tinh sạch	4
Mồi (1,7 pmole/µl)	1
BigDye Terminator Master Mix (2,5X)	4
BigDye Teminator 5X Sequencing Buffer (5X)	2
Nước khử ion	9
Tổng	**20µl/phản ứng**

Sản phẩm PCR giải trình tự sau phản ứng được tinh sạch thu lấy DNA theo quy trình như sau:

Các mẫu trong đĩa tinh sạch được trộn đều bằng voltex và sau đó ly tâm nhanh lắng mẫu. Thêm 2,5 µl EDTA 125 mM vào mỗi giếng và gõ nhẹ cho dung dịch trộn đều vào nhau. Bổ sung 60 µl ethanol 100% vào mỗi giếng, trộn đều bằng voltex trong 5 giây sau khi đã dán kín mặt đĩa tinh sạch để tủa DNA. Đĩa mẫu được ly tâm với tốc độ 4000 rpm trong 30 phút ở 4^{o}C, lúc này DNA kết tủa bám vào đáy giếng. Bỏ miếng dán trên mặt đĩa và đổ bỏ dung dịch trong đĩa lên giấy thấm bằng cách úp ngược đĩa. Tiếp tục bổ sung 60 µl ethanol 80% vào mỗi giếng và dán đĩa lại, không trộn cồn trong các giếng mẫu ở bước này. Tiếp tục Ly tâm đĩa mẫu với tốc độ 4000 rpm ở 4^{o}C trong 30 phút. Đĩa chứa mẫu được úp ngược, sau đó ly tâm nhanh đĩa mẫu để loại bỏ hoàn toàn cồn dư trong các giếng mẫu. Làm khô đĩa mẫu bằng máy cô quay chân không trong 5-10 phút ở nhiệt độ phòng. Lúc này sản phẩm tinh sạch có thể được giữ lạnh ở 4^{o}C và tránh ánh sáng cho tới khi biến tính và giải

trình tự. Sản phẩm PCR giải trình tự đã tinh sạch được đem biến tính thành sợi đơn trước khi cho lên máy đọc trình tự theo quy trình sau: bổ sung 6 µl HiDi Formamide (ThermoFisher Scientific, Mỹ) vào mỗi giếng mẫu và ly tâm nhanh cho dung dịch lắng xuống đáy tiếp xúc với phần tủa DNA. Đĩa mẫu được biến tính ở 98^{o}C trong 2 phút trên máy PCR. Sau khi kết thúc chu trình nhiệt, lấy đĩa ra khỏi máy PCR và làm lạnh trên đá trong 5 phút. Lúc này sản phẩm tinh sạch đã sẵn sàng đưa vào máy 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

2.5.1. Phân tích kết quả giải trình tự Sanger

Số liệu thô thu được sau khi giải trình tự được phân tích bằng phần mềm SeqScape 3.0 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Mỹ).

Đối với các biến đổi thay thế nucleotide, trình tự nucleotide của các mẫu nghiên cứu được so sánh với trình tự tham chiếu để xác định vị trí của các biến thể gen quan tâm.

Các trình tự gen tham chiếu được tham khảo từ cơ sở dữ liệu NCBI như sau: *SOD1* (NG_008689.1), *SOD2* (NG_008729.3), *CAT* (NC_000011.9), *NOS3* (NG_011992.1).

2.5.2. Phân tích thống kê

Các thuật toán thống kê được thực hiện bằng các hàm thống kê trong nghiên cứu. Trong đó, kiểm định khi bình phương (χ^2) được áp dụng để đánh giá mối liên hệ giữa các biến phân loại (tần số kiểu gen, tần số allele, tiền sử hút thuốc hay uống rượu của đối tượng nghiên cứu) cũng như đánh giá trạng thái cân bằng di truyền Hardy-Weinberg của các biến thể gen trong bộ mẫu nghiên cứu.

Đối với các biến liên tục, đánh giá phân phối chuẩn được thực hiện bằng cú pháp Nortest trong nghiên cứu. Kiểm định ANOVA một nhân tố được áp dụng để đánh giá mối tương quan giữa tần số allele/kiểu gen với các thông số lâm sàng và mức độ stress oxy hoá của nhóm mẫu nghiên cứu.

Kiểm định Wilcoxon được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa các cặp giá trị trung bình của các biến liên tục (tuổi, BMI, các chỉ tiêu lâm sàng của tinh trùng).

Phân tích hồi quy logistic được sử dụng để đánh giá nguy cơ vô sinh nam (biến phụ thuộc) với các yếu tố chi phối (biến độc lập) là kiểu gen và chỉ số BMI. Sự phù hợp của mô hình logistic được xét bởi các giá trị -2 Log-Likelyhood (-2LL), Rsquare, AIC (tiêu chí thông tin Akaike) và BIC (tiêu chí thông tin Bayes).

Đánh giá yếu tố nguy cơ phụ thuộc vào tỉ số OR và khoảng tin cậy 95% (95% Confident interval-CI). Giá trị $p < 0,05$ được coi là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

2.6. Đạo đức trong nghiên cứu

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

+ Cam kết tiến hành nghiên cứu với tinh thần trung thực, số liệu nghiên cứu chưa từng được công bố dưới bất kỳ hình thức nào.

+ Nghiên cứu được tiến hành dựa trên sự tự nguyện của bệnh nhân, mọi thông tin được giữ bí mật hoàn toàn.

+ Các thông tin thu thập trên bệnh nhân chỉ nhằm mục đích nghiên cứu và phục vụ tư vấn cho bệnh nhân, không nhằm mục đích nào khác.

CHƯƠNG 3
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

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

Đặc điểm nhân khẩu học và các thông số tinh dịch của các mẫu nghiên cứu được tóm tắt trong Bảng 3.1. Không có sự khác biệt có ý nghĩa về tuổi trung bình giữa bệnh nhân hiếm muộn (trung bình ± SD: 31,93 ± 6,3) và nhóm đối chứng khỏe mạnh (31,96 ± 4,87) (p = 0,92), cho thấy tuổi trung bình của hai nhóm nghiên cứu là tương đương nhau. Tương tự, chúng tôi không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tình trạng hút thuốc của bệnh nhân vô sinh so với nhóm chứng (p = 0,55). Tuy nhiên, về đặc điểm uống rượu, quan sát thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm bệnh nhân và nhóm chứng (p = 0,034). Chỉ số khối cơ thể (BMI) ở nhóm bệnh nhân cũng cao hơn nhóm chứng và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p = 0,0026) (Bảng 3.1, Hình 3.1). Như vậy, sử dụng rượu và chỉ số BMI cao là những yếu tố gây nguy cơ vô sinh nam.

Đối với các chỉ số lâm sàng của tinh dịch, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa bệnh nhân vô sinh nam và nhóm đối chứng (Phụ lục 2) về mật độ tinh trùng (53,17 ± 42,77 × 10^6/mL so với 100,84 ± 56,51 × 10^6/mL, p = 2,2×10^{-10}), tổng số tinh trùng (150,35 ± 126,85 × 10^6 so với 273,73 ± 192,47 × 10^6, p = 6,8×10^{-7}), tỉ lệ sống (81,25 ± 5,09% so với 87,02 ± 2,72%, p = 2×10^{-16}), tỷ lệ di chuyển tiến tới (30,41 ± 7,06% so với 47,19 ± 5,32%, p = 2×10^{-16}), và hình thái (7,46 ± 3,69% so với 11,59 ± 3,09%, p = 8,1×10^{-13}).

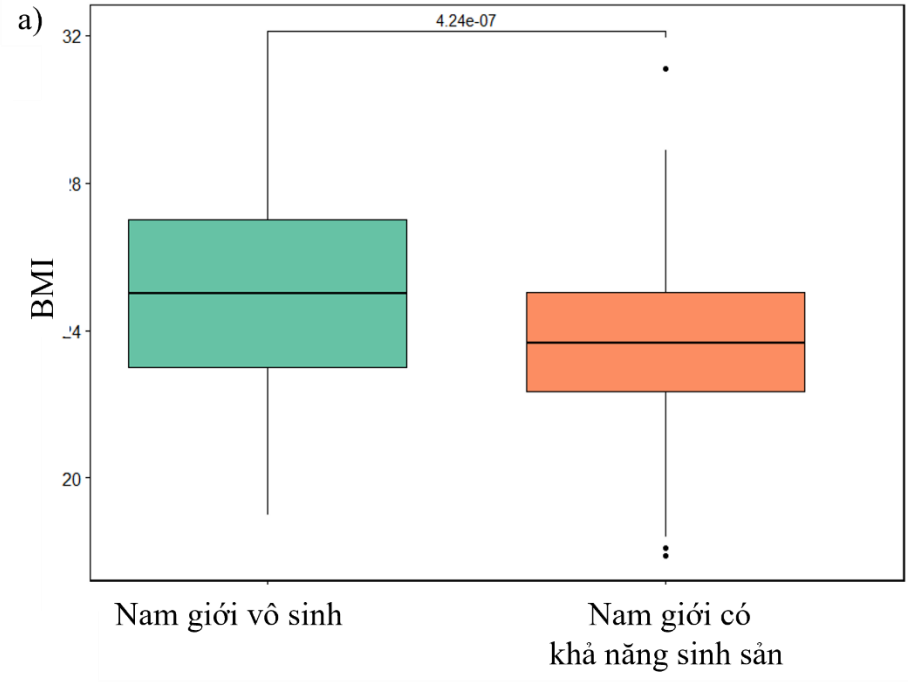
Tất cả các thông số này ở nhóm bệnh nhân đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê khi so với nhóm chứng. Quan sát thấy chỉ số thể tích tinh dịch ở nhóm bệnh nhân cũng thấp hơn so với nhóm chứng, tuy nhiên số liệu này không đạt ngưỡng ý nghĩa thống kê (p = 0,213).

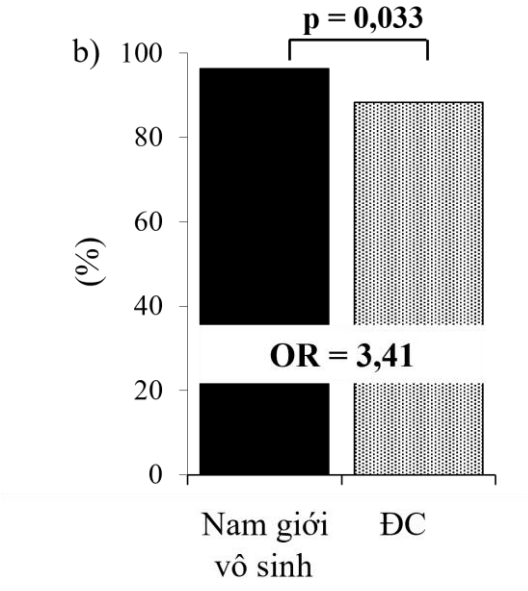
Bảng 3.1. Đặc điểm nhân khẩu học của các mẫu nghiên cứu

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			0,550[a]
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]**
Không (%)	4 (3,74)	10 (11,77)	3,43 (1,04-11,37)

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

(a):Kiểm định χ^2 được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa các biến phân loại (đặc điểm hút thuốc hay uống rượu), (b) kiểm định Wilcoxon rank-sum test được áp dụng để đánh giá các biến liên tục giữa nhóm vô sinh và nhóm chứng có khả năng sinh sản (Tuổi, BMI và một số các thông số lâm sàng khác về đặc điểm tinh dịch).





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 ± 2,31) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm nam giới có khả năng sinh sản (23,53 ± 2,55), p = 0,00026, b) Tỉ 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. 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.

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). Kết quả xác định mức độ stress oxy hoá trong tinh dịch của nhóm bệnh nhân vô sinh nam được thể hiện chi tiết ở Bảng 3.2. 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.

Bảng 3.2. Mức độ stress oxy hoá của các mẫu tinh trùng trong nhóm vô sinh nam

STT	Mã mẫu	Mức độ OS	STT	Mã mẫu	Mức độ OS
1	MI_01	1	46	MI_46	2
2	MI_05	1	47	MI_48	2
3	MI_06	2	48	MI_49	2
4	MI_07	3	49	MI_50	2
5	MI_08	1	50	MI_51	3
6	MI_09	2	51	MI_52	2
7	MI_10	2	52	MI_53	3
8	MI_100	2	53	MI_54	1
9	MI_101	2	54	MI_55	1

STT	Mã mẫu	Mức độ OS	STT	Mã mẫu	Mức độ OS
10	MI_102	1	55	MI_56	3
11	MI_103	3	56	MI_57	3
12	MI_104	2	57	MI_58	1
13	MI_105	3	58	MI_59	2
14	MI_106	2	59	MI_64	3
15	MI_107	1	60	MI_65	2
16	MI_11	1	61	MI_66	2
17	MI_12	2	62	MI_67	3
18	MI_13	1	63	MI_68	1
19	MI_14	2	64	MI_73	3
20	MI_15	1	65	MI_74	3
21	MI_16	1	66	MI_75	3
22	MI_17	2	67	MI_76	3
23	MI_18	1	68	MI_77	2
24	MI_19	3	69	MI_78	2
25	MI_20	2	70	MI_79	2
26	MI_21	2	71	MI_80	2
27	MI_22	2	72	MI_81	3
28	MI_23	2	73	MI_82	1
29	MI_24	3	74	MI_83	1
30	MI_25	1	75	MI_84	1
31	MI_26	2	76	MI_85	2
32	MI_27	2	77	MI_86	3
33	MI_28	2	78	MI_87	2
34	MI_29	1	79	MI_88	2

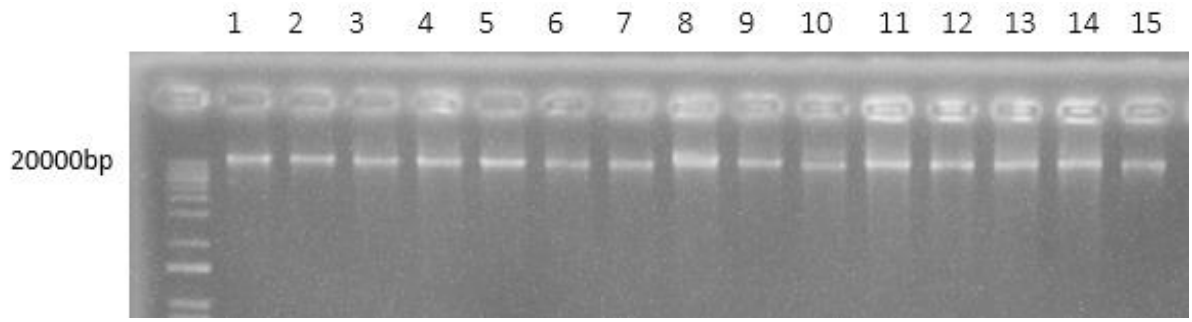
STT	Mã mẫu	Mức độ OS	STT	Mã mẫu	Mức độ OS
35	MI_30	2	80	MI_89	2
36	MI_31	2	81	MI_90	2
37	MI_32	2	82	MI_91	3
38	MI_33	1	83	MI_92	1
39	MI_34	3	84	MI_93	2
40	MI_35	2	85	MI_94	2
41	MI_36	1	86	MI_95	3
42	MI_38	2	87	MI_96	2
43	MI_41	2	88	MI_97	1
44	MI_42	2	89	MI_98	2
45	MI_43	3	90	MI_99	2
Mức độ stress oxy hoá cao 21/90 mẫu (23,3 %)			**Mức độ stress oxy hoá thấp 69/90 mẫu (76,7 %)**		

Chú thích: OS-stress oxy hoá, cấp độ 3-mức độ stress oxy hoá cao, cấp độ 1 và 2-mức độ tress oxy hoá thấp.

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

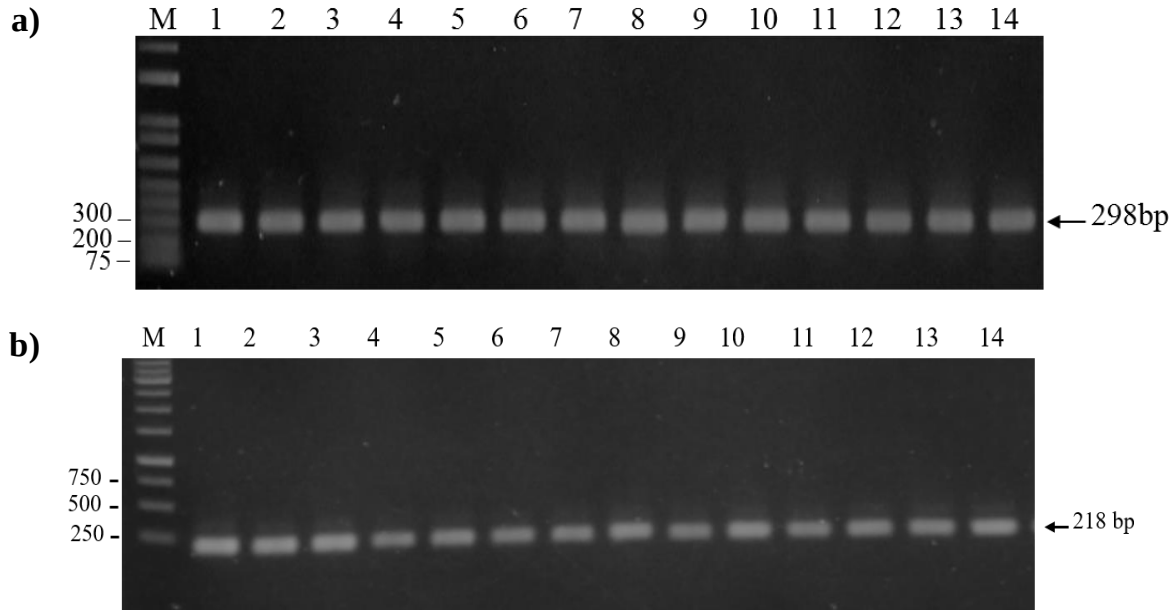
3.3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số và khuếch đại các đoạn gen chứa biến thể quan tâm

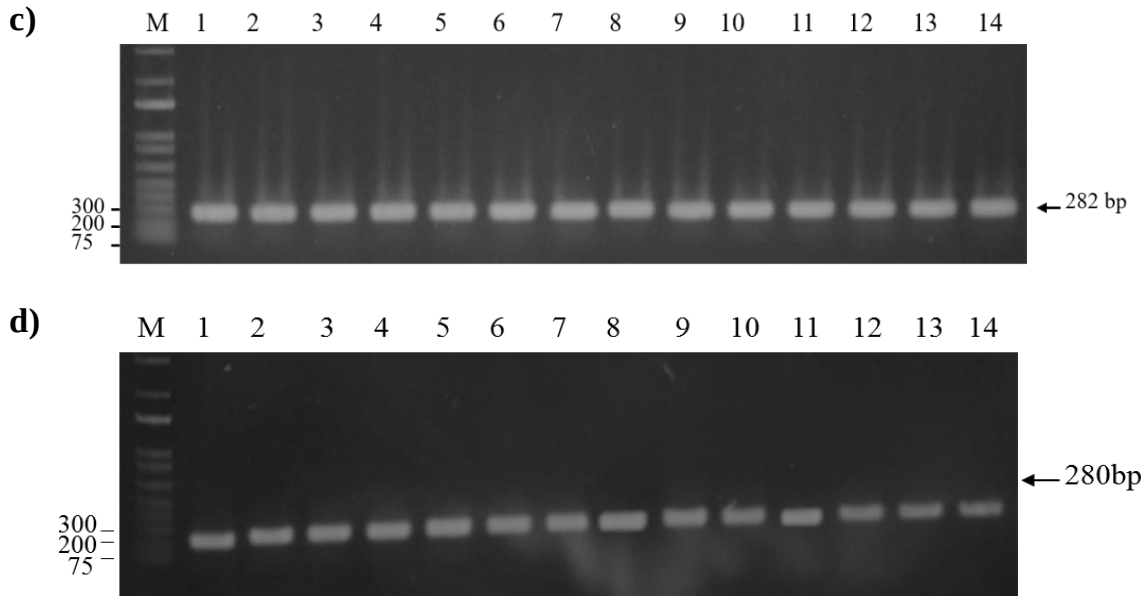
DNA tổng số sau khi tách chiết từ máu ngoại vi được điện di kiểm tra trên gel Agarose 0,8%. Hình ảnh điện di cho thấy các dải băng sáng, rõ, phản ánh DNA tổng số không bị đứt gãy và có độ tinh sạch cao, đảm bảo chất lượng sử dụng cho các bước thí nghiệm tiếp theo. Hình ảnh điện di của đại diện 15 mẫu DNA tổng số được thể hiện ở Hình 3.2. Nồng độ DNA tổng số của các mẫu nghiên cứu được tổng kết ở Phụ lục 2.



Hình 3.2. Kết quả tách chiết DNA tổng số từ các mẫu máu.
M: Thang DNA chuẩn. Các giếng 1-15: DNA tổng số

Sử dụng các cặp mồi đã được thiết kế, phản ứng PCR được tiến hành nhằm khuếch đại đặc hiệu các đoạn gen chứa các biến thể nghiên cứu. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tre trên gel Agarose 1%. 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*, c.47 T>C (rs4880) thuộc gen *SOD2*, -262C>T (rs1001179) thuộc gen *CAT* và -786C>T (rs2070744) thuộc gen *NOS3*. Hình ảnh điện di của các đoạn gen với kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết là: *SOD1* 7958 G>A (298bp), *SOD2* c.47 T>C (218 bp), *CAT* -262 C>T (282 bp) và *NOS3* -786C>T (280 bp). Hình ảnh các băng điện di sáng, gọn và không có sản phẩm phụ, thể hiện độ đặc hiệu của mồi và phản ứng (Hình 3.3).





Hình 3.3. Ảnh điện di sản phẩm PCR đặc hiệu các đoạn gen *SOD1*, *SOD2*, *CAT* và *NOS3*.

M: Thang DNA chuẩn. Các giếng 1-14: sản phẩm PCR các đoạn gen *SOD1* (a), *SOD2* (b), *CAT* (c) và *NOS3* (d).

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

Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu các đoạn gen mang các biến thể quan tâm được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp để xác định biến thể. Tần số kiểu gen, tần số allele và trạng thái cân bằng di truyền của mỗi biến thể cũng được xác định.

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

Đối với 7958G>A (rs4998557) của gen *SOD1*, ở nhóm bệnh nhân vô sinh nam, chúng tôi đã xác định được 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, có 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 51,76%.

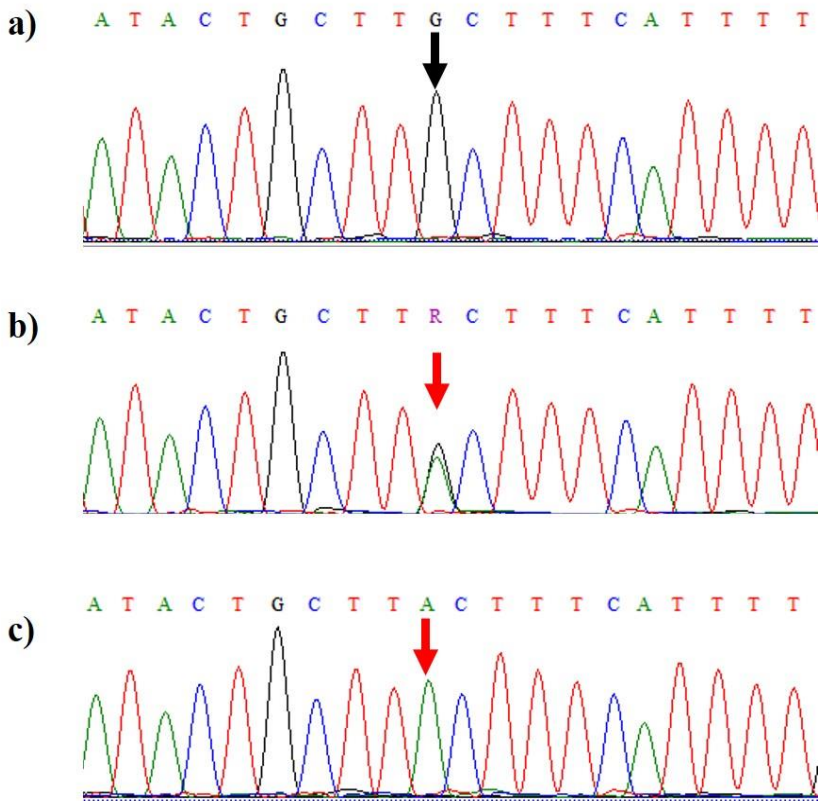
Dữ liệu tần số kiểu gen và tần số allele của biến thể được thể hiện ở Bảng 3.3. Cả nhóm bệnh nhân và đối chứng đều đạt trạng thái cân bằng di truyền (Phụ

lục 5). Chi tiết kết quả giải trình tự của một số mẫu đại diện được thể hiện ở Hình 3.4.

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



Hình 3.4. Kết quả giải trình tự xác định biến thể *SOD1* 7958G>A (rs4998557)

a) mẫu đồng hợp tử kiểu dại (*SOD1* 7958GG), b) mẫu dị hợp tử đột biến (*SOD1* 7958GA), c) mẫu đồng hợp tử đột biến (*SOD1* 7958AA). Vị trí nucleotide kiểu dại được đánh dấu bằng mũi tên màu đen, vị trí nucleotide đột biến được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ.

3.3.2.2. Biến thể c.47 T>C, (p.16Val>Ala) (rs4880) của gen SOD2

Đối với c.47 T>C, (p.16Val>Ala) (rs4880) của gen *SOD2*, ở nhóm bệnh nhân vô sinh, chúng tôi 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%).

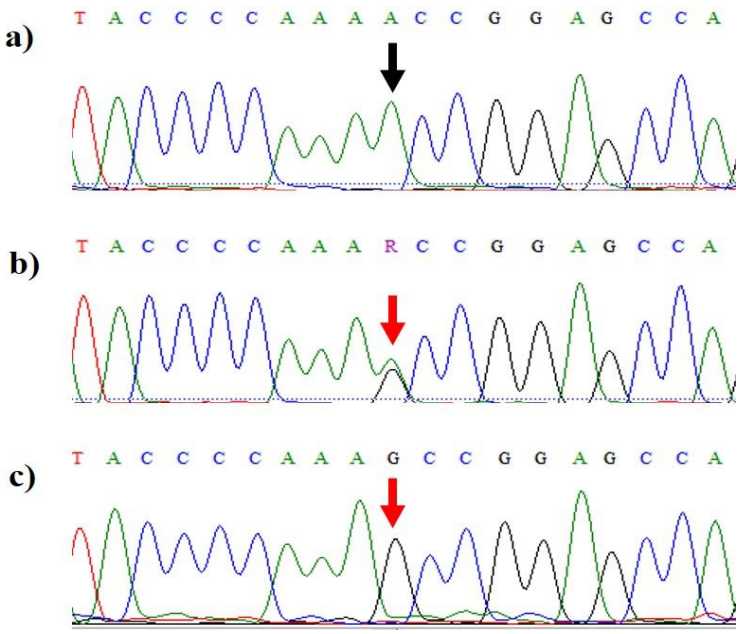
Tần số allele ở nhóm bệnh nhân là allele T chiếm 70,09%, allele C chiếm 29,91%. Ở nhóm đối chứng, tần số allele T là 81,76%, tần số allele C là 18,24%.

Dữ liệu tần số kiểu gen và tần số allele của biến thể được thể hiện ở Bảng 3.4. Cấu trúc di truyền ở cả nhóm bệnh nhân và đối chứng đều đạt trạng thái cân bằng di truyền Hardy-Weinberg (Phụ lục 5). Chi tiết kết quả giải trình tự của một số mẫu đại diện được thể hiện ở Hình 3.5.

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



Hình 3.5. Kết quả giải trình tự xác định biến thể *SOD2* c.47 T>C (rs4880)

a) mẫu đồng hợp tử kiểu dại (*SOD2* c.47 TT), b) mẫu dị hợp tử đột biến (*SOD2* c.47 TC), c) mẫu đồng hợp tử đột biến (*SOD2* c.47 CC). Vị trí nucleotide kiểu dại được đánh dấu bằng mũi tên màu đen, vị trí nucleotide đột biến được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ.

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

Đối với -262C>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 C là 5,88%.

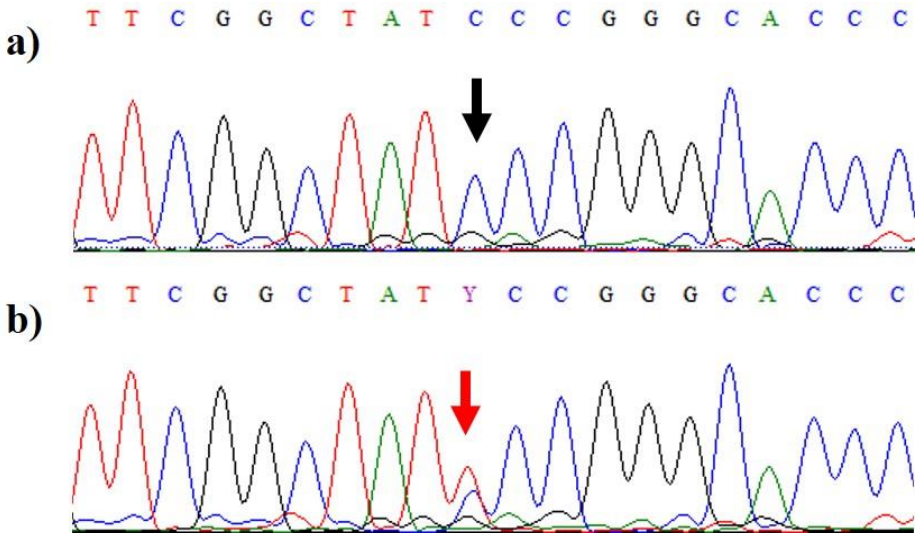
Dữ liệu tần số kiểu gen và tần số allele của biến thể được thể hiện ở

Bảng 3.5. Cấu trúc di truyền ở cả nhóm bệnh nhân và đối chứng đều đạt trạng thái cân bằng di truyền Hardy-Weinberg (Phụ lục 6). Chi tiết kết quả giải trình tự của một số mẫu đại diện được thể hiện ở Hình 3.6.

Bảng 3.5. Tần số allele và tần số kiểu gen của biến thể *CAT* -262C>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



Hình 3.6. Kết quả giải trình tự xác định biến thể *CAT* -262C>T (rs4880)

a) mẫu đồng hợp tử kiểu dại (*CAT* -262CC), b) mẫu dị hợp tử đột biến (*CAT* -262CT). Vị trí nucleotide kiểu dại được đánh dấu bằng mũi tên màu đen, vị trí nucleotide đột biến được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ.

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

Đối với biến thể -786C>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%.

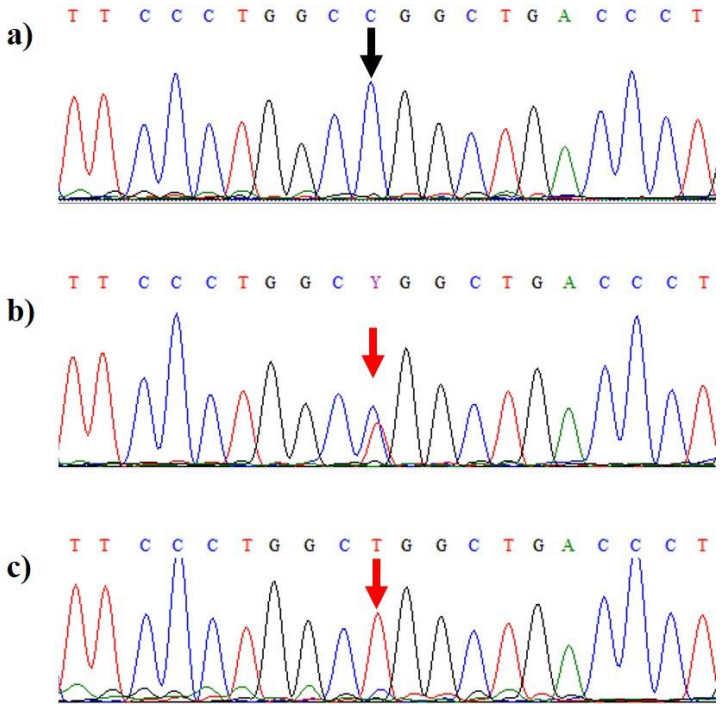
Tần số allele ở nhóm bệnh nhân là allele T chiếm 78,04%, allele C chiếm 21,96%. Ở nhóm đối chứng, tần số allele T là 90% và tần số allele C là 10%.

Dữ liệu tần số kiểu gen và tần số allele của biến thể được thể hiện ở Bảng 3.6. Trạng thái cân bằng di truyền Hardy-Weinberg được duy trì ổn định ở cả nhóm bệnh và nhóm đối chứng (Phụ lục 5). Chi tiết kết quả giải trình tự của một số mẫu đại diện được thể hiện ở Hình 3.7.

Bảng 3.6. Tần số allele và tần số kiểu gen của biến thể *NOS3* -786C>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



Hình 3.7. Kết quả giải trình tự xác định biến thể *NOS3* -786C>T (rs4880)

a) mẫu đồng hợp tử kiểu dại (*NOS3* -786CC), b) mẫu dị hợp tử đột biến (*NOS3* -786CT), c) mẫu đồng hợp tử đột biến (*NOS3* -786TT). Vị trí nucleotide kiểu dại được đánh dấu bằng mũi tên màu đen, vị trí nucleotide đột biến được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ.

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. Các kết quả phân tích thống kê được thể hiện ở Bảng 3.7.

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). Quan sát thấy không

có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê đối với tần số allele ở 2 nhóm nghiên cứu. Tương tự, khi đánh giá các mô hình trội (GA+AA/GG) và lặn (GG+GA/AA), kết quả thu được không có sự khác biệt giữa 2 nhóm nghiên cứu.

Đối với biến thể *SOD2* c.47T>C (rs4880), quan sát thấy sự phân bố của các kiểu gen và allele có sự khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm đối chứng. Cụ thể, 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). Đáng chú ý, khi khảo sát theo mô hình trội (TC+CC/TT) thì số người mang allele đột biến (kiểu gen TC hoặc CC) ở nhóm bệnh nhân cao hơn so với nhóm đối chứng. Không có sự khác biệt về sự phân bố kiểu gen khi đánh giá theo các mô hình lặn (TT+TC/CC) giữa 2 nhóm nghiên cứu.

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. Đánh giá theo các mô hình trội và lặn giữa 2 nhóm cũng không cho thấy kết quả khác biệt đáng kể.

Đối với biến thể *NOS3* -786C>T, trong khi kiểu gen dị hợp tử có tần số cao hơn ở nhóm bệnh nhân (p = 0) thì kiểu gen đồng hợp tử đột biến lại có tần số cao hơn khi quan sát ở nhóm đối chứng khỏe mạnh (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). Ngoài ra, quan sát theo mô hình lặn cho thấy tỉ lệ số người mang allele kiểu dại (kiểu gen dại là bình thường) ở nhóm bệnh nhân cao hơn khi so với nhóm đối chứng và sự khác biệt này đạt ngưỡng ý nghĩa thống kê (p = 0,001).

Bảng 3.7. Phân bố của các SNP (*SOD1* 7958G>A, *SOD2* c.47T>C, *CAT* -262C>T và *NOS3* -786C>T) trong nhóm bệnh nhân vô sinh nam và nhóm đối chứng.

Biến thể	Bệnh nhân N=107 (%)	Đối chứng N = 85 (%)	OR	95% CI	*p* (OR)	*p* (χ^2)
***SOD1* 7958G>A (rs4998557)**						
GG	23 (21.50)	26 (30.59)	0,621	0,324-1,193	0,076	
GA	66 (61.68)	36 (42.35)	2,191	1,226-3,915	**0,004**	**0,027**
AA	18 (16.82)	23 (27.06)	0,545	0,272-1,094	0,044	
GA+AA/GG	84 (78.50)	61 (71.76)	0,621	0,324-1,193	0,076	
GG+GA/AA	89 (83.18)	62 (72.94)	1,945	0,973-3,888	0,030	
Allele A	112 (52.34)	88 (51.76)	1,098	0,734-1,643		0,649
Allele G	102 (47.66)	82 (48.24)	0,911	0,609-1,363		
***SOD2* c.47T>C (rs4880)**						
TT	51 (47.66)	56 (65.88)	0,4712	0,262-0,849	**0,006**	**0,026**
TC	48 (44.86)	27 (31.76)	1,748	0,964-3,168	**0,033**	
CC	8 (7,48)	2 (2,35)	3,354	0,693-16,228	0,066	
TC+CC/TT	56 (52.34)	31 (36.47)	1,435	1,028-2,004	**0,017**	
TT+TC/CC	99 (92.52)	83 (97.65)	0,298	0,062-1,443	0,066	
Allele T	150 (70.09)	139 (81.76)	0,565	0,349-0,912		**0,019**
Allele C	64 (29.91)	31 (18.24)	1,771	1,096-2,862		
***CAT* – 262C>T (rs1001179)**						
CC	88 (82.24)	75 (88.24)	0,618	0,271-1,410	0,126	0,401
CT	18 (16.82)	10 (11.76)	1,517	0,660-3,485	0,163	
TT	1 (0,93)	0 (0)	-	-	-	
CT+TT/CC	19 (17.76)	10 (11.76)	1,509	0,741-3,072	0,128	
CC+CT/TT	106 (99.07)	85 (100)	-	-	-	

Allele C	194 (90.65)	160 (94.12)	0,606	0,276-1,332		0,209
Allele T	20 (9,35)	10 (5,88)	1,649	0,751-3,625		
***NOS3* –786C>T (rs2070744)**						
CC	2 (1,87)	1 (1,18)	-	-	-	
CT	43 (40.19)	15 (17.65)	3,135	1,591-6,180	**0**	**0,003**
TT	62 (57.94)	69 (81.18)	0,319	0,164-0,622	**0**	
CC+CT/TT	45 (42.06)	16 (18.82)	2,234	1,363-3,663	**0,001**	
CT+TT/CC	105 (98.13)	84 (98.82)	0,625	0,056-7,011	0,352	
Allele T	167 (78.04)	153 (90)	0,395	0,217-0,717		**0,002**
Allele C	47 (21.96)	17 (10)	2,533	1,395-4,599		

Chú thích: N: số mẫu nghiên cứu, 95% CI: khoảng tin cậy 95%

3.4.2. Mối tương quan giữa đặc điểm di truyền và đặc điểm lâm sàng của tinh trùng 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, mật độ và tổng số tinh trùng. Các dữ liệu từ phân tích thống kê được thể hiện chi tiết ở Bảng 3.8.

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 ở những bệnh nhân có kiểu gen kiểu dại 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) (Bảng 3.8, Hình 3.8a).

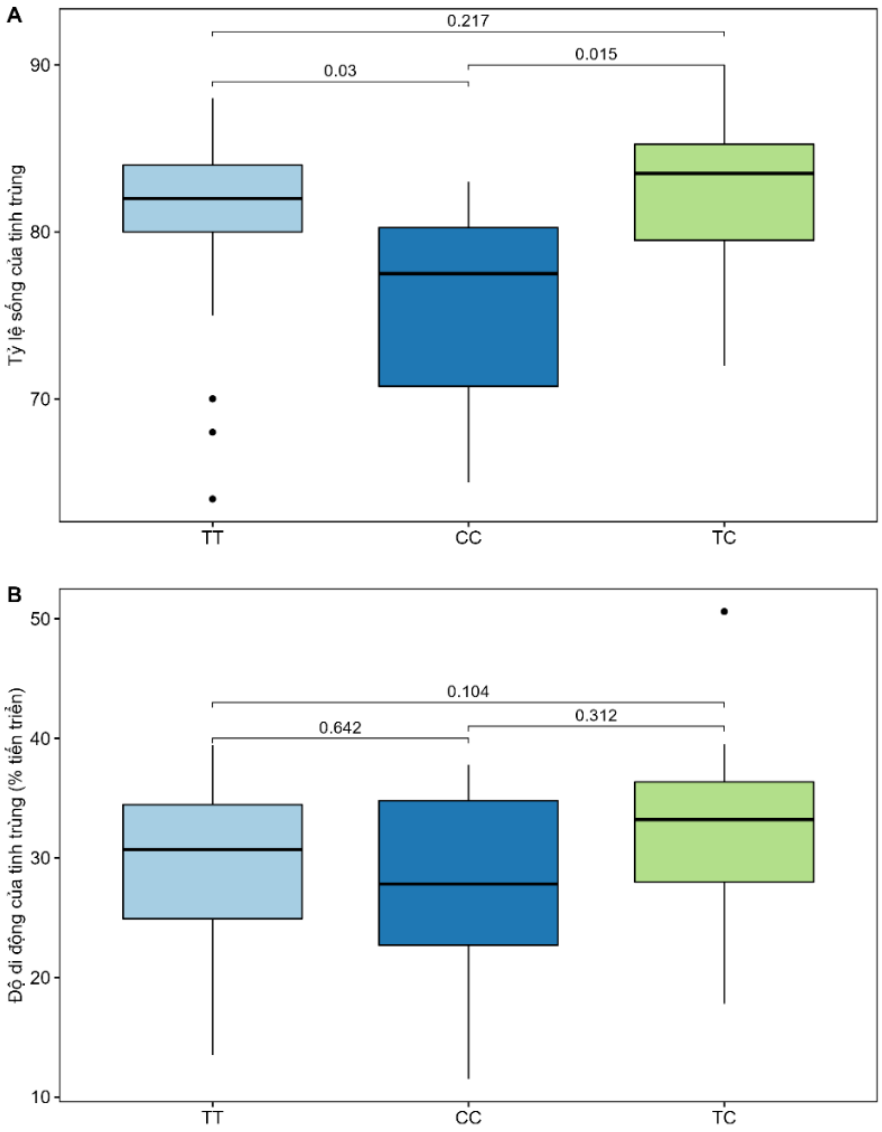
Đối với thông số mức độ di động tiến tới của tinh trùng, có sự khác biệt giữa các nhóm bệnh nhân mang kiểu gen khác nhau, tuy nhiên khi phân tích sâu giữa các cặp kiểu gen thì kết quả này không đạt mức ý nghĩa thống kê (Bảng 3.8, Hình 3.8b).

Ngoài ra, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hình dạng, mật độ và tổng số lượng tinh trùng giữa các nhóm kiểu gen của biến thể SNP *SOD2* c.47T>C.

Khảo sát các biến thể còn lại bao gồm *SOD*1 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.

Bảng 3.8. Mối tương quan giữa đặc điểm của tinh trùng với kiểu gen ở nhóm bệnh nhân vô sinh nam

Thông số tinh trùng	**Kiểu gen**			**p**
SOD1 7958G>A (rs4998557)	GG	GA	AA	
Hình dạng (% bình thường)	7,043	7,788	7,444	0,695
Khả năng di động (% tiến tới)	28,752	30,765	30,628	0,469
Tỉ lệ sống (%)	81,435	81,182	81,444	0,969
Mật độ (10^6/ml)	46,874	57,028	50,722	0,592
Tổng số tinh trùng di động (triệu)	127,821	159,980	150,156	0,582
SOD2 c.47T>C (rs4880)	TT	TC	CC	
Hình dạng (% bình thường)	7,529	32,023	27,275	0,404
Khả năng di động (% tiến tới)	29,173	32,023	27,275	**0,048**
Tỉ lệ sống (%)	81,059	82,458	75,625	**0,014**
Mật độ (10^6/ml)	56,969	53,344	36,131	0,445
Tổng số tinh trùng di động (triệu)	146,813	159,803	130,419	0,784
CAT -262 C>T (rs1001179)	CC	CT	TT	
Hình dạng (% bình thường)	7,375	8,556	7,000	0,455
Khả năng di động (% tiến tới)	30,152	30,622	38,500	0,470
Tỉ lệ sống (%)	81,136	82,167	78,000	0,604
Mật độ (10^6/ml)	51,828	60,114	112,000	0,302
Tổng số tinh trùng di động (triệu)	144,349	170,725	425,600	0,068
NOS3 -786 C>T (rs2070744)	TT	CT	CC	
Hình dạng (% bình thường)	7,661	7,395	8,500	0,877
Khả năng di động (% tiến tới)	30,506	30,193	26,700	0,736
Tỉ lệ sống (%)	81,823	80,791	75,000	0,128
Mật độ (10^6/ml)	51,087	56,199	85,500	0,484
Tổng số tinh trùng di động (triệu)	141,757	160,850	247,950	0,420



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 của tinh trùng,
b. Tương quan giữa kiểu gen *SOD2* và độ di động của tinh trùng.

Các box màu xanh lam 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.

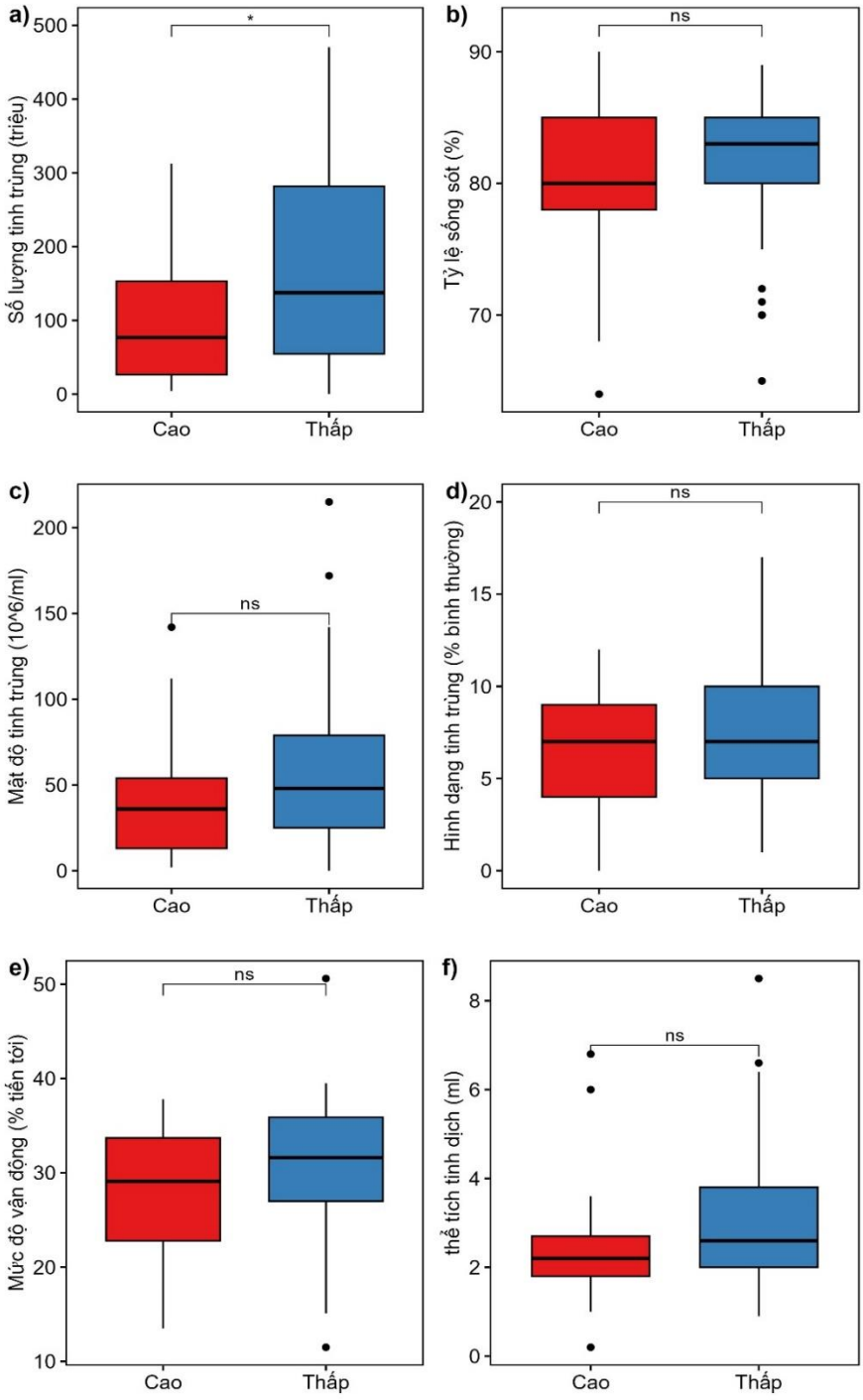
3.4.3. Đánh giá mối liên hệ giữa mức độ stress oxy hoá với chỉ số lâm sàng của tinh trùng và đặc điểm di truyền ở bệnh nhân nam vô sinh.

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.

Do điều kiện bảo quản mẫu không đồng đều, chỉ có 90/107 mẫu tinh trùng của bệnh nhân nam vô sinh đủ điều kiện để đánh giá stress oxy hóa. Chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của mức độ stress oxy hóa đến các chỉ số của mẫu tinh trùng.

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). Kết quả này phản ánh stress oxy hóa là một yếu tố nguy cơ làm giảm số lượng tinh trùng ở nam giới.

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. Như vậy, mức độ stress oxy hoá là độc lập với các chỉ số của tinh trùng về mặt cấu trúc và chất lượng, ngoại trừ tổng số tinh trùng trong tinh dịch.



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 tress 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.

Khảo sát mối liên hệ giữa mức độ stress oxy hoá của tinh trùng với sự phân bố của các biến thể thuộc nhóm gen chống oxy hoá trong nghiên cứu này (Bảng 3.9) cho thấy:

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. Như vậy có thể nói, các biến thể di truyền của 4 gen nghiên cứu không có mối liên hệ với mức độ stress oxy hoá của tinh trùng trong nhóm bệnh nhân.

Bảng 3.9. Phân bố kiểu gen và allele của các gen *SOD1*, *SOD2*, *CAT* và *NOS3* ở hai nhóm bệnh nhân vô sinh

Kiểu gen	**Mức độ stress oxy hoá**		**χ^2**	**p**
	Cao (%) N = 21	**Thấp (%) N = 69**		
SOD1 7958G>A (rs4998557)				
GG	3 (14,28)	15 (21,74)		
GA	14 (66,67)	44 (63,77)	0,68	0,71
AA	4 (19,05)	10 (14,49)		
Allele G	22 (52,38)	64 (46,37)	0,46	0,49
Allele A	20 (47,62)	74 (53,63)		
SOD2 c.47T>C (rs4880)				
TT	10 (47,62)	34 (49,27)		
TC	10 (47,62)	29 (42)	0,44	0,8
CC	1 (4,76)	6 (8,73)		
Allele T	30 (71,42)	97 (70,28)	0,02	0,88
Allele C	12 (28,58)	41 (29,72)		
CAT -262C>T (rs1001179)				
CC	16 (76,19)	57 (82,6)		
CT	5 (23,81)	11 (15,94)	0,94	0,62
TT	0	1 (1,46)		

Allele C	37 (88,09)	125 (90,57)	0,34	0,55
Allele T	5 (11,91)	23 (9,43)		
NOS3 -786C>T (rs2070744)				
CC	0	2 (2,9)		
CT	11 (52,38)	20 (28,98)	4,23	0,12
TT	21 (47,62)	47 (68,12)		
Allele C	11 (26,19)	22 (15,94)	1,92	0,16
Allele T	32 (73,81)	114 (84,06)		

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.

Các enzyme SOD và CAT bảo vệ tinh trùng khỏi bị phá hủy bởi ion superoxide (O_2^-) và hydrogen peroxide (H_2O_2). Chúng tôi đưa ra giả thuyết rằng một bệnh nhân nhất định mang tổ hợp các allele bất lợi của các SNP ở trên có thể có nguy cơ vô sinh nam cao hơn so với một cá thể không mang allele đột biến. Do đó, chúng tôi phân tích thống kê với những tổ hợp kiểu gen bao gồm: *SOD1* 7958G>A và *SOD2* c.47T>C, *SOD1* 7958G>A và *CAT* -262C>T, *SOD2* c.47 T>C và *CAT* -262C>T, và đồng thời cả tổ hợp mang những allele bất lợi của cả ba gen đã được sử dụng để kiểm tra giả thuyết này.

Kết quả cụ thể được trình bày trong Bảng 3.10 và Hình 3.10.

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 3.9). Những bệnh nhân đồng thời 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)].

Tương tự, những bệnh nhân có kiểu gen *SOD1* 7958GA/AA cùng với *CAT*-262CT/TT cũng tăng nguy cơ mắc bệnh với OR = 2,813 lần (95%CI = 0,986 - 8,024, p = 0,026).

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)].

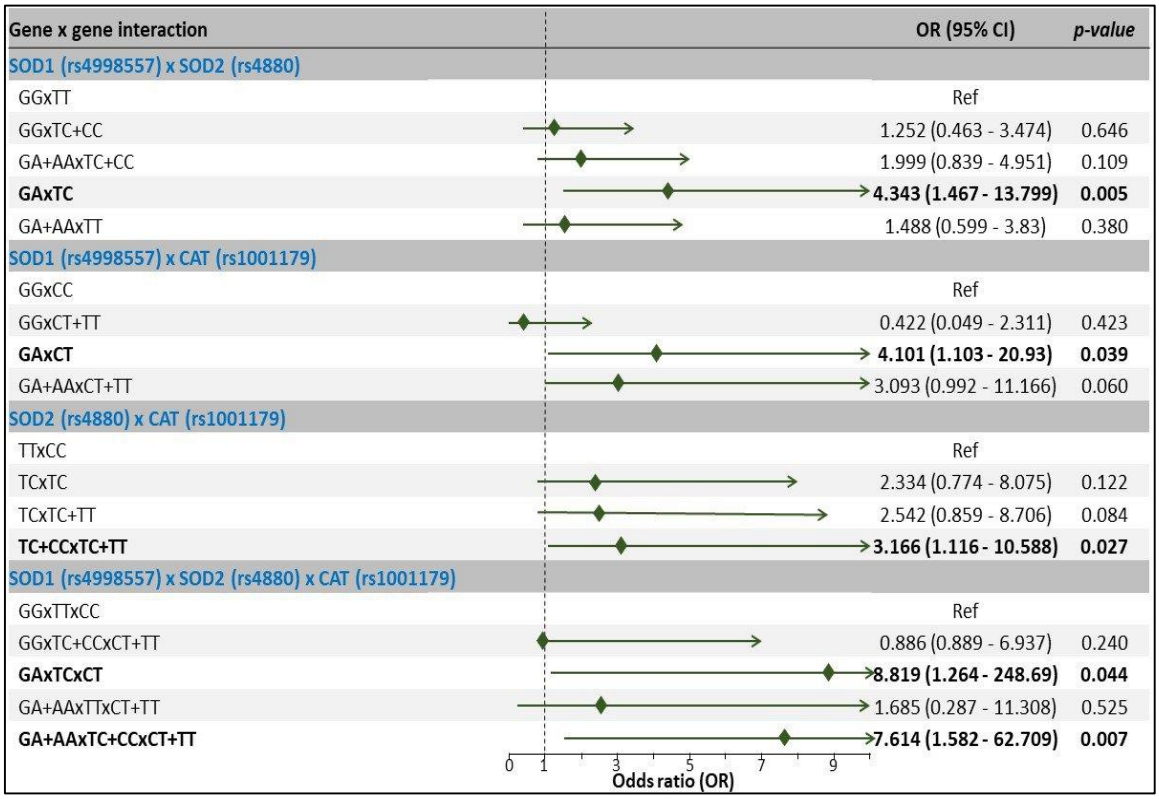
Như vậy, những tổ hợp gen tăng nguy cơ vô sinh nam bao gồm: dị hợp tử cả 2 kiểu gen *SOD1* 7958GA và *SOD2* c.47TC, có đa hình (dị hợp tử hoặc đồng hợp tử) ở cả hai biến thể gen *SOD1* 7958GA và *CAT* (rs1001179), có đa hình (dị hợp tử hoặc đồng hợp tử) ở cả 3 biến thể gen *SOD1* 7958 G>A, *SOD2* c.47 T>C và *CAT* -262 C>T. 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.

Bảng 3.10. Phân bố của các tổ hợp kiểu gen ở nhóm vô sinh nam và nhóm đối chứng

Tổ hợp kiểu gen	**Bệnh nhân N = 107**	**Đối chứng N = 85**	**p**	**OR (95% CI)**
SOD1 (rs4998557) và *SOD2* (rs4880)				
GGxTT	10/107	15/85		Ref
GGxTC+CC	21/107	25/85	0,646	1,252 (0,463 – 3,474)
GA+AAxTC+CC	78/107	58/85	0,109	1,999 (0,839 – 4,951)
GAxTC	**27/107**	**9/85**	**0,005**	**4,343 (1,467 – 13,799)**
GA+AAxTT	41/107	41/85	0,38	1,488 (0,599 – 3,83)
SOD1 (rs4998557) x *CAT* (rs1001179)				
GGxCC	21/107	21/85		Ref
GGxCT+TT	2/107	5/85	0,423	0,422 (0,049 – 2,311)

GAxCT	**13/107**	**3/85**	**0,039**	**4,101 (1,103 – 20,93)**
GA+AAxCT+TT	16/107	5/85	0,06	3,093 (0,992 – 11,166)
SOD2 (rs4880) và *CAT* (rs1001179)				
TTxCC	47/107	51/85		Ref
TCxTC	11/107	5/85	0,122	2,334 (0,774 – 8,075)
TCxTC+TT	12/107	5/85	0,084	2,542 (0,859 – 8,706)
TC+CCxCT+TT	**15/107**	**5/85**	**0,027**	**3,166 (1,116 – 10,588)**
SOD1 (rs4998557) x *SOD2* (rs4880) x *CAT* (rs1001179)				
GGxTTxCC	10/107	13/85		Ref
GG+TC+CCxCT+TT	2/107	3/85	0,24	0,886 (0,889 – 6,937)
GAxTCxCT	**8/107**	**1/85**	**0,044**	**8,819 (1,264 – 248,69)**
GA+AAxTTxCT+TT	4/107	3/85	0,525	1,685 (0,287 – 11,308)
GA+AAxTC+CCxCT+TT	**13/107**	**2/85**	**0,007**	**7,614 (1,582 – 62,709)**

Chú thích: N: số mẫu nghiên cứu, 95% CI: khoảng tin cậy 95%



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%.

Khi kết hợp các tổ hợp gen gây tăng nguy cơ vô sinh nam, thì kết quả cho thấy nguy cơ cũng tăng lên so với nguy cơ gây ra do đơn gen (Bảng 3.11), cụ thể:

Tổ hợp gen giữa *SOD1*x*SOD2*: GAxCT làm tăng nguy cơ lên gần 2 lần so với kiểu gen GA của *SOD1* (OR = 4,343 so với 2,19).

Tổ hợp gen *SOD1*x*CAT*:GAxCT làm tăng nguy cơ lên 1,87 lần so với kiểu gen GA của *SOD1* (OR = 4,101 so với 2,19).

Đối với *SOD2*, tổ hợp kiểu gen SOD1xSOD2:GAxCT làm tăng nguy cơ lên 2,5 lần so với kiểu gen TC của *SOD2* (OR = 4,343 so với 1,748).

Tổ hợp kiểu gen *SOD2*x*CAT*: TC+CCxTC+TT tăng nguy cơ lên 2,2 lần so với tổ hợp gen TC+CC của *SOD2* (OR = 3,166 so với 1,435).

Đối với gen *CAT*, kết quả phân tích đơn gen không cho thấy mối liên hệ giữa biến thể -262C>T với nguy cơ vô sinh nam. Tuy nhiên khi phân tích các tổ hợp gen nguy cơ với *SOD1* hoặc *SOD2* hoặc cả hai gen này, thì nguy cơ vô sinh nam tăng lên, dao động từ 3 đến 8 lần (OR = 3,166-8,819).

Bảng 3.11. So sánh tỉ suất chênh của các kiểu gen và tổ hợp gen tiềm năng liên quan đến nguy cơ vô sinh nam

Đơn gen	**OR đơn gen**	**Tổ hợp gen**	**OR tổ hợp gen**
SOD1		***SOD1*****x****SOD2**	
rs4998577 (7958G>A)		GAxCT	4,343
GA	2,19	***SOD1*****x*****CAT***	
		GAxCT	4,101
SOD2		***SOD1*****x*****SOD2***	
rs4880 (c.47T>C)		GAxCT	4,343
TC	1,748	***SOD2*****x*****CAT***	
TC+CC	1,435	TC+CCxTC+TT	3,166
		SOD1**x*****CAT***	
		GAxCT	4,101
		SOD2**x*****CAT***	
CAT	-	TC+CCxTC+TT	3,166
rs1001179 (-262C>T)		***SOD1*****x*****SOD2*****x*****CAT***	
		GAxTCxCT	8,819
		GA+AAxTC+CCxCT+TT	7,614

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*. Kết quả phân tích thống kê được trình bày cụ thể ở Bảng 3.12.

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%).

Quan sát thấy không có sự khác biệt khi đánh giá sự phân bố của 4 tổ hợp kiểu gen nói trên giữa các bệnh nhân vô sinh nam thuộc hai nhóm có mức độ stress oxy hóa cao và thấp. Như vậy các tổ hợp gen mang các biến thể của *SOD1, SOD2* và *CAT* không có mối liên hệ với đặc điểm stress oxy hóa của các mẫu tinh trùng.

Bảng 3.12. Sự phân bố của các tổ hợp kiểu gen ở giữa hai nhóm bệnh nhân vô sinh nam có mức độ stress oxy hoá tinh trùng cao và thấp

Tổ hợp kiểu gen	**Mức độ stress oxy hoá**		**p**
	Cao (%) **N = 21**	**Thấp (%)** **N = 69**	
***SOD1* (rs4998557) x *SOD2* (rs4880)**			
GGxTT	1/21 (4,76)	7/69 (10,1)	
GGxTC+CC	2/21 (9,52)	8/69 (11,59)	1
GA+AAxTC+CC	9/21 (42,9)	27/69 (39,13)	0,66
GaxTC	8/21 (38)	23/69 (33,3)	0,65
GA+AaxTT	9/21 (42,9)	27/69 (33,3)	0,66
***SOD1* (rs4998557) x *CAT* (rs1001179)**			
GGxCC	2/21 (9,52)	14/69 (20,29)	
GGxCT+TT	1/21 (4,76)	1/69 (1,4)	0,31
GAxCT	2/21 (9,52)	3/69 (4,35)	0,23
GA+AAxCT+TT	4/21 (19)	11/69 (15,94)	0,39
***SOD2* (rs4880) x *CAT* (rs1001179)**			
TTxCC	9/21 (42,9)	31/69 (44,9)	
TCxTC	4/21 (19)	5/69 (7,2)	0,22
TCxTC+TT	4/21 (19)	6/69 (8,7)	0,42
TC+CCxCT+TT	4/21 (19)	9/69 (13,04)	0,711

***SOD1* (rs4998557) x *SOD2* (rs4880) x *CAT* (rs1001179)**			
GGxTTxCC	1/21 (4,76)	7/69 (10,14)	
GGxTC+CCxCT+TT	2/21 (9,52)	8/69 (11,59)	1
GaxTCxCT	2/21 (9,52)	4/69 (5,8)	0,53
GA+AAxTTxCT+TT	1/21 (4,76)	3/69 (4,35)	1

Chú thích: N: số mẫu nghiên cứu

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.

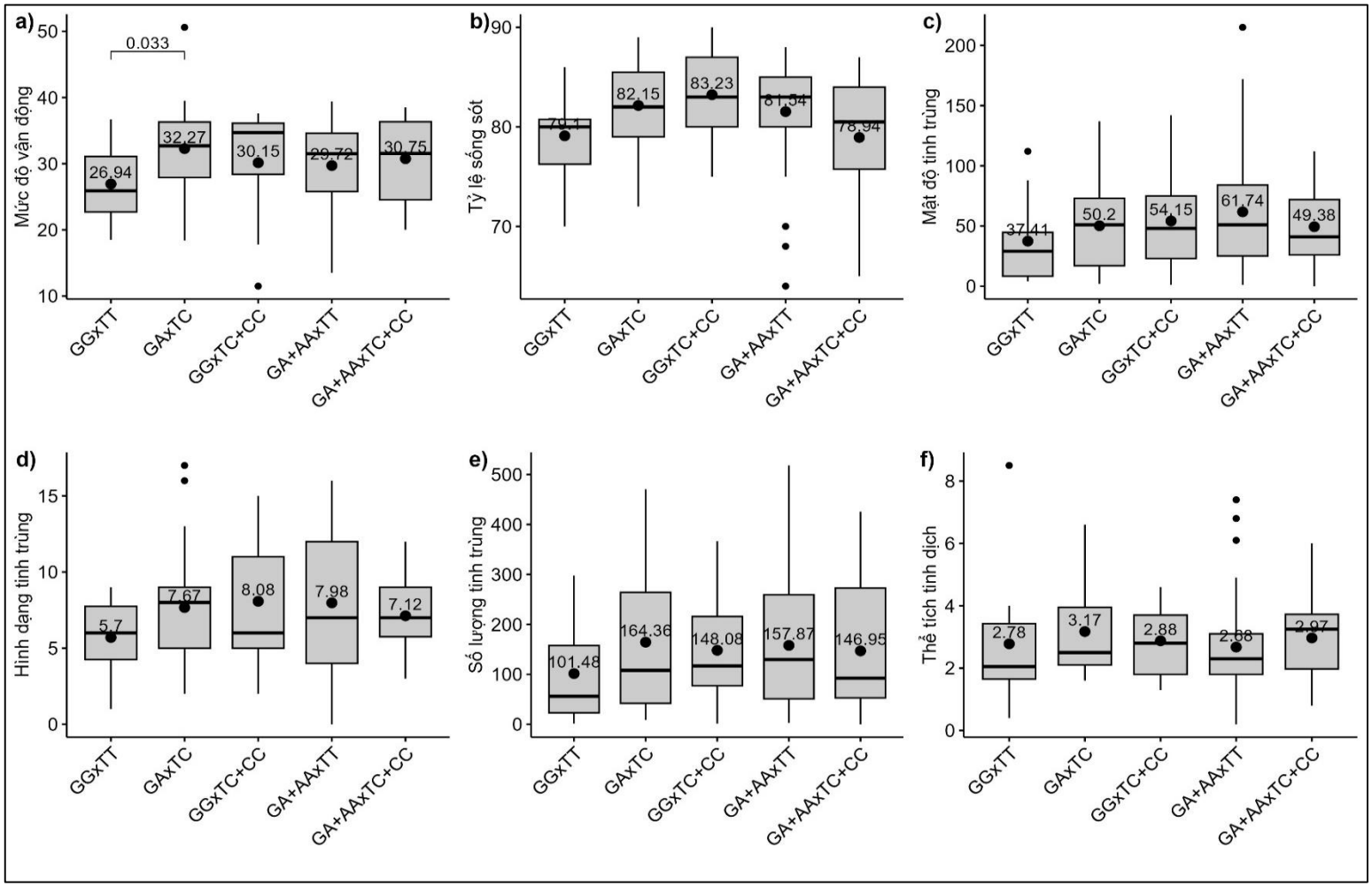
Trong phần này, các tổ hợp gen mang biến thể của SOD1, SOD2 và CAT được khảo sát bao gồm: 4 tổ hợp gen của *SOD1* (rs4998557)-*SOD2* (rs4880), 2 tổ hợp gen của *SOD1* (rs4998557)-CAT (rs1001179), 2 tổ hợp gen của *SOD2* (rs4880)-*CAT* (rs1001179) và 3 tổ hợp gen của *SOD1* (rs4998557)-*SOD2* (rs4880)-*CAT* (rs1001179). Các thông số của tinh trùng được đánh gia bao gồm mật độ, số lượng, tỉ lệ sống và hình thái. Chi tiết kết quả phân tích được thể hiện ở Hình 3.11 đến Hình 3.14.

Xét tổ hợp gen bao gồm 2 gen *SOD1* và *SOD2*: có 4 tổ hợp gen bao gồm GGxTC+CC, GA+AAxTC+CC, GAxTC và GA+AAxTT. Tổ hợp gen GGxTT là tổ hợp gen tham chiếu mang 2 allele kiểu dại của cả 2 gen *SOD1* và *SOD2*. So với tổ hợp gen tham chiếu thì mật độ, số lượng, tỉ lệ tinh trùng sống, độ di động và phần trăm hình thái tinh trùng bình thường đều cao hơn so với trung bình của những bệnh nhân mang tổ hợp gen kiểu dại. Tuy nhiên 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 ($p = 0,032$).

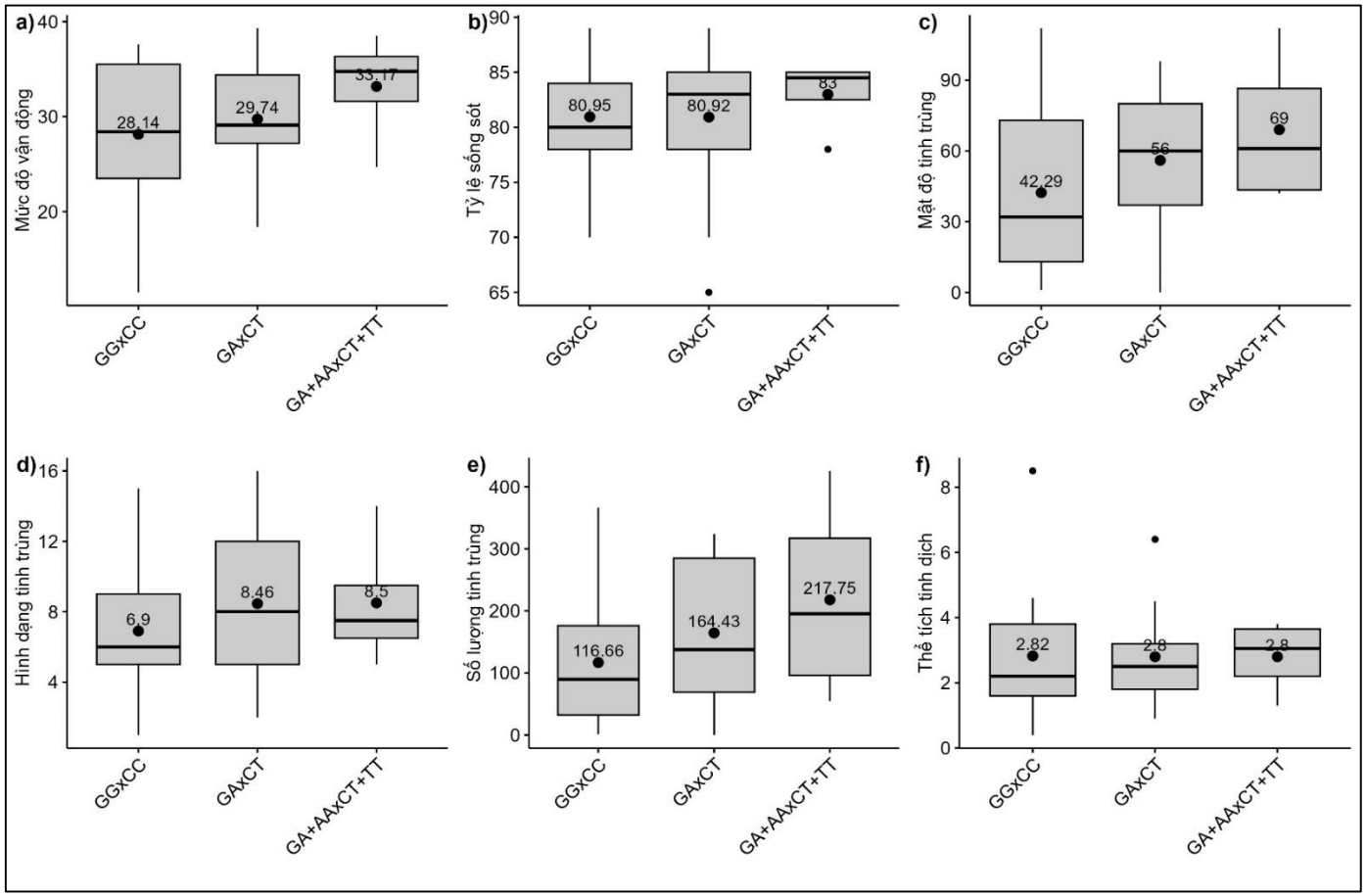
Xét tổ hợp gen bao gồm 2 gen *SOD1* và *CAT*: có 2 tổ hợp gen được khảo sát bao gồm GAxCT và GA+AAxCT+TT. Tổ hợp gen GGxCC là tổ hợp gen tham chiếu mang 2 allele kiểu dại của cả 2 gen *SOD1* và *CAT*. Phân tích thống kê không cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về các thông số của tinh trùng ở những người mang những tổ hợp gen nói trên so với tập hợp bệnh nhân mang tổ hợp gen kiểu dại ($p > 0,05$).

Xét tổ hợp gen bao gồm 2 gen *SOD2* và *CAT*: có 2 tổ hợp gen được khảo sát bao gồm TCxTC và TC+CCxTC+TT. Tổ hợp gen TTxCC là tổ hợp gen tham chiếu mang 2 allele kiểu dại của cả 2 gen *SOD2* và *CAT*. Đánh giá mối liên quan của các thông số tinh trùng với từng tổ hợp gen, kết quả cho thấy 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). Ngược lại, chỉ số này ở nhóm bệnh nhân mang tổ hợp gen TC+CCxTC+TT (74%) thấp hơn so với nhóm đối chứng (p = 0,025).

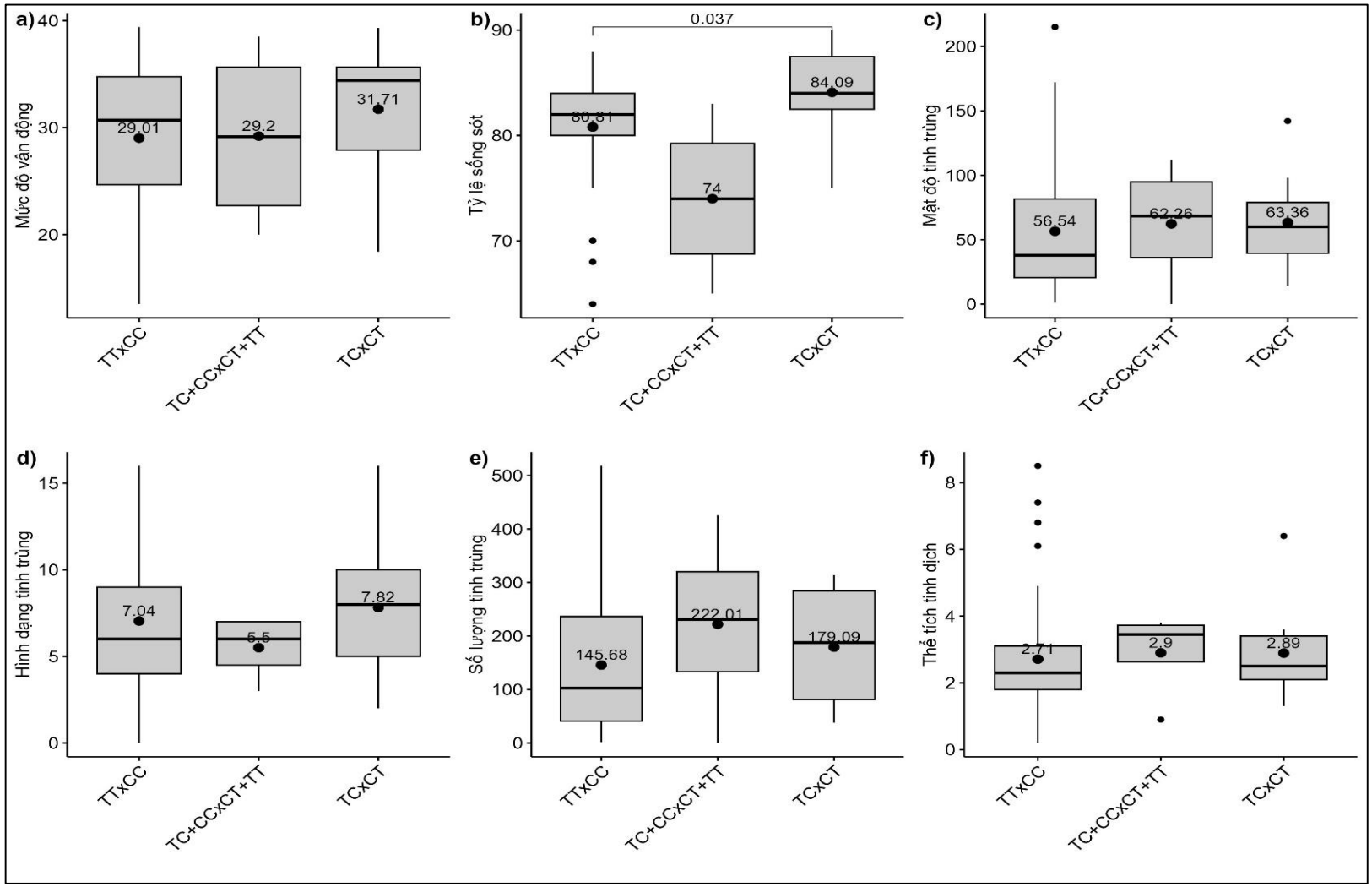
Xét tổ hợp gen bao gồm 3 gen *SOD1, SOD2* và *CAT*: tiến hành đánh giá 3 tổ hợp gen GAxTCxCT, GA+AAxTTxCT+TT và GA+AAxTC+CCxCT+TT. Tổ hợp gen GGxTTxCC mang 3 allele kiểu dại của *SOD1, SOD2* và *CAT*. Phân tích thống kê về sự khác biệt giữa các trị số lâm sàng của tinh trùng của mỗi tổ hợp gen so với tổ hợp gen kiểu dại cho thấy 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). Chỉ số này không có sự khác biệt khi so sánh giữa tổ hợp gen GAxTCxCT và GA+AAxTC+CCxCT+TT so với tổ hợp gen kiểu dại. Quan sát thấy ngoài hình thái tinh trùng thì các thông số về mật độ, số lượng tinh trùng, tỉ lệ sống và độ di động không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các tổ hợp gen quan tâm.



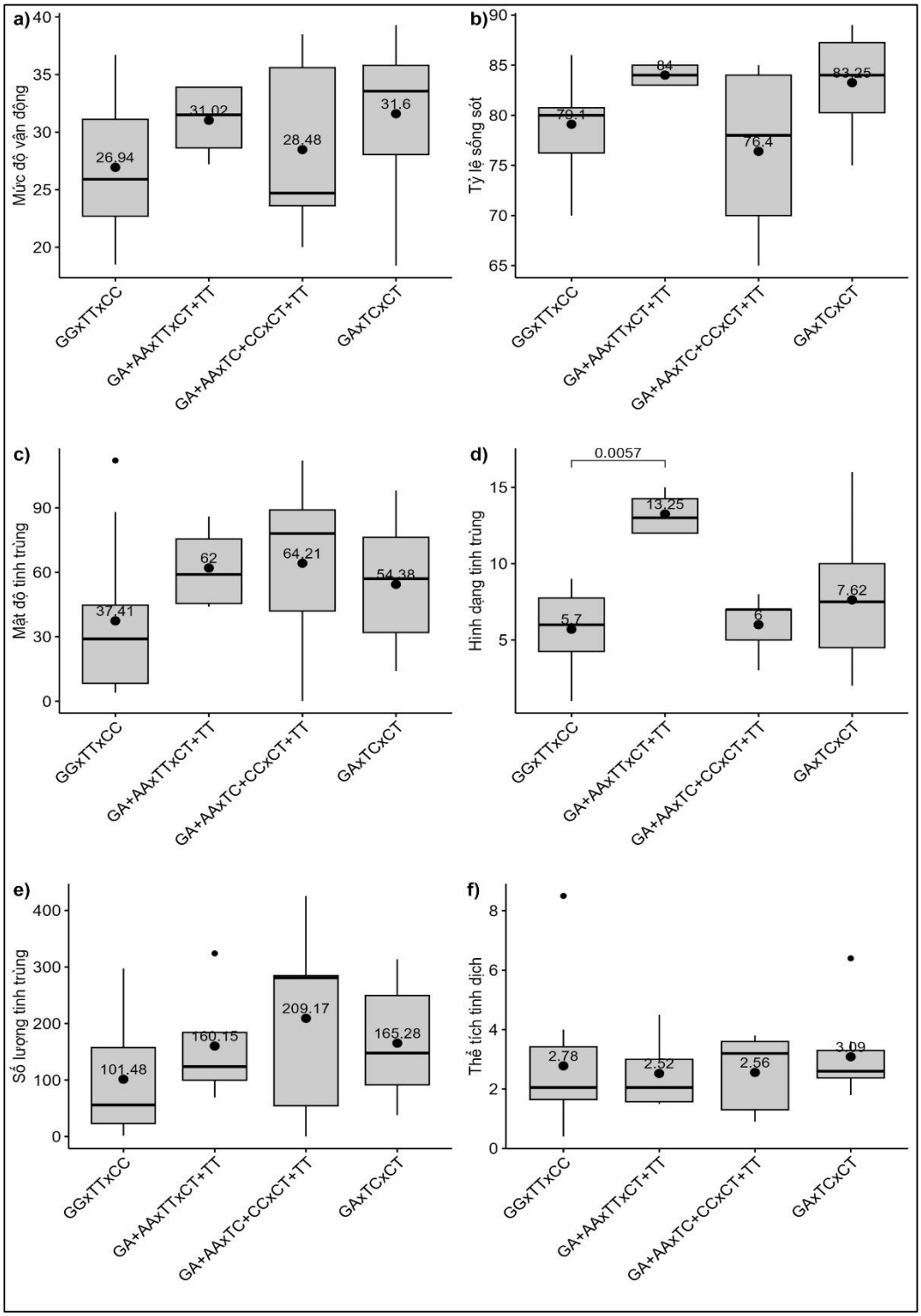
Hình 3.11. Tương quan *SOD1-SOD2* với các thông số của tinh trùng



Hình 3.12. Tương quan *SOD1-CAT* với các thông số của tinh trùng



Hình 3.13. Tương quan *SOD2-CAT* với các thông số của tinh trùng



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

3.4.5. 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 = 18,5-22,9 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 (≤ 22,9) và BMI cao (> 22,9).

Các giá trị -2LL, R Square, BIC, AIC của 4 mô hình đều cho thấy tính phù hợp của các mô hình hồi quy 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 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).

Các thông số phân tích chi tiết được thể hiện ở Bảng 3.13 - Bảng 3.16.

Bảng 3.13. Phân tích đa biến mối liên hệ giữa đa hình gen *SOD1* và yếu tố BMI với tình trạng vô sinh nam

Kiểu gen nguy cơ	**OR**	**95% CI**	***p***
(Intercept)	0,37	0,17 – 0,80	**0,013**
SOD1 7985AA	0,78	0,32 – 1,90	0,588
SOD1 7985GA	2,03	0,97 – 4,27	0,059
BMI [Thừa cân]	3,52	1,77 – 7,22	**<0,001**
Cỡ mẫu	185		
R^2 Tjur	0,11		
Log-Lik Intercept/Full	-126,799/-116,293		
BIC	253,486		
AIC	240,587		

Chú thích: 95% CI: khoảng tin cậy 95%, Log-Lik Intercept: giá trị Log-Likelyhood của mô hình hồi quy trống, Log-Lik Full: giá trị Log-Likelyhood của mô hình hồi quy khi đã bổ sung các biến độc lập, BIC: tiêu chí thông tin Bayes, AIC: tiêu chí thông tin Akaike.

Bảng 3.14. Phân tích đa biến mối liên hệ giữa đa hình gen *SOD2* và yếu tố BMI với tình trạng vô sinh nam

Kiểu gen	**OR**	**95% CI**	**p**
(Intercept)	0,41	0,21 – 0,77	**0,007**
SOD2 c.47CC	2,98	0,69 – 20,5	0,184
SOD2 c.47TC	1,82	0,97 – 3,47	0,066
BMI [Thừa cân]	3,27	1,65 – 6,68	**0,001**
Cỡ mẫu	185		
R^2 Tjur	0,097		
Log-Lik Intercept/Full	-126,799/-117,58		
BIC	256,041		
AIC	243,16		

Chú thích: 95% CI: khoảng tin cậy 95%, Log-Lik Intercept: giá trị Log-Likelyhood của mô hình hồi quy trống, Log-Lik Full: giá trị Log-Likelyhood của mô hình hồi quy khi đã bổ sung các biến độc lập, BIC: tiêu chí thông tin Bayes, AIC: tiêu chí thông tin Akaike.

Bảng 3.15. Phân tích đa biến mối liên hệ giữa đa hình gen *NOS3* và yếu tố BMI với tình trạng vô sinh nam

Kiểu gen	**OR**	**95% CI**	**p**
(Intercept)	0,38	0,19 – 0,70	**0,003**
NOS3 -786CT	2,98	1,49 – 6,22	**0,003**
BMI [Thừa cân]	3,52	1,77 – 7,26	**<0,001**
Cỡ mẫu	185		
R^2 Tjur	0,123		
Log-Lik Intercept/Full	-126,799/-109,972		
BIC	256,487		
AIC	233,944		

Chú thích: 95% CI: khoảng tin cậy 95%, Log-Lik Intercept: giá trị Log-Likelyhood của mô hình hồi quy trống, Log-Lik Full: giá trị Log-Likelyhood của mô hình hồi quy khi đã bổ sung các biến độc lập, BIC: tiêu chí thông tin Bayes, AIC: tiêu chí thông tin Akaike.

Bảng 3.16. Phân tích đa biến mối liên hệ giữa các đa hình gen *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *NOS3* và yếu tố BMI với tình trạng vô sinh nam

Gen	**OR**	**95% CI**	**p**
(Intercept)	0,21	0,08 – 0,49	**0,001**
SOD1 7985AA	0,91	0,36 – 2,32	0,851
SOD1 7985GA	2,16	1,01 – 4,71	**0,049**
SOD2 c.47CC	2,70	0,57 – 19,81	0,250
SOD2 c.47TC	1,70	0,86 – 3,40	0,126

CAT -262CT	1,33	0,53 – 3,53	0,555
NOS3 -786CT	2,76	1,35 – 5,86	**0,007**
BMI [Thừa cân]	3,25	1,58 – 6,91	**0,002**
Cỡ mẫu	185		
R^2 Tjur	0,175		
Log-Lik Intercept/Full	-126,799/-109,972		
BIC	256,487		
AIC	233,944		

Chú thích: 95% CI: khoảng tin cậy 95%, Log-Lik Intercept: giá trị Log-Likelyhood của mô hình hồi quy trống, Log-Lik Full: giá trị Log-Likelyhood của mô hình hồi quy khi đã bổ sung các biến độc lập, BIC: tiêu chí thông tin Bayes, AIC: tiêu chí thông tin Akaike.

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

Ngày nay, vô sinh nam chiếm khoảng 50% vô sinh nói chung, đây được coi là một vấn đề sức khỏe nghiêm trọng. Stress oxy hóa là một trong những yếu tố gây vô sinh nam [156, 157]. Tính đa hình di truyền của các gen chống oxy hóa có thể góp phần vào nguy cơ vô sinh ở nam giới. Nghiên cứu này đã tiến hành đã khảo sát mối liên hệ của bốn đa hình của nhóm các gen tham gia vào con đường chống stress oxy hóa bao gồm: *SOD1* 7958G> A, *SOD2* c.47T> C, *CAT* -262C> T, *NOS3* -786C> T với tình trạng vô sinh nam và mức độ stress oxy hoá của các mẫu tinh dịch.

4.1.1. Đa hình gen SOD1

Các enzyme SOD1 và SOD2 đóng vai trò quan trọng trong việc loại bỏ các ROS trong cơ thể, bảo vệ các tế bào và cơ thể khỏi các gốc tự do và tác hại của quá trình oxy hóa. Tính đa hình của biến thể gen *SOD1* 7958G>A (rs4998557) được báo cáo là có thể liên quan đến ung thư đại trực tràng [158], tình trạng bất thường giới tính [159], mất thính giác thần kinh đột ngột ở người Nhật [160], hoặc bệnh Alzheimer [161].

Cho đến nay, một số nghiên cứu trên chuột đã chỉ ra rằng có sự suy giảm khả năng sinh sản ở tinh trùng chuột thiếu hụt SOD1 [162] hoặc giảm tế bào sinh tinh ở chuột trong môi trường chịu tác động của nhiệt độ cao [112]. Theo nghiên cứu mới nhất cũng trên mô hình chuột NZW, sự thiếu hụt enzyme SOD1 dẫn tới tăng cường quá trình chết của tế bào tại tinh hoàn của chuột và bất thường trong đáp ứng miễn dịch liên quan đến tế bào T [163]. Mặc dù vậy, chưa có nghiên cứu nào cho thấy bằng chứng về sự ảnh hưởng của đa hình gen SOD1 đối với vô sinh ở người.

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 allele 7958A 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 biến thể rs4998557 thuộc gen *SOD1* với vô sinh nam vô căn.

Dữ liệu phân tích trong nghiên cứu cho thấy không có mối liên quan giữa kiểu gen *SOD1* 7958GA với mức độ stress oxy hóa của tinh dịch trong nhóm bệnh nhân, đồng thời mối liên hệ giữa kiểu gen GA với khả năng chống oxy hóa của mẫu tinh dịch chưa có điều kiện để khảo sát trong nghiên cứu này.

Biến thể rs4998557 nằm ở intron 2 thuộc vùng không mã hóa của *SOD1*, sự thay thế nucleotide này không làm thay đổi amino acid nhưng cũng có thể gây nên sai khác trong điều hòa biểu hiện gen cũng như số lượng của các bản phiên mã và từ đó làm suy giảm hoạt tính của enzyme SOD1. Ở động vật có vú, điều hòa phiên mã của một gen là sự kết hợp phức tạp giữa promoter với vùng trình tự tăng cường (enhancer) ở vị trí xa gen chức năng. Một số nghiên cứu đã cho thấy một số promoter điều khiển hoạt động phiên mã thông qua phối hợp với các vùng điều hòa thuộc intron [164]. Trong trường hợp khác, biến thể này có thể có mối liên kết chặt với yếu tố di truyền là nguy cơ thực sự của vô sinh nam. Tuy vậy, việc chứng minh chức năng của những biến thể di truyền nằm trong vùng không mã hóa mà không thuộc các vị trí thiết yếu cho quá trình cắt nối mRNA như donor và acceptor site vẫn còn là một thách thức lớn.

4.1.2. Đa hình gen SOD2

Đối với *SOD2*, các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng đa hình SOD2 c.47T> C (rs4880) có liên quan đến vô sinh nam [8, 11, 27, 38-40]. Hầu hết dữ liệu từ các nghiên cứu đều thống nhất kiểu gen *SOD2* c.47CC có mối liên quan tới giảm hoạt tính của enzyme này, ngoại trừ nghiên cứu của Garcia-Rodriguez, de la Casa [27].

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 [8, 11, 38-40]. 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. Cụ thể hơn, sự thay thế Valine thành Alanine tại vị trí amino acid 16 làm thay đổi cấu hình của SOD2, dẫn tới giảm hiệu quả vận chuyển SOD2 vào trong ti thể [165]. Tình huống này ngược lại ở những người mang kiểu gen đồng hợp tử TT với hoạt tính nguyên vẹn của SOD2, không quá nhạy cảm với mất cân bằng các ROS và từ đó giảm nguy cơ vô sinh nam. 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.

Quan sát thấy tỉ lệ người mang kiểu gen CC ở nhóm bệnh nhân (7,48%) vẫn cao hơn so với nhóm đối chứng (2,35%) tuy vậy sự khác biệt không đạt mức ý nghĩa thống kê. 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 việc giảm chất lượng tinh trùng ở nam giới. Ngược lại, nghiên cứu trên các bệnh nhân Brazil cũng đã đưa ra giả định về tình trạng mất cân bằng ion âm superoxide-H_2O_2 gây ra do biến đổi c.47T>C và từ đó làm giảm chất lượng tinh trùng ở những bệnh nhân mang kiểu gen đồng hợp tử TT hoặc CC so với kiểu gen dị hợp tử TC.

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*. Sự hiện diện của biến thể này được cho rằng ảnh hưởng đến

mức độ biểu hiện cũng như hoạt tính của enzyme này. Mối liên hệ giữa biến thể rs1001179 của gen *CAT* với hoạt tính thủy phân của enzyme CAT đã được khảo sát trong nhiều nghiên cứu ở nhiều đối tượng bệnh nhân như Alzheimer, bệnh bụi phổi và bệnh bạch biến. Ảnh hưởng của biến thể *CAT* -262C>T đến hoạt tính CAT cũng đã được khảo sát, trong điều kiện stress oxi hoá với sự hiện diện của H_2O_2, người mang allele -262T có hoạt tính của enzyme catalase thấp hơn so với người mang kiểu gen -262CC [166].

Nghiên cứu này cho thấy không có sự khác biệt đáng chú ý về tần số kiểu gen và tần số allele giữa nhóm bệnh nhân hiếm muộn và nam giới khỏe mạnh có khả năng sinh sản bình thường. Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả của Bousnane trên nhóm bệnh nhân nam hiếm muộn người Algeria [167]. Cụ thể, nghiên cứu trên 111 nam giới vô sinh và 104 đối chứng ở khu vực Đông Angieria của Bousnane và cs không xác định được mối liên hệ giữa biến thể CAT -262C>T với tình trạng vô sinh.

Tuy nhiên, đối lập những kết quả này của các nghiên cứu trước đây đã báo cáo rằng kiểu gen đồng hợp tử -262CC làm tăng nguy cơ vô sinh nam, trong khi đó kiểu gen dị hợp tử -262CT làm giảm nguy cơ này [115, 168]. Đồng thời, dữ liệu nghiên cứu trên 190 đối chứng và 195 bệnh nhân nam vô sinh vô căn người Iran cho thấy kiểu gen đồng hợp tử đột biến TT làm giảm nguy cơ vô sinh nam [115].

Giải thích cho quan sát này có thể đến từ bằng chứng nghiên cứu trước đây, khi có dữ liệu cho thấy hoạt tính của enzyme CAT trong máu cao hơn có ý nghĩa thống kê ở những người mang allele -262T so với đối chứng (nghiên cứu trên người Thụy Điển) mang kiểu gen đồng hợp tử -262CC [169]. Bằng chứng cho thấy biến thể -262C>T làm thay đổi mức độ phiên mã của *CAT* thông qua thay đổi mối kết hợp với yếu tố phiên mã có thể là cơ chế ẩn sau mối liên hệ kiểu gen-kiểu hình này [169].

Một số phân tích về hoạt tính của enzyme CAT cho thấy có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm vô sinh so với nhóm đối chứng, đồng thời hoạt tính enzyme này cũng

giảm rõ rệt ở một số phân nhóm trong nhóm vô sinh nam so với nhóm đối chứng [167].

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 [170]. Trong khuôn khổ cỡ mẫu của nghiên cứu là 107 bệnh-85 đối chứng, dữ liệu từ phân tích 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. Tương tự chúng tôi cũng không xác định được mối liên hệ giữa đa hình gen CAT với đặc điểm stress oxy hoá của tinh trùng. Tuy vậy, kiểu gen dị hợp tử -262CT có tỉ lệ phần trăm 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 *CAT* -262T chỉ khoảng 2-3% ở khu vực châu Á và châu Phi, 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 tiến hành 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 [7, 22-24, 41]. Các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng allele *NOS3* -786C có liên quan đến nguy cơ đối với các thông số tinh dịch kém ở người Iran [122] hoặc liên quan đến mức độ phân mảnh DNA của tinh trùng cao hơn và làm tăng nguy cơ vô sinh ở nam giới Trung Quốc [171].

Mặc dù tần số của allele *NOS3* -786C trong nghiên cứu này là rất thấp (chỉ có ba bệnh nhân mang allele này), nhưng kết quả thu được trong nghiên cứu này phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước đây [108, 172]. Đặc biệt, quan sát trong nghiên cứu này cho 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.

Phân tích mô hình di truyền trội cũng cho thấy tổ hợp kiểu gen CC và CT làm tăng nguy cơ vô sinh nam so với tổ hợp gen kiểu dại. Ngược lại, kiểu gen đồng hợp kiểu đột biến TT lại là yếu tố bảo vệ giúp giảm nguy cơ vô sinh ở nam giới.

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 qun trọng vì chất này giúp giảm sự hình thành của các ion âm superoxide. Nguyên nhân là do sự hiện diện của NO làm hoạt hoá sự biểu hiện của enzyme superoxide dismutase, đây là enzyme chống oxy hoá xúc tác cho quá trình chuyển đổi ion superoxide thành H_2O_2. Một phần đặc tính chống oxy hoá của NO cũng xuất phát từ khả năng điều chỉnh tăng biểu hiện của heme-oxygenase-I và feritin, từ đó làm giảm nồng độ ion superoxide trong các mạch máu. 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 [173, 174]. 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, gây mất cân bằng oxy hoá và là một trong những nguy cơ gây nên tình trạng vô sinh.

Thực tế đã quan sát thấy các bản phiên mã của *NOS3* ở những mẫu tinh trùng giảm độ di động, ngược lại không thể xác định được ở hầu hết các mẫu tinh dịch mà tinh trùng có độ di động tốt [175]. Nhóm bệnh nhân vô sinh nam vô căn có tinh trùng kém di động cũng cho thấy bằng chứng mức độ biểu hiện của NOS3 cao [176]. Mặc dù nghiên cứu này xác định được mối liên hệ giữa allele -786C và kiểu gen -786CT với nguy cơ vô sinh nam, nhưng đa hình này của gen *NOS3* lại không thể hiện mối liên quan có ý nghĩa thống kê với các thông số của tinh trùng, đặc biệt là mức độ di động và mức độ stress oxy hoá của các mẫu tinh dịch. Do đó, trong những nghiên cứu tiếp theo, một vấn đề cần làm rõ là 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 đánh giá liệu 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*.

Stress oxy hóa có thể gây nên vô sinh nam thông qua nhiều cơ chế như: tổn thương màng tinh trùng (làm giảm khả năng di động và giảm khả năng thụ tinh), tổn thương DNA tinh trùng (giảm khả năng thụ tinh, ảnh hưởng tiêu cực đến phát triển phôi), tăng cường sự thoái triển của tinh trùng. Đã có nhiều bằng chứng khoa học cho thấy, stress oxy hóa là nguyên nhân phổ biến nhất gây nên sự phân mảnh của DNA tinh trùng [177]. Đồng thời, mức độ phân mảnh tinh trùng cao đã được quan sát thấy ở những nam giới vô sinh so với người khỏe mạnh [178]. Ngoài ra, đã có những bằng chứng về mối liên hệ giữa tính toàn vẹn DNA tinh trùng với các thông số của tinh trùng, trong đó mức độ phân mảnh DNA tinh trùng có mối liên hệ nghịch với tỉ lệ sống của tinh trùng, mật độ tinh trùng và tỉ lệ di động tiến tới của tinh trùng [179, 180].

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

SOD và CAT là những enzyme quan trọng được điều chỉnh bởi con đường truyền tín hiệu liên quan đến yếu tố nhân erythroid 2/yếu tố phản ứng chống oxy hóa (NFR2/ARE), tham gia vào quá trình bảo vệ tế bào bằng cách loại bỏ các superoxide. Hơn nữa, 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 [181, 182].

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).

Một điều đáng lưu ý trong phân tích này đó là 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.

Thực tế trong nghiên cứu này, khi kết hợp các tổ hợp gen nguy cơ của các gen mã hoá cho các enzyme nằm trong một con đường tín hiệu bao gồm *SOD1, SOD2* và *CAT* cho thấy kết quả nguy cơ vô sinh của các tổ hợp gen đều tăng lên so với khi đánh giá đơn gen. Trong khuôn khổ khảo sát trên cỡ mẫu thu được (107 bệnh và 85 đối chứng), biến thể rs1001179 của gen *CAT* không thể hiện mối liên hệ nào với tình trạng vô sinh, đặc điểm lâm sàng của tinh trùng cũng như mức độ stress oxy hoá của các mẫu tinh dịch. Nhưng khi kết hợp với các tổ hợp gen *SOD1, SOD2* hoặc cả hai tổ hợp gen này thì đã xác định được nguy cơ vô sinh nam, thậm

chí nguy cơ vô sinh còn cao hơn khi so với các kiểu gen dị hợp tử riêng lẻ của *SOD1* và *SOD2* đã được xác định trước đó.

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

Ngày nay, tỷ lệ vô sinh không rõ nguyên nhân vẫn còn nhiều, việc điều trị vô sinh và vô sinh nam hiệu quả vẫn chưa cao. Trong xu hướng cá thể hóa để tăng cường hiệu quả điều trị, giảm các tác dụng phụ, tác động không mong muốn của điều trị thì việc tìm hiểu rõ nguyên nhân vô sinh nói chung, vô sinh nam nói riêng là rất cần thiết [166, 154, 181].

Mất cân bằng hệ thống chống oxy có liên quan đến vô sinh và một số các bệnh khác (chủ yếu là các bệnh mãn tính và ung thư) do nhiều cơ chế khác nhau nên việc tìm rõ có chế bệnh sẽ giúp cho việc điều trị hiệu quả hơn, đặc hiệu hơn [67, 69, 166].

Cũng giống như các bệnh nhiễm trùng, người ta có thể dùng kháng sinh để điều trị. Vậy tại sao phải tạo ra lắm loại kháng sinh đến thế. Câu trả lời là mỗi loại vi khuẩn có đặc điểm khác nhau, có cấu trúc di truyền khác nhau nên có thể đề kháng khác nhau với các loại kháng sinh nên cần có nhiều loại kháng sinh để có thể điều trị đặc hiệu cho từng loại bệnh nhiễm trùng. Các chủng tộc người khác nhau cũng có các đặc điểm bệnh tật khác nhau ví dụ ở Mỹ các bệnh dị ứng rất nhiều nên thuốc chống dị ứng là thuốc được sử dùng rất nhiều ở đây trong khi Việt Nam lại rất ít sử dụng.

Liên quan đến ý nghĩa của việc xác định các đa hình gen chống oxy hóa, nhiều tác giả cho rằng việc xác định các đa hình gen chống oxy hóa vừa là để xác định nguyên nhân gây vô sinh nam, nó cũng giúp cho việc điều trị đặc hiệu hơn. Ví

dụ có đa hình ở gen *CAT* gây giảm hoạt động của protein chống oxy hóa tương ứng thì có thể điều trị đặc hiệu bằng catalase extreme, đa hình gây giảm hoạt động của gen *GSTP* thì dùng glutathione sẽ tốt hơn… [90, 94, 169].

Việc xác định các đa hình gen chống oxy hóa không những để xác định nguyên nhân gây vô sinh nam giúp cá thể hóa việc điều trị, nó còn là cơ sở để các nhà dược học sản xuất thêm các chế phẩm (ví dụ các enzyme tham gia vào quá trình chống oxy hóa) dùng cho điều trị vô sinh và một số bệnh có liên quan đến mất cân bằng hệ thống oxy hóa và chống oxy như bệnh ung thư và một số bệnh mãn tính như bệnh tim mạch… [66, 72, 73, 191, 192].

Hiện tại đã có một số thuốc được phát triển để thay thế, khắc phục tình trạng thiếu hụt hoặc giảm chức năng của một số enzyme chống oxy hóa như CoQ10, catalase, glutathione… [90, 102, 169]. Tuy nhiên việc phát hiện thêm các đa hình liên quan đến giảm chức năng của các emzyme chống oxy hóa khác được phát hiện sẽ là cơ sở tốt cho các nhà dược học phát triển thêm các thuốc cho điều trị tình trạng stress oxy giúp cho quá trình điều trị đặc hiệu hơn, hiệu quả hơn.

Hy vọng các số liệu của các nghiên cứu đa hình gen chuyển hóa chống oxy và các test oxy hóa sẽ góp phần là cơ sở cho việc điều trị cá thể hóa cho vô sinh, giúp cho việc điều trị vô sinh hiệu quả hơn, đặc hiệu hơn. Nghiên cứu này của chúng tôi hy vọng cũng góp phần tìm rõ nguyên nhân vô sinh nam đặc biệt ở các đối tượng chưa xác định được nguyên nhân vô sinh giúp cho việc điều trị vô sinh ở Việt Nam tốt hơn, đặc hiệu hơn.

Stress oxy hóa là một trong những nguyên nhân chính gây nên tình trạng vô sinh nam, khởi nguồn từ sự hình thành các ROS và khả năng chống oxy hóa của tinh trùng giảm, từ đó ảnh hưởng xấu đến chất lượng tinh trùng. Theo thống kê của WHO, Việt Nam là một trong những quốc gia có tỷ lệ vô sinh cao trên thế giới và 50% số ca bệnh nằm ở độ tuổi dưới 30, tỉ lệ vô sinh nam cũng ngày càng trẻ hóa. Con số này thống kê toàn cầu của WHO cũng đang tăng lên. Như vậy có thể thấy tầm quan trọng trong những phát hiện về mối liên quan giữa đa hình các gen tham gia vào con đường chống oxy hóa với đặc điểm vô sinh. Những dữ liệu thu được từ các quần thể người đều quý báu, một mặt bổ sung những thông tin quan trọng trong

mạng lưới chống oxy hóa của cơ thể, mặt khác tạo cơ sở khoa học cho việc sàng lọc, đánh giá nguy cơ vô sinh trong lâm sàng.

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 (nếu nguyên nhân vô sinh có liên quan đến mất cân bằng chống oxy hóa) sẽ tạo hiệu quả tích cực trong thụ tinh thành công. Tuy nhiên hiện nay, chỉ có một số ít các nghiên cứu ngẫu nhiên có đối chứng đã chứng minh mối liên hệ này. 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). Một phân tích tổng hợp tương tự bao gồm 11 nghiên cứu về dữ liệu mang thai tự nhiên cho thấy kết hợp các chất chống oxy hoá giúp tăng tỉ lệ mang thai từ 7% lên 12-26% (tăng từ 1,7-3,7 lần) [183].

ROS có vai trò sinh lý trong hoạt động bình thường của tinh trùng, nhưng có thể gây độc cho tinh trùng nếu ở nồng độ cao. Khả năng tự phục hồi của tinh trùng đối với các tổn thương của stress oxy hoá là rất thấp. Các chất chống oxy hoá, gồm có vitamin C, vitamin E, kẽm, selenium, acid folic, carnitine, astaxan-thin, n-acetyl cysteine..., có thể tác động làm sạch và loại trừ tác động của ROS thông qua việc ức chế sự hình thành và đối kháng với các tác động của ROS. Do đó, việc sử dụng các chất chống oxy hóa trong điều trị nhằm làm giảm của stress oxy hoá lên tinh trùng, qua đó phục hồi chức năng của tinh trùng được nghiên cứu rất nhiều trong những năm qua.

Một số đa hình gen chuyển hóa xenobiotic có thể gây tăng nguy cơ đứt gãy DNA của tinh trùng, làm tăng khả năng và mức độ vô sinh. Việc xét nghiệm đa hình gen chuyển hóa xenobiotic là cần thiết góp phần xác định nguyên nhân vô sinh nam nguyên phát, xác định mức độ đứt gãy DNA của tinh trùng. Đây là xét nghiệm cần thiết góp phần xác định mức độ vô sinh, định hướng cho điều trị và theo dõi quá trình điều trị [181].

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 [184]. Có khoảng 1,3 triệu chu trình ART trong năm 2016 ở các nước này. Mặc dù đã có có rất nhiều tiến bộ trong những năm qua, tỉ lệ thành công của ART vẫn chưa đạt được như mong đợi trong một số trường hợp và cần có những sự cải tiến xa hơn [185]. 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. Đồng thời, tinh trùng vốn rất nhạy cảm với stress oxy hóa do chứa thành phần lớn là các acid béo omega 3 chưa bão hòa trên màng tế bào và những hạn chế trong hàng rào chống oxy hóa trong tế bào chất.

Ở tinh trùng, các phản ứng oxy hóa khử lipid gây nên bởi stress oxy hóa dẫn tới phá hủy màng ti thể và mất chức năng của ti thể, làm giảm lượng adenosine triphosphate được sản sinh. Bên cạnh đó, oxy hóa khử lipid làm giảm độ linh động của màng tinh trùng, từ đó can thiệp vào phản ứng acrosome và sự dung hợp giữa trứng-tinh trùng. Ngoài ra, lượng ROS ở mức độ bệnh lý cũng là nguyên nhân gây nên sự phân mảnh DNA của tinh trùng. 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) [186] và thụ tinh nhân tạo (in vitro fertilization-IVF) [187-189].

Mức độ phân mảnh của tinh trùng cao cũng có liên quan tới giảm chất lượng phôi [187], tăng tỉ lệ sảy thai [187, 190] sau khi can thiệp IVF và ICSI.

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. Mặt khác, ROS cũng có thể được tạo thành trong quá trình rã đông các ống bảo quản phôi đông lạnh. Tất cả những yếu tố nói trên đều có thể ảnh hưởng đến bất kỳ giai đoạn nào trong các can thiệp ART, từ quá trình chuẩn bị giao tử (tinh trùng/trứng), thụ tinh cho tới sự hình thành phôi và giai đoạn phôi nang (Blastocyst). 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. Cụ thể, bổ sung chất chống oxy hóa trong môi trường *in vitro* và môi trường trữ đông đã cho thấy một số kết quả đáng khích lệ về hiệu quả can thiệp.

Đối với IUI, một thử nghiệm ngẫu nhiên mù đôi từ 9 trung tâm tại Mỹ công bố năm 2020 cho thấy việc sử dụng các chất chống oxy hóa bao gồm các vitamin C, E, selenium, kẽm, acid folic và lycopene không có ảnh hưởng thực sự đến chất lượng tinh trùng, tỉ lệ mang thai và tỉ lệ trẻ sinh thành công [191]. Tuy nhiên hạn chế của nghiên cứu này là lượng bệnh nhân tham gia không nhiều. Đối với IVF/ICSI, các thử nghiệm ngẫu nhiên có đối chứng gặp phải sự kiểm soát chặt chẽ hơn trong lĩnh vực này, do đó chỉ một số ít nghiên cứu phân tích tác động của chất chống oxy hoá đối với tỉ lệ mang thai thành công sau khi can thiệp IVF hoặc ICSI với cỡ mẫu nhỏ.

Một nghiên cứu tiến cứu ngẫu nhiên có đối chứng, mù đôi được thực hiện tại Úc trên 60 bệnh nhân (từ năm 2004 đến năm 2006) đã báo cáo việc sử dụng kết hợp các chất chống oxy hoá có chứa lycopene, vitamin E và C, kẽm, folate hàng ngày trong vòng 3 tháng trước khi thực hiện IVF/ICSI đã cho kết quả tỉ lệ mang thai và làm tổ thành công tăng lên so với nhóm không sử dụng chất chống oxy hoá [192].

Một nghiên cứu không có đối chứng trên những cặp đôi người Israel cho thấy việc sử dụng vitamin E trong 1-3 tháng đã tăng tỉ lệ thụ tinh thành công nhờ IVF [193]. Hơn nữa, nghiên cứu không đối chứng trên 38 bệnh nhân người Ý có tiền sử thực hiện ICSI thất bại và mức độ phân mảnh tinh trùng cao đã báo cáo việc bổ sung vitamin C và E bằng đường uống trong hai tháng trước lần thực hiện ICSI tiếp theo đã cải thiện tỉ lệ mang thai và làm tổ so với lần thực hiện ICSI đầu tiên [194].

Trữ đông tinh trùng là một quy trình thông thường và đóng vai trò quan trọng trong các phòng thí nghiệm thực hiện ART. Tuy nhiên, tinh dịch khi trải qua quá trình làm đông lạnh và rã đông trở lại sẽ gặp phải một số yếu tố như nhiệt độ, sự

hình thành các tinh thể băng và sự xuất hiện của các ROS vốn đều có thể gây tổn thương tinh trùng. Những thương tổn do làm lạnh bao gồm mất tính toàn vẹn của màng tinh trùng, ảnh hưởng tới chuyển động và tăng nguy cơ phân mảnh DNA [195, 196]. Liên quan đến khía cạnh này, bổ sung các chất chống oxy hóa như vitamin C và E, SOD, CAT, glutathione, melatonin, ergothioneine và một số tinh chất thảo mộc tự nhiên vào ống trữ đông tinh trùng đã cho thấy tăng chất lượng tinh trùng và thậm chí cải thiện dư lượng ROS sau quá trình rã đông [197, 198].

Một phân tích tổng hợp cho thấy bổ sung các vitamin trong môi trường trữ đông giúp tăng độ di động 4,6% (p = 0,0001), khả năng sống tăng 5,71% (p = 0,0001) và cải thiện tính toàn vẹn của DNA 10,2% (p = 0,0001) của tinh trùng sau khi rã đông [199]. Mặc dù nghiên cứu này không khẳng định được loại/liều lượng vitamin cần thiết nhưng kết luận đưa ra rất rõ ràng về lợi ích của việc kết hợp các vitamin trong môi trường trữ đông tinh trùng.

Như vậy việc truy tìm những dấu ấn phân tử trong nhóm gen chống oxy hóa giúp bổ sung dữ liệu trong quần thể và từ đó có thể gợi ý điều trị hiếm muộn theo hướng sử dụng chất chống oxy hóa khi mang thai tự nhiên cũng như trong quá trình can thiệp hỗ trợ sinh sản cho những đối tượng mang kiểu gen nguy cơ. 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.

Khảo sát về tỉ lệ mang thai thành công khi can thiệp IVF trên người Tây Ban Nha cho thấy những phụ nữ mang kiểu gen đột biến *SOD2* c.47CC (Ala/Ala) có tỉ lệ mang thai cao hơn so với những người mang kiểu gen dị hợp tử c.47TC (Val/Ala) và đồng hợp tử kiểu dại TT (Val/Val) [107]. Quan sát này được lý giải rằng ở những cá thể mang kiểu gen *SOD2* c.47CC thì trong quá trình thụ tinh các tế bào trứng có xu hướng được bảo vệ hiệu quả hơn khỏi tác động tiêu cực của quá trình oxy hóa gây ra bởi các ROS.

Một điều đáng ghi nhận đó là có sự khác biệt giữa các quần thể người trong hiệu quả can thiệp hỗ trợ sinh sản bằng IVF/ICSI đã được báo cáo. Cụ thể, với những phụ nữ châu Á, đây là khu vực mà kiểu gen đồng hợp tử đột biến *SOD2*

16Val/Val chiếm ưu thế hơn, tỉ lệ mang thai thành công khi can thiệp IVF là thấp hơn so với người da trắng [200]. Đây là những dữ liệu quý giá thể hiện vai trò của hàng rào chống oxy hóa của cơ thể, nhất là tại ti thể là yếu tố quan trọng đối với khả năng thành công khi can thiệp IVF. Tuy nhiên, những quan sát của hai nghiên cứu này dường như không phù hợp với giả thiết trước đây về ảnh hưởng của biến đổi rs4880 thuộc gen *SOD2*, trong đó sự thay thế Valine thành Alanine tại vị trí amino acid 16 làm biến đổi cấu hình của SOD2 và từ đó tác động xấu đến chức năng của SOD2. Hiện tại, ngoài *SOD2*, chưa có dữ liệu về ảnh hưởng của đa hình các gen chống oxy hóa khác lên hiệu quả lâm sàng khi can thiệp ART.

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 có thêm 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. Đồng thời những nghiên cứu mở rộng này là tiền đề cung cấp những dấu ấn di truyền góp phần quan trọng trong đánh giá mức độ rủi ro về vấn đề sinh sản của nam giới cũng như phương pháp can thiệp/hỗ trợ có hiệu quả nhất đối với gia đình người bệnh nhằm nâng cao chất lượng cuộc sống tốt nhất cho các cặp vợ chồng hiếm muộn.

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 vòng hơn hai thập kỷ qua, rất nhiều nghiên cứu đã chứng minh chức năng của một số biến thể di truyền thuộc các gen *CAT, GPX, GST, NOS, NRF2* và *SOD* có liên quan đến vô sinh nam. Tình trạng vô sinh nam từ trung bình đến

nghiêm trọng cũng đã được quan sát thấy ở các mô hình động vật khi loại bỏ các gen *Nrf2*, *Sod*, *Gpx*.

Bên cạnh những biến thể gen chính thuộc nhóm gen chống oxy hóa kể trên thì những biến đổi di truyền ngoại gen cũng có thể là nguyên nhân tác động đến sự thay đổi hoạt tính chống oxy hóa thông qua điều hòa biểu hiện gen cấp độ phiên mã. Một ví dụ là *SLC22A3*-một gen chống oxy hóa mới cho thấy giảm biểu hiện gen này có tác động đến sự tổn thương DNA do stress nhiệt gây nên, hình thành các ổ γ-H2AX trong các tế bào biểu mô thực quản. Đã có bằng chứng chỉ ra rằng methyl hóa vùng promoter của gen *SLC22A3* làm giảm điều hòa biểu hiện gen, từ đó tăng nguy cơ ung thư thực quản [201]. Con đường tín hiệu NRF2/KEAP1 đóng vai trò là hàng rào bảo vệ tế bào trong các điều kiện stress oxy hóa-yếu tố liên quan đến sự hình thành của các khối u [202, 203].

Những cơ chế biến đổi di truyền ngoại gen điều hòa con đường tín hiệu NRF2/KEAP1 trong điều kiện stress oxy hóa bao gồm methyl hóa DNA, acetyl hóa protein histone và các ncRNA. Việc nhắm đích đến điều chỉnh những biến đổi ngoại gen của NRF2/KEAP1 được đề xuất như là một liệu pháp hứa hẹn trong điều trị ung thư [204].

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.

Trong giai đoạn hiện nay, NGS đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu sàng lọc nhiều bệnh tật di truyền phức tạp nhờ khả năng cung cấp bộ dữ liệu lớn về hệ gen người. Với tiền đề như vậy, chúng ta hy vọng sẽ mở rộng các kỹ năng tương tự trong chẩn đoán phân tử trên nhóm các gen chịu trách nhiệm cho các con đường bảo vệ cơ thể khỏi stress oxy hóa. Thực tế, biến đổi trong vài trăm gen đều có thể là nguy cơ dẫn tới vô sinh và mỗi cá thể trong quần thể chung có khả năng chỉ chịu tác động bởi một số gen/tổ hợp gen nhất định.

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, đây là hướng sàng lọc nên cân nhắc đối với con cháu của các gia đình có tiền sử hiếm muộn.

GWAS là cách tiếp cận hữu dụng trên cơ sở 2 nhóm bệnh/chứng với xu hướng tìm kiếm gen ứng viên, biến thể gen tiềm năng đóng vai trò nguy cơ của một tính trạng/bệnh cụ thể. Như đã đề cập ở những nội dung trước, hiện nay GWAS đã phát hiệu nhiều locus gen mới là yếu tố nguy cơ của vô tinh không do tắc nghẽn ống dẫn tinh như *PRMT6, PEX10, SOX5, GEK, CHD2, GNAO1, BCL2* [135, 136, 205]. Đặc biệt, gần đây, nghiên cứu GWAS trên người Hy Lạp (92 đối chứng và 100 bệnh nhân nam vô tinh hoặc tinh trùng bất thường về vận động và hình thái) đã phát hiện 6 lncRNA bao gồm LINC02231, LINC02134, NCRNA00157, LINC02493 và Lnc-CASK-1 có nguy vơ gây vô sinh nam thông qua tương tác với các miRNA [206].

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 chắn 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.

Việc phát hiện các biến thể gen chống oxy hóa còn là cơ sở tốt để các nhà sản xuất thuốc tạo ra các thuốc mới, giúp điều trị hiệu quả cho những bệnh nhân thiếu hụt enzyme tương ứng, như: thuốc catalase điều trị khi thiếu enzyme catalase; hay glutathion điều trị cho tình trạng có đột biến gen GSTT, GSFP....

Việc phát hiện các đa hình gen chống oxy hóa và mức độ oxy hóa trong tinh dịch của những người vô sinh là nam ở Việt Nam cũng là cơ sở gợi ý hướng điều trị vô sinh ở nước ta hiệu quả hơn.

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 chống oxy hoá *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. Trong đó, kiểu gen *SOD1* 7958GA và *NOS3* -786CT ở nhóm vô sinh cao hơn so với nhóm chứng lần lượt với OR = 2,191 (CI 95%: 1,226–3,915, p = 0,004) và OR = 3,135 (CI 95%: 1,591–6,180, p < 0,001). Tần suất của kiểu gen *SOD2* c.47TC ở nhóm nam giới vô sinh cao hơn so với nam giới có khả năng sinh sản (OR = 1,941, CI 95%: 1,063–3,595, p = 0,029).

2. Đã xác định được mức độ stress oxy hoá của các mẫu tinh dịch của 90 nam giới thiểu tinh nặng: 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, cụ thể như sau:

- Yếu tố nguy cơ gây vô sinh nam bao gồm các biến thể gen *SOD1* 7958G>A (kiểu gen GA), *SOD2* c.47T>C (kiểu gen TC và allele C), *NOS3* -786C>T (kiểu gen CT, allele C).
- Yếu tố đóng vai trò bảo vệ khỏi nguy cơ gây vô sinh nam bao gồm các biến thể *SOD2* 7958G>A (kiểu gen TT) và *NOS3* -786C>T (kiểu gen TT).

4. Xác định được mối liên hệ của các tổ hợp gen *SOD1*7958G>A và *SOD2* c.47T>C, SOD1 7958G>A và *CAT* -262C>T, *SOD2* c.47T>C và *CAT* -262C>T, và tổ hợp mang tất cả ba biến thể nói trên là yếu tố tăng nguy cơ vô sinh nam ở Việt Nam.

Kiến nghị

1. Cần tiếp tục triển khai những nghiên cứu trên quy mô mẫu lớn và bổ sung thêm thông tin về một số nhóm đa hình 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.

CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO, *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm – cervical mucus,* Cambridge University Press, 1999, 4th Edition.
2. N.V. Tiến, *Nghiên cứu ứng dụng một số kỹ thuật cao trong chẩn đoán và điều trị vô sinh ở Việt Nam,* Đề tài độc lập cấp nhà nước, 2011.
3. T.G. Cooper, E. Noonan, S. von Eckardstein, J. Auger, H.W.G. Baker, H.M. Behre, T.B. Haugen, T. Kruger, C. Wang, M.T. Mbizvo, and K.M. Vogelsong, *World Health Organization reference values for human semen characteristics*‡,* Human Reproduction Update, 2010, 16(3), 231-245.
4. WHO, *WHO manual for the standardilized investigation, diagnosis and management of the infertile male,* Cambridge University Press, 2000.
5. WHO, *Infertility: a tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility,* Geneva, WHO, Programme on Maternal anh Child Health and Family Planning, Division of Family Health, 1991.
6. N.K. Liêu, *Chẩn đoán và điều trị vô sinh,* Nhà xuất bản Y học, 2003.
7. P.V. Quyền, *Khám và làm bệnh án một cặp vợ chồng vô sinh,* Lớp Vô sinh và hỗ trợ sinh sản khóa 4, 2002, 20.
8. T.T.P. Mai, *Tình hình điều trị vô sinh bằng kĩ thuật cao,* Hội thảo "Tình hình điều trị vô sinh và thụ tinh trong ống nghiệm", Bộ Y tế và UNFPA, 2001.
9. T.T.T. Chiến, T.V. Hạnh, and P.G. Khánh, *Nghiên cứu một số vấn đề vô sinh nam giới và lựa chọn kỹ thuật lọc rửa, lưu trữ tinh trùng để điều trị vô sinh,* Đề tài cấp nhà nước, 2002.
10. N.V. Tiến, N.H. Toàn, and B.H. Anh, *Nghiên cứu thực trạng vô sinh ở Việt Nam theo các vùng sinh thái,* Bệnh viện Phụ sản Trung ương, Đại học Y Hà Nội, Hà Nội, 2009.
11. L.H. Anh and H.M. Tường, *Phân tích kết quả trên 4.060 tinh dịch đồ theo tiêu chuẩn WHO 2010 của các cặp vợ chồng khám hiếm muộn,* Hội nghị khoa học thường niên HOSREM lần VIII, 2012.
12. WHO, *Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility,* International Journal of Andrology, 1987.
13. C. Coutton, F. Abada, T. Karaouzene, D. Sanlaville, V. Satre, J. Lunardi, P.S. Jouk, C. Arnoult, N. Thierry-Mieg, and P.F. Ray, *Fine characterisation of a recombination hotspot at the DPY19L2 locus and resolution of the paradoxical excess of duplications over deletions in the general population,* PLoS Genet, 2013, 9(3), e1003363.
14. L. Ounis, A. Zoghmar, C. Coutton, L. Rouabah, M. Hachemi, D. Martinez, G. Martinez, I. Bellil, D. Khelifi, C. Arnoult, J. Faure, S. Benbouhedja, A. Rouabah, and P.F. Ray, *Mutations of the aurora kinase C gene causing macrozoospermia are the most frequent genetic cause of male infertility in Algerian men,* Asian J Androl, 2015, 17(1), 68-73.
15. M. Ben Khelifa, C. Coutton, M.G. Blum, F. Abada, R. Harbuz, R. Zouari, A. Guichet, P. May-Panloup, V. Mitchell, J. Rollet, C. Triki, G. Merdassi, F. Vialard, I. Koscinski, S. Viville, L. Keskes, J.P. Soulie, N. Rives, B. Dorphin, F. Lestrade, L. Hesters, C. Poirot, B. Benzacken, P.S. Jouk, V. Satre, S. Hennebicq, C. Arnoult,

J. Lunardi, and P.F. Ray, *Identification of a new recurrent aurora kinase C mutation in both European and African men with macrozoospermia,* Hum Reprod, 2012, 27(11), 3337-46.

16. B.A. Afzelius, *Genetical and ultrastructural aspects of the immotile-cilia syndrome,* Am J Hum Genet, 1981, 33(6), 852-64.
17. G.J. Vanaken, L. Bassinet, M. Boon, R. Mani, I. Honore, J.F. Papon, H. Cuppens, M. Jaspers, N. Lorent, A. Coste, E. Escudier, S. Amselem, B. Maitre, M. Legendre, and S. Christin-Maitre, *Infertility in an adult cohort with primary ciliary dyskinesia: phenotype-gene association,* Eur Respir J, 2017, 50(5).
18. G.H. Mao, Y.N. Wang, M. Xu, W.L. Wang, L. Tan, and S.B. Tao, *Polymorphisms in the MT-ATP6 and MT-CYB genes in in vitro fertilization failure,* Mitochondrial DNA, 2015, 26(1), 20-4.
19. I. Jedidi, M. Ouchari, and Q. Yin, *Autosomal single-gene disorders involved in human infertility,* Saudi J Biol Sci, 2018, 25(5), 881-887.
20. L. Kasak and M. Laan, *Monogenic causes of non-obstructive azoospermia: challenges, established knowledge, limitations and perspectives,* Hum Genet, 2021, 140(1), 135-154.
21. R.J. Auchus, *Steroid 17-hydroxylase and 17,20-lyase deficiencies, genetic and pharmacologic,* J Steroid Biochem Mol Biol, 2017, 165(Pt A), 71-78.
22. C.I. Goncalves, F. Fonseca, T. Borges, F. Cunha, and M.C. Lemos, *Expanding the genetic spectrum of ANOS1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism,* Hum Reprod, 2017, 32(3), 704-711.
23. A.N. Yatsenko, A.P. Georgiadis, A. Ropke, A.J. Berman, T. Jaffe, M. Olszewska, B. Westernstroer, J. Sanfilippo, M. Kurpisz, A. Rajkovic, S.A. Yatsenko, S. Kliesch, S. Schlatt, and F. Tuttelmann, *X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men,* N Engl J Med, 2015, 372(22), 2097-107.
24. M.C.C. Vargas, F.S. Moura, C.P. Elias, S.R. Carvalho, N. Rassi, I.S. Kunii, M.R. Dias-da-Silva, and F.A. Costa-Barbosa, *Spontaneous fertility and variable spectrum of reproductive phenotype in a family with adult-onset X-linked adrenal insufficiency harboring a novel DAX-1/NR0B1 mutation,* BMC Endocr Disord, 2020, 20(1), 21.
25. A. Ferlin, C. Vinanzi, A. Garolla, R. Selice, D. Zuccarello, C. Cazzadore, and C. Foresta, *Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations,* Clin Endocrinol (Oxf), 2006, 65(5), 606-10.
26. S.Y. Kim, B.Y. Lee, A.R. Oh, S.Y. Park, H.S. Lee, and J.T. Seo, *Clinical, Hormonal, and Genetic Evaluation of Idiopathic Nonobstructive Azoospermia and Klinefelter Syndrome Patients,* Cytogenet Genome Res, 2017, 153(4), 190-197.
27. E. Gumus, B. Kati, E.S. Pelit, E. Ordek, and H. Ciftci, *A different look at genetic factors in individuals with non-obstructive azoospermia or oligospermia in our research study: To whom, which threshold, when, in what way?,* Rev Int Androl, 2021, 19(1), 41-48.
28. S. Colaco and D. Modi, *Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility,* Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1), 14.
29. Z. Li, C.J. Haines, and Y. Han, *"Micro-deletions" of the human Y chromosome and their relationship with male infertility,* J Genet Genomics, 2008, 35(4), 193-9.

30. R.J. Aitken, *The Male Is Significantly Implicated as the Cause of Unexplained Infertility,* Semin Reprod Med, 2020, 38(1), 3-20.

31. Z. Gao, P. Moorjani, T.A. Sasani, B.S. Pedersen, A.R. Quinlan, L.B. Jorde, G. Amster, and M. Przeworski, *Overlooked roles of DNA damage and maternal age in generating human germline mutations,* Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(19), 9491-9500.

32. S. Poorang, S. Abdollahi, Z. Anvar, S.M.B. Tabei, B.N. Jahromi, N. Moein-Vaziri, B. Gharesi-Fard, M. Banaei, and S.A. Dastgheib, *The Impact of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Sperm Methylation and Variants on Semen Parameters and the Chance of Recurrent Pregnancy Loss in the Couple,* Clin Lab, 2018, 64(7), 1121-1128.

33. N. Ullah, A. Mansoor, S. Micheal, B. Mirza, R. Qamar, K. Mazhar, and S. Siddiqi, *MTHFR polymorphisms as risk for male infertility in Pakistan and its comparison with socioeconomic status in the world,* Per Med, 2019, 16(1), 35-49.

34. A. Botezatu, R. Socolov, D. Socolov, I.V. Iancu, and G. Anton, *Methylation pattern of methylene tetrahydrofolate reductase and small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N promoters in oligoasthenospermia: a case-control study,* Reprod Biomed Online, 2014, 28(2), 225-31.

35. M.Z. Karaca, E. Konac, B. Yurteri, G. Bozdag, E. Sogutdelen, and C.Y. Bilen, *Association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene promoter hypermethylation and the risk of idiopathic male infertility,* Andrologia, 2017, 49(7).

36. W. Wu, O. Shen, Y. Qin, X. Niu, C. Lu, Y. Xia, L. Song, S. Wang, and X. Wang, *Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR),* PLoS One, 2010, 5(11), e13884.

37. S. Gunes, A. Agarwal, R. Henkel, A.M. Mahmutoglu, R. Sharma, S.C. Esteves, A. Aljowair, D. Emirzeoglu, A. Alkhani, L. Pelegrini, A. Joumah, and E. Sabanegh, *Association between promoter methylation of MLH1 and MSH2 and reactive oxygen species in oligozoospermic men-A pilot study,* Andrologia, 2018, 50(3).

38. D. Montjean, C. Ravel, M. Benkhalifa, P. Cohen-Bacrie, I. Berthaut, A. Bashamboo, and K. McElreavey, *Methylation changes in mature sperm deoxyribonucleic acid from oligozoospermic men: assessment of genetic variants and assisted reproductive technology outcome,* Fertil Steril, 2013, 100(5), 1241-7.

39. J. Xu, A. Zhang, Z. Zhang, P. Wang, Y. Qian, L. He, H. Shi, Q. Xing, and J. Du, *DNA methylation levels of imprinted and nonimprinted genes DMRs associated with defective human spermatozoa,* Andrologia, 2016, 48(9), 939-947.

40. R. Klaver, F. Tuttelmann, A. Bleiziffer, T. Haaf, S. Kliesch, and J. Gromoll, *DNA methylation in spermatozoa as a prospective marker in andrology,* Andrology, 2013, 1(5), 731-40.

41. P.I. Marques, S. Fernandes, F. Carvalho, A. Barros, M. Sousa, and C.J. Marques, *DNA methylation imprinting errors in spermatogenic cells from maturation arrest azoospermic patients,* Andrology, 2017, 5(3), 451-459.

42. S.S. Hammoud, J. Purwar, C. Pflueger, B.R. Cairns, and D.T. Carrell, *Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility,* Fertil Steril, 2010, 94(5), 1728-33.

43. D. Santi, S. De Vincentis, E. Magnani, and G. Spaggiari, *Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study,* Andrology, 2017, 5(4), 695-703.

44. K. Khambata, S. Raut, S. Deshpande, S. Mohan, S. Sonawane, R. Gaonkar, Z. Ansari, M. Datar, V. Bansal, A. Patil, H. Warke, and N.H. Balasinor, *DNA methylation defects in spermatozoa of male partners from couples experiencing recurrent pregnancy loss,* Hum Reprod, 2021, 36(1), 48-60.

45. X.P. Li, C.L. Hao, Q. Wang, X.M. Yi, and Z.S. Jiang, *H19 gene methylation status is associated with male infertility,* Exp Ther Med, 2016, 12(1), 451-456.

46. H. Peng, P. Zhao, J. Liu, J. Zhang, J. Zhang, Y. Wang, L. Wu, M. Song, and W. Wang, *Novel Epigenomic Biomarkers of Male Infertility Identified by Methylation Patterns of CpG Sites Within Imprinting Control Regions of H19 and SNRPN Genes,* OMICS, 2018, 22(5), 354-364.

47. H. Dong, Y. Wang, Z. Zou, L. Chen, C. Shen, S. Xu, J. Zhang, F. Zhao, S. Ge, Q. Gao, H. Hu, M. Song, and W. Wang, *Abnormal Methylation of Imprinted Genes and Cigarette Smoking: Assessment of Their Association With the Risk of Male Infertility,* Reprod Sci, 2017, 24(1), 114-123.

48. Q. Tang, F. Pan, J. Yang, Z. Fu, Y. Lu, X. Wu, X. Han, M. Chen, C. Lu, Y. Xia, X. Wang, and W. Wu, *Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm: a case-control study,* Clin Epigenetics, 2018, 10(1), 134.

49. E. Carlsen, A. Giwercman, N. Keiding, and N.E. Skakkebaek, *Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years,* BMJ, 1992, 305(6854), 609-13.

50. C. Splingart, C. Frapsauce, S. Veau, C. Barthelemy, D. Royere, and F. Guerif, *Semen variation in a population of fertile donors: evaluation in a French centre over a 34-year period,* Int J Androl, 2012, 35(3), 467-74.

51. J.M. Campbell, M. Lane, J.A. Owens, and H.W. Bakos, *Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis,* Reprod Biomed Online, 2015, 31(5), 593-604.

52. J. Mir, D. Franken, S.W. Andrabi, M. Ashraf, and K. Rao, *Impact of weight loss on sperm DNA integrity in obese men,* Andrologia, 2018.

53. L.J. Challis, *Mechanisms for interaction between RF fields and biological tissue,* Bioelectromagnetics, 2005, Suppl 7, S98-S106.

54. J.A. Adams, T.S. Galloway, D. Mondal, S.C. Esteves, and F. Mathews, *Effect of mobile telephones on sperm quality: a systematic review and meta-analysis,* Environ Int, 2014, 70, 106-12.

55. K. Liu, Y. Li, G. Zhang, J. Liu, J. Cao, L. Ao, and S. Zhang, *Association between mobile phone use and semen quality: a systemic review and meta-analysis,* Andrology, 2014, 2(4), 491-501.

56. M. Practice Committee of the American Society for Reproductive, *Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion,* Fertil Steril, 2015, 103(3), e18-25.

57. R. Sharma, A. Harlev, A. Agarwal, and S.C. Esteves, *Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen,* Eur Urol, 2016, 70(4), 635-645.

58. R.M. Mostafa, Y.S. Nasrallah, M.M. Hassan, A.F. Farrag, A. Majzoub, and A. Agarwal, *The effect of cigarette smoking on human seminal parameters, sperm chromatin structure and condensation,* Andrologia, 2018, 50(3).

59. V. Shrivastava, H. Marmor, S. Chernyak, M. Goldstein, M. Feliciano, and M. Vigodner, *Cigarette smoke affects posttranslational modifications and inhibits capacitation-induced changes in human sperm proteins,* Reprod Toxicol, 2014, 43, 125-9.

60. R. Jones, T. Mann, and R. Sherins, *Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma,* Fertil Steril, 1979, 31(5), 531-7.

61. F.F. Pasqualotto, R.K. Sharma, D.R. Nelson, A.J. Thomas, and A. Agarwal, *Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation,* Fertil Steril, 2000, 73(3), 459-64.

62. J.F. Griveau, E. Dumont, P. Renard, J.P. Callegari, and D. Le Lannou, *Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa,* J Reprod Fertil, 1995, 103(1), 17-26.

63. R.J. Aitken and G.N. De Iuliis, *Origins and consequences of DNA damage in male germ cells,* Reprod Biomed Online, 2007, 14(6), 727-33.

64. M.C. Fernandez, A. Yu, A.R. Moawad, and C. O'Flaherty, *Peroxiredoxin 6 regulates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway to maintain human sperm viability,* Mol Hum Reprod, 2019, 25(12), 787-796.

65. A.C. Williams and W.C. Ford, *Functional significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm,* Biol Reprod, 2004, 71(4), 1309-16.

66. C. Jeulin, J.C. Soufir, P. Weber, D. Laval-Martin, and R. Calvayrac, *Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma,* Gamete Res, 1989, 24(2), 185-96.

67. R.J. Aitken and S.D. Roman, *Antioxidant systems and oxidative stress in the testes,* Oxid Med Cell Longev, 2008, 1(1), 15-24.

68. M. Koziorowska-Gilun, M. Koziorowski, L. Fraser, and J. Strzezek, *Antioxidant defence system of boar cauda epididymidal spermatozoa and reproductive tract fluids,* Reprod Domest Anim, 2011, 46(3), 527-33.

69. J.P. Rhemrev, F.W. van Overveld, G.R. Haenen, T. Teerlink, A. Bast, and J.P. Vermeiden, *Quantification of the nonenzymatic fast and slow TRAP in a postaddition assay in human seminal plasma and the antioxidant contributions of various seminal compounds,* J Androl, 2000, 21(6), 913-20.

70. S. Faulkner, G. Elia, M.P. Mullen, P. O'Boyle, M.J. Dunn, and D. Morris, *A comparison of the bovine uterine and plasma proteome using iTRAQ proteomics,* Proteomics, 2012, 12(12), 2014-23.

71. S. Benedetti, M.C. Tagliamonte, S. Catalani, M. Primiterra, F. Canestrari, S. De Stefani, S. Palini, and C. Bulletti, *Differences in blood and semen oxidative status*

in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality, Reprod Biomed Online, 2012, 25(3), 300-6.

72. S. Gupta, R. Finelli, A. Agarwal, and R. Henkel, *Total antioxidant capacity-Relevance, methods and clinical implications,* Andrologia, 2021, 53(2), e13624.
73. P. Gharagozloo, A. Gutierrez-Adan, A. Champroux, A. Noblanc, A. Kocer, A. Calle, S. Perez-Cerezales, E. Pericuesta, A. Polhemus, A. Moazamian, J.R. Drevet, and R.J. Aitken, *A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models,* Hum Reprod, 2016, 31(2), 252-62.
74. R.J. Aitken, J.R. Drevet, A. Moazamian, and P. Gharagozloo, *Male Infertility and Oxidative Stress: A Focus on the Underlying Mechanisms,* Antioxidants (Basel), 2022, 11(2).
75. N. Sukcharoen, J. Keith, D.S. Irvine, and R.J. Aitken, *Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination,* Fertil Steril, 1995, 63(6), 1293-300.
76. A.J. Koppers, G.N. De Iuliis, J.M. Finnie, E.A. McLaughlin, and R.J. Aitken, *Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa,* J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(8), 3199-207.
77. R.J. Aitken, Z. Gibb, L.A. Mitchell, S.R. Lambourne, H.S. Connaughton, and G.N. De Iuliis, *Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols,* Biol Reprod, 2012, 87(5), 110.
78. A. Vatannejad, H. Tavilani, M.R. Sadeghi, M. Karimi, N. Lakpour, S. Amanpour, M. Shabani Nashtaei, and M. Doosti, *Evaluation of the NOX5 protein expression and oxidative stress in sperm from asthenozoospermic men compared to normozoospermic men,* J Endocrinol Invest, 2019, 42(10), 1181-1189.
79. H. Ghanbari, S. Keshtgar, H.R. Zare, and B. Gharesi-Fard, *Inhibition of CatSper and Hv1 Channels and NOX5 Enzyme Affect Progesterone-Induced Increase of Intracellular Calcium Concentration and ROS Generation in Human Sperm,* Iran J Med Sci, 2019, 44(2), 127-134.
80. H.W. Ecroyd, R.C. Jones, and R.J. Aitken, *Endogenous redox activity in mouse spermatozoa and its role in regulating the tyrosine phosphorylation events associated with sperm capacitation,* Biol Reprod, 2003, 69(1), 347-54.
81. R.J. Aitken and M.A. Baker, *The Role of Genetics and Oxidative Stress in the Etiology of Male Infertility-A Unifying Hypothesis?,* Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11, 581838.
82. T.W. Kensler, N. Wakabayashi, and S. Biswal, *Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway,* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007, 47, 89-116.
83. B.N. Nakamura, G. Lawson, J.Y. Chan, J. Banuelos, M.M. Cortes, Y.D. Hoang, L. Ortiz, B.A. Rau, and U. Luderer, *Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner,* Free Radic Biol Med, 2010, 49(9), 1368-79.

84. B. Yu, J. Chen, D. Liu, H. Zhou, W. Xiao, X. Xia, and Z. Huang, *Cigarette smoking is associated with human semen quality in synergy with functional NRF2 polymorphisms,* Biol Reprod, 2013, 89(1), 5.

85. R. Peeker, L. Abramsson, and S.L. Marklund, *Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa,* Mol Hum Reprod, 1997, 3(12), 1061-6.

86. A. Revelli, G. Soldati, C. Costamagna, O. Pellerey, E. Aldieri, M. Massobrio, A. Bosia, and D. Ghigo, *Follicular fluid proteins stimulate nitric oxide (NO) synthesis in human sperm: a possible role for NO in acrosomal reaction,* J Cell Physiol, 1999, 178(1), 85-92.

87. A. Oakley, *Glutathione transferases: a structural perspective,* Drug Metab Rev, 2011, 43(2), 138-51.

88. B. Ozkosem, S.I. Feinstein, A.B. Fisher, and C. O'Flaherty, *Advancing age increases sperm chromatin damage and impairs fertility in peroxiredoxin 6 null mice,* Redox Biol, 2015, 5, 15-23.

89. Y. Iuchi, F. Okada, S. Tsunoda, N. Kibe, N. Shirasawa, M. Ikawa, M. Okabe, Y. Ikeda, and J. Fujii, *Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress,* Biochem J, 2009, 419(1), 149-58.

90. J.R. Drevet, *The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story,* Mol Cell Endocrinol, 2006, 250(1-2), 70-9.

91. T.B. Smith, M.A. Baker, H.S. Connaughton, U. Habenicht, and R.J. Aitken, *Functional deletion of Txndc2 and Txndc3 increases the susceptibility of spermatozoa to age-related oxidative stress,* Free Radic Biol Med, 2013, 65, 872-881.

92. G.R. Drummond, H. Cai, M.E. Davis, S. Ramasamy, and D.G. Harrison, *Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide,* Circ Res, 2000, 86(3), 347-54.

93. D.J. Stuehr, *Mammalian nitric oxide synthases,* Biochim Biophys Acta, 1999, 1411(2-3), 217-30.

94. J.D. Hayes, J.U. Flanagan, and I.R. Jowsey, *Glutathione transferases,* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005, 45, 51-88.

95. E.S. Arner and A. Holmgren, *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase,* Eur J Biochem, 2000, 267(20), 6102-9.

96. E. Chabory, C. Damon, A. Lenoir, G. Kauselmann, H. Kern, B. Zevnik, C. Garrel, F. Saez, R. Cadet, J. Henry-Berger, M. Schoor, U. Gottwald, U. Habenicht, J.R. Drevet, and P. Vernet, *Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice,* J Clin Invest, 2009, 119(7), 2074-85.

97. W. Gu and N.B. Hecht, *Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse,* J Androl, 1996, 17(3), 256-62.

98. N. Rubio-Riquelme, N. Huerta-Retamal, M.J. Gomez-Torres, and R.M. Martinez-Espinosa, *Catalase as a Molecular Target for Male Infertility Diagnosis and Monitoring: An Overview,* Antioxidants (Basel), 2020, 9(1).

99. B. Yu, H. Lin, L. Yang, K. Chen, H. Luo, J. Liu, X. Gao, X. Xia, and Z. Huang, *Genetic variation in the Nrf2 promoter associates with defective spermatogenesis in humans,* J Mol Med (Berl), 2012, 90(11), 1333-42.

100. K. Chen, Z. Mai, Y. Zhou, X. Gao, and B. Yu, *Low NRF2 mRNA expression in spermatozoa from men with low sperm motility,* Tohoku J Exp Med, 2012, 228(3), 259-66.

101. C.N. An, H. Jiang, Q. Wang, R.P. Yuan, J.M. Liu, W.L. Shi, Z.Y. Zhang, and X.P. Pu, *Down-regulation of DJ-1 protein in the ejaculated spermatozoa from Chinese asthenozoospermia patients,* Fertil Steril, 2011, 96(1), 19-23 e2.

102. G. Tirumala Vani, N. Mukesh, B. Siva Prasad, P. Rama Devi, M. Hema Prasad, P. Usha Rani, and P. Pardhanandana Reddy, *Role of glutathione S-transferase Mu-1 (GSTM1) polymorphism in oligospermic infertile males,* Andrologia, 2010, 42(4), 213-7.

103. S.S. Chen, L.S. Chang, H.W. Chen, and Y.H. Wei, *Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele,* Hum Reprod, 2002, 17(3), 718-25.

104. B. Aydemir, I. Onaran, A.R. Kiziler, B. Alici, and M.C. Akyolcu, *Increased oxidative damage of sperm and seminal plasma in men with idiopathic infertility is higher in patients with glutathione S-transferase Mu-1 null genotype,* Asian J Androl, 2007, 9(1), 108-15.

105. K. Tang, W. Xue, Y. Xing, S. Xu, Q. Wu, R. Liu, X. Wang, and J. Xing, *Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1, T1, and P1, and the assessment of oxidative damage in infertile men with varicoceles from northwestern China,* J Androl, 2012, 33(2), 257-63.

106. X.B. Xu, S.R. Liu, H.Q. Ying, and Z.C. A, *Null genotype of GSTM1 and GSTT1 may contribute to susceptibility to male infertility with impaired spermatogenesis in Chinese population,* Biomarkers, 2013, 18(2), 151-4.

107. J.I. Ruiz-Sanz, I. Aurrekoetxea, R. Matorras, and M.B. Ruiz-Larrea, *Ala16Val SOD2 polymorphism is associated with higher pregnancy rates in in vitro fertilization cycles,* Fertil Steril, 2011, 95(5), 1601-5.

108. C. Faure, P. Leveille, C. Dupont, C. Julia, P. Chavatte-Palmer, G. Alifert, A. Sutton, and R. Levy, *Are superoxide dismutase 2 and nitric oxide synthase polymorphisms associated with idiopathic infertility?,* Antioxid Redox Signal, 2014, 21(4), 565-9.

109. G. Ji, A. Gu, Y. Wang, C. Huang, F. Hu, Y. Zhou, L. Song, and X. Wang, *Genetic variants in antioxidant genes are associated with sperm DNA damage and risk of male infertility in a Chinese population,* Free Radic Biol Med, 2012, 52(4), 775-80.

110. W.W. Jow, P.N. Schlegel, Z. Cichon, D. Phillips, M. Goldstein, and C.W. Bardin, *Identification and localization of copper-zinc superoxide dismutase gene expression in rat testicular development,* J Androl, 1993, 14(6), 439-47.

111. I. Reveillaud, J. Phillips, B. Duyf, A. Hilliker, A. Kongpachith, and J.E. Fleming, *Phenotypic rescue by a bovine transgene in a Cu/Zn superoxide dismutase-null mutant of Drosophila melanogaster,* Mol Cell Biol, 1994, 14(2), 1302-7.

112. T. Ishii, S. Matsuki, Y. Iuchi, F. Okada, S. Toyosaki, Y. Tomita, Y. Ikeda, and J. Fujii, *Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress,* Free Radic Res, 2005, 39(7), 697-705.

113. T. Mostafa, L.A. Rashed, N. Nabil, H. Fouad, D. Sabry, and D.M. El-Saied, *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism relationship with semen*

parameters and oxidative stress in infertile oligoasthenoteratozoospermic men, Urology, 2015, 85(5), 1058-1061.

114. E. Buldreghini, R.Z. Mahfouz, A. Vignini, L. Mazzanti, G. Ricciardo-Lamonica, A. Lenzi, A. Agarwal, and G. Balercia, *Single nucleotide polymorphism (SNP) of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene (Glu298Asp variant) in infertile men with asthenozoospermia,* J Androl, 2010, 31(5), 482-8.

115. S. Sabouhi, Z. Salehi, M.H. Bahadori, and M. Mahdavi, *Human catalase gene polymorphism (CAT C-262T) and risk of male infertility,* Andrologia, 2015, 47(1), 97-101.

116. E. Kawakami, A. Takemura, M. Sakuma, M. Takano, T. Hirano, T. Hori, and T. Tsutsui, *Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles,* J Vet Med Sci, 2007, 69(2), 133-6.

117. O.H. Roshdy, T.M. Hussein, N.H. Zakaria, and A.A. Sabry, *Glutathione S-transferase Mu-1 gene polymorphism in Egyptian patients with idiopathic male infertility,* Andrologia, 2015, 47(5), 587-93.

118. A.C. Finotti, E.S.R.C. Costa, B.M. Bordin, C.T. Silva, and K.K. Moura, *Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphism in men with idiopathic infertility,* Genet Mol Res, 2009, 8(3), 1093-1098.

119. D.M. Hering, M. Lecewicz, W. Kordan, A. Majewska, and S. Kaminski, *Missense mutation in glutathione-S-transferase M1 gene is associated with sperm motility and ATP content in frozen-thawed semen of Holstein-Friesian bulls,* Anim Reprod Sci, 2015, 159, 94-7.

120. M.R. Safarinejad, N. Shafiei, and S. Safarinejad, *The association of glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with idiopathic male infertility,* J Hum Genet, 2010, 55(9), 565-70.

121. L. Yan, J. Liu, S. Wu, S. Zhang, G. Ji, and A. Gu, *Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism,* J Assist Reprod Genet, 2014, 31(5), 549-54.

122. M.R. Safarinejad, N. Shafiei, and S. Safarinejad, *The role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) T-786C, G894T, and 4a/b gene polymorphisms in the risk of idiopathic male infertility,* Mol Reprod Dev, 2010, 77(8), 720-7.

123. M. Schneider, H. Forster, A. Boersma, A. Seiler, H. Wehnes, F. Sinowatz, C. Neumuller, M.J. Deutsch, A. Walch, M. Hrabe de Angelis, W. Wurst, F. Ursini, A. Roveri, M. Maleszewski, M. Maiorino, and M. Conrad, *Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility,* FASEB J, 2009, 23(9), 3233-42.

124. C. Krausz and A. Riera-Escamilla, *Genetics of male infertility,* Nat Rev Urol, 2018, 15(6), 369-384.

125. E. Vorona, M. Zitzmann, J. Gromoll, A.N. Schuring, and E. Nieschlag, *Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46,XX male syndrome, compared with 47,XXY Klinefelter patients,* J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(9), 3458-65.

126. C. Ravel, I. Berthaut, J.L. Bresson, J.P. Siffroi, and C. Genetics Commission of the French Federation of, *Prevalence of chromosomal abnormalities in phenotypically normal and fertile adult males: large-scale survey of over 10,000 sperm donor karyotypes,* Hum Reprod, 2006, 21(6), 1484-9.

127. H. Skaletsky, T. Kuroda-Kawaguchi, P.J. Minx, H.S. Cordum, L. Hillier, L.G. Brown, S. Repping, T. Pyntikova, J. Ali, T. Bieri, A. Chinwalla, A. Delehaunty, K. Delehaunty, H. Du, G. Fewell, L. Fulton, R. Fulton, T. Graves, S.F. Hou, P. Latrielle, S. Leonard, E. Mardis, R. Maupin, J. McPherson, T. Miner, W. Nash, C. Nguyen, P. Ozersky, K. Pepin, S. Rock, T. Rohlfing, K. Scott, B. Schultz, C. Strong, A. Tin-Wollam, S.P. Yang, R.H. Waterston, R.K. Wilson, S. Rozen, and D.C. Page, *The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes,* Nature, 2003, 423(6942), 825-37.

128. C. Krausz, L. Hoefsloot, M. Simoni, F. Tuttelmann, A. European Academy of, and N. European Molecular Genetics Quality, *EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013,* Andrology, 2014, 2(1), 5-19.

129. K.L. O'Flynn O'Brien, A.C. Varghese, and A. Agarwal, *The genetic causes of male factor infertility: a review,* Fertil Steril, 2010, 93(1), 1-12.

130. P.R. Sosnay, K.R. Siklosi, F. Van Goor, K. Kaniecki, H. Yu, N. Sharma, A.S. Ramalho, M.D. Amaral, R. Dorfman, J. Zielenski, D.L. Masica, R. Karchin, L. Millen, P.J. Thomas, G.P. Patrinos, M. Corey, M.H. Lewis, J.M. Rommens, C. Castellani, C.M. Penland, and G.R. Cutting, *Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene,* Nat Genet, 2013, 45(10), 1160-7.

131. E. Dequeker, M. Stuhrmann, M.A. Morris, T. Casals, C. Castellani, M. Claustres, H. Cuppens, M. des Georges, C. Ferec, M. Macek, P.F. Pignatti, H. Scheffer, M. Schwartz, M. Witt, M. Schwarz, and E. Girodon, *Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations,* Eur J Hum Genet, 2009, 17(1), 51-65.

132. D.R. Adams and C.M. Eng, *Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders,* N Engl J Med, 2018, 379(14), 1353-1362.

133. K.I. Aston, C. Krausz, I. Laface, E. Ruiz-Castane, and D.T. Carrell, *Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent,* Hum Reprod, 2010, 25(6), 1383-97.

134. G. Kosova, N.M. Scott, C. Niederberger, G.S. Prins, and C. Ober, *Genome-wide association study identifies candidate genes for male fertility traits in humans,* Am J Hum Genet, 2012, 90(6), 950-61.

135. Z. Hu, Y. Xia, X. Guo, J. Dai, H. Li, H. Hu, Y. Jiang, F. Lu, Y. Wu, X. Yang, H. Li, B. Yao, C. Lu, C. Xiong, Z. Li, Y. Gui, J. Liu, Z. Zhou, H. Shen, X. Wang, and J. Sha, *A genome-wide association study in Chinese men identifies three risk loci for non-obstructive azoospermia,* Nat Genet, 2011, 44(2), 183-6.

136. Z. Hu, Z. Li, J. Yu, C. Tong, Y. Lin, X. Guo, F. Lu, J. Dong, Y. Xia, Y. Wen, H. Wu, H. Li, Y. Zhu, P. Ping, X. Chen, J. Dai, Y. Jiang, S. Pan, P. Xu, K. Luo, Q. Du, B. Yao, M. Liang, Y. Gui, N. Weng, H. Lu, Z. Wang, F. Zhang, X. Zhu, X. Yang, Z. Zhang, H. Zhao, C. Xiong, H. Ma, G. Jin, F. Chen, J. Xu, X. Wang, Z. Zhou, Z.J. Chen, J. Liu, H. Shen, and J. Sha, *Association analysis identifies new risk loci for non-obstructive azoospermia in Chinese men,* Nat Commun, 2014, 5, 3857.

137. B. Ni, Y. Lin, L. Sun, M. Zhu, Z. Li, H. Wang, J. Yu, X. Guo, X. Zuo, J. Dong, Y. Xia, Y. Wen, H. Wu, H. Li, Y. Zhu, P. Ping, X. Chen, J. Dai, Y. Jiang, P. Xu, Q.

Du, B. Yao, N. Weng, H. Lu, Z. Wang, X. Zhu, X. Yang, C. Xiong, H. Ma, G. Jin, J. Xu, X. Wang, Z. Zhou, J. Liu, X. Zhang, D.F. Conrad, Z. Hu, and J. Sha, *Low-frequency germline variants across 6p22.2-6p21.33 are associated with non-obstructive azoospermia in Han Chinese men,* Hum Mol Genet, 2015, 24(19), 5628-36.

138. F. Tuttelmann, M. Simoni, S. Kliesch, S. Ledig, B. Dworniczak, P. Wieacker, and A. Ropke, *Copy number variants in patients with severe oligozoospermia and Sertoli-cell-only syndrome,* PLoS One, 2011, 6(4), e19426.

139. C. Krausz, C. Giachini, D. Lo Giacco, F. Daguin, C. Chianese, E. Ars, E. Ruiz-Castane, G. Forti, and E. Rossi, *High resolution X chromosome-specific array-CGH detects new CNVs in infertile males,* PLoS One, 2012, 7(10), e44887.

140. K. Stouffs, D. Vandermaelen, A. Massart, B. Menten, S. Vergult, H. Tournaye, and W. Lissens, *Array comparative genomic hybridization in male infertility,* Hum Reprod, 2012, 27(3), 921-9.

141. A.M. Lopes, K.I. Aston, E. Thompson, F. Carvalho, J. Goncalves, N. Huang, R. Matthiesen, M.J. Noordam, I. Quintela, A. Ramu, C. Seabra, A.B. Wilfert, J. Dai, J.M. Downie, S. Fernandes, X. Guo, J. Sha, A. Amorim, A. Barros, A. Carracedo, Z. Hu, M.E. Hurles, S. Moskovtsev, C. Ober, D.A. Paduch, J.D. Schiffman, P.N. Schlegel, M. Sousa, D.T. Carrell, and D.F. Conrad, *Human spermatogenic failure purges deleterious mutation load from the autosomes and both sex chromosomes, including the gene DMRT1,* PLoS Genet, 2013, 9(3), e1003349.

142. F. Yang, S. Silber, N.A. Leu, R.D. Oates, J.D. Marszalek, H. Skaletsky, L.G. Brown, S. Rozen, D.C. Page, and P.J. Wang, *TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse,* EMBO Mol Med, 2015, 7(9), 1198-210.

143. S.D. Quaynor, M.E. Bosley, C.G. Duckworth, K.R. Porter, S.H. Kim, H.G. Kim, L.P. Chorich, M.E. Sullivan, J.H. Choi, R.S. Cameron, and L.C. Layman, *Targeted next generation sequencing approach identifies eighteen new candidate genes in normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome,* Mol Cell Endocrinol, 2016, 437, 86-96.

144. Y. Sha, X. Yang, L. Mei, Z. Ji, X. Wang, L. Ding, P. Li, and S. Yang, *DNAH1 gene mutations and their potential association with dysplasia of the sperm fibrous sheath and infertility in the Han Chinese population,* Fertil Steril, 2017, 107(6), 1312-1318 e2.

145. O. Patat, A. Pagin, A. Siegfried, V. Mitchell, N. Chassaing, S. Faguer, L. Monteil, V. Gaston, L. Bujan, M. Courtade-Saidi, F. Marcelli, G. Lalau, J.M. Rigot, R. Mieusset, and E. Bieth, *Truncating Mutations in the Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2 Gene ADGRG2 Cause an X-Linked Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens,* Am J Hum Genet, 2016, 99(2), 437-42.

146. R. Ramasamy, M.E. Bakircioglu, C. Cengiz, E. Karaca, J. Scovell, S.N. Jhangiani, Z.C. Akdemir, M. Bainbridge, Y. Yu, C. Huff, R.A. Gibbs, J.R. Lupski, and D.J. Lamb, *Whole-exome sequencing identifies novel homozygous mutation in NPAS2 in family with nonobstructive azoospermia,* Fertil Steril, 2015, 104(2), 286-91.

147. O. Okutman, J. Muller, V. Skory, J.M. Garnier, A. Gaucherot, Y. Baert, V. Lamour, M. Serdarogullari, M. Gultomruk, A. Ropke, S. Kliesch, V. Herbepin, I. Aknin, M. Benkhalifa, M. Teletin, E. Bakircioglu, E. Goossens, N. Charlet-Berguerand, M. Bahceci, F. Tuttelmann, and S. Viville, *A no-stop mutation in*

MAGEB4 is a possible cause of rare X-linked azoospermia and oligozoospermia in a consanguineous Turkish family, J Assist Reprod Genet, 2017, 34(5), 683-694.

148. Lương Thị Lan Anh and H.T. Lan, *Ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR phát hiện mất đoạn AZF ở bệnh nhân vô sinh nam không có tinh trùng,* Tạp chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam, 2018, 6(12), 8-12.
149. Dương Thị Nhàn and N.P. Hùng, *Mối liên hệ giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và các chỉ số tinh dịch đồ ở nam giới vô sinh,* Tạp chí Khoa học & Công nghệ ĐHTN, 2020, 225(8), 105-111.
150. Nguyễn Hoài Bắc and T.V. Kiên, *Nghiên cứu đặc điểm nồng độ kẽm và fructose trong tinh dịch của những bệnh nhân vô sinh nam không có tinh trùng,* Tạp chí Y học Việt Nam 2022, 1.
151. N.G. Bình, *Nghiên cứu nồng độ kẽm huyết thanh ở các bệnh nhân vô sinh nam,* Tạp chí Y dược học lâm sàng, 2014, 9(1), 101-104.
152. Tran Huu Dinh, Dinh Thanh Thao, Luong Thi Lan Anh, Nong Van Hai, and N.T. Duong, *Association of FSIP2 rs4666689 and PON2 rs7493 with male infertility in Vietnamese population,* Academia Journal of Biology, 2021, 43(3), 77-85.
153. Nguyen Thuy Duong, La Duc Duy, and N.V. Hai, *Khảo sát mối liên quan của đa hình DNAH1 rs12163565 với bệnh vô sinh nam ở người Việt Nam,* Tạp chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam, 2022, 64(6), 19-23.
154. Vu Thi Huyen, Nguyen Thi Trang, and T.D. Phan, *Mối liên quan giữa các đột biến gen NAT2 và GSTP1 với vô sinh nam nguyên phát và stress oxy hoá,* Tạp chí Y học Việt Nam, 2018, 463(1), 70-73.
155. S.E. Aydos, M. Taspinar, A. Sunguroglu, and K. Aydos, *Association of CYP1A1 and glutathione S-transferase polymorphisms with male factor infertility,* Fertil Steril, 2009, 92(2), 541-7.
156. A. Agarwal, M. Rana, E. Qiu, H. AlBunni, A.D. Bui, and R. Henkel, *Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility,* Andrologia, 2018, 50(11), e13126.
157. G. Cito, M. Becatti, A. Natali, R. Fucci, R. Picone, A. Cocci, P. Falcone, L. Criscuoli, A. Mannucci, F.R. Argento, F. Bertocci, S. Serni, M. Carini, C. Fiorillo, and M.E. Coccia, *Redox status assessment in infertile patients with non-obstructive azoospermia undergoing testicular sperm extraction: A prospective study,* Andrology, 2020, 8(2), 364-371.
158. H. Luo, Y.J. Fang, X. Zhang, X.L. Feng, N.Q. Zhang, A. Abulimiti, C.Y. Huang, and C.X. Zhang, *Association between Dietary Zinc and Selenium Intake, Oxidative Stress-Related Gene Polymorphism, and Colorectal Cancer Risk in Chinese Population - A Case-Control Study,* Nutr Cancer, 2021, 73(9), 1621-1630.
159. P. Xu, Y. Zhu, X. Liang, C. Gong, Y. Xu, C. Huang, X.L. Liu, and J.C. Zhou, *Genetic polymorphisms of superoxide dismutase 1 are associated with the serum lipid profiles of Han Chinese adults in a sexually dimorphic manner,* PLoS One, 2020, 15(6), e0234716.
160. R. Kitoh, S.Y. Nishio, K. Ogawa, M. Okamoto, K. Kitamura, K. Gyo, H. Sato, T. Nakashima, S. Fukuda, K. Fukushima, A. Hara, T. Yamasoba, and S. Usami, *SOD1 gene polymorphisms in sudden sensorineural hearing loss,* Acta Otolaryngol, 2016, 136(5), 465-9.

161. K. Spisak, A. Klimkowicz-Mrowiec, J. Pera, T. Dziedzic, G. Aleksandra, and A. Slowik, *rs2070424 of the SOD1 gene is associated with risk of Alzheimer's disease,* Neurol Neurochir Pol, 2014, 48(5), 342-5.

162. S. Tsunoda, N. Kawano, K. Miyado, N. Kimura, and J. Fujii, *Impaired fertilizing ability of superoxide dismutase 1-deficient mouse sperm during in vitro fertilization,* Biol Reprod, 2012, 87(5), 121.

163. T. Homma, Y. Takeda, S. Sakahara, N. Ishii, S. Kobayashi, H. Abe, H. Asao, and J. Fujii, *Heterozygous SOD1 deficiency in mice with an NZW background causes male infertility and an aberrant immune phenotype,* Free Radic Res, 2019, 53(11-12), 1060-1072.

164. R. Stadhouders, A. van den Heuvel, P. Kolovos, R. Jorna, K. Leslie, F. Grosveld, and E. Soler, *Transcription regulation by distal enhancers: who's in the loop?,* Transcription, 2012, 3(4), 181-6.

165. F.J. de Oliveira Paludo, M.A. de Bittencourt Pasquali, A.R. de Vargas, I.B. de Oliveira, L.V.B. Goncalves, D.P. Gelain, and J.C.F. Moreira, *Influences of the polymorphisms of the Sod2 gene (rs4880) on the motility and vigor of X- and Y-bearing sperm at different pH values,* Biomed Pharmacother, 2021, 142, 111993.

166. A.V. Komina, K.A. Korostileva, S.N. Gyrylova, R.N. Belonogov, and T.G. Ruksha, *Interaction between single nucleotide polymorphism in catalase gene and catalase activity under the conditions of oxidative stress,* Physiol Res, 2012, 61(6), 655-8.

167. N.E.H. Bousnane, S. May, M. Yahia, and A.A. Abu Alhaija, *Association of CAT-262C/T with the concentration of catalase in seminal plasma and the risk for male infertility in Algeria,* Syst Biol Reprod Med, 2017, 63(5), 303-310.

168. A. Garcia Rodriguez, M. de la Casa, S. Johnston, J. Gosalvez, and R. Roy, *Association of polymorphisms in genes coding for antioxidant enzymes and human male infertility,* Ann Hum Genet, 2019, 83(1), 63-72.

169. L. Forsberg, L. Lyrenas, U. de Faire, and R. Morgenstern, *A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels,* Free Radic Biol Med, 2001, 30(5), 500-5.

170. B. Macanovic, M. Vucetic, A. Jankovic, A. Stancic, B. Buzadzic, E. Garalejic, A. Korac, B. Korac, and V. Otasevic, *Correlation between sperm parameters and protein expression of antioxidative defense enzymes in seminal plasma: a pilot study,* Dis Markers, 2015, 2015, 436236.

171. H.Q. Ying, X.Y. Pu, S.R. Liu, and Z.C. A, *Genetic variants of eNOS gene may modify the susceptibility to idiopathic male infertility,* Biomarkers, 2013, 18(5), 412-7.

172. F.S. Mousavi-Nasab and A.H. Colagar, *Investigation of the association of endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-T786C gene polymorphism with the risk of male infertility in an Iranian population,* Environ Sci Pollut Res Int, 2020, 27(18), 22434-22440.

173. A. Zini, J. Abitbol, S.K. Girardi, D. Schulsinger, M. Goldstein, and P.N. Schlegel, *Germ cell apoptosis and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression following ischemia-reperfusion injury to testis,* Arch Androl, 1998, 41(1), 57-65.

174. M. Rosselli, R.K. Dubey, B. Imthurn, E. Macas, and P.J. Keller, *Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity,* Hum Reprod, 1995, 10(7), 1786-90.

175. S. Carreau and G.D. Isabelle, *Transcripts of aromatase and estrogen receptors and significance of other RNAs in human spermatozoa,* Arch Androl, 2007, 53(5), 249-55.

176. P. Song, S. Zou, T. Chen, J. Chen, Y. Wang, J. Yang, Z. Song, H. Jiang, H. Shi, Y. Huang, Z. Li, Y. Shi, and H. Hu, *Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) T-786C, 4a4b, and G894T polymorphisms and male infertility: study for idiopathic asthenozoospermia and meta-analysis,* Biol Reprod, 2015, 92(2), 38.

177. C. Wright, S. Milne, and H. Leeson, *Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility,* Reprod Biomed Online, 2014, 28(6), 684-703.

178. L.H. Zhang, Y. Qiu, K.H. Wang, Q. Wang, G. Tao, and L.G. Wang, *Measurement of sperm DNA fragmentation using bright-field microscopy: comparison between sperm chromatin dispersion test and terminal uridine nick-end labeling assay,* Fertil Steril, 2010, 94(3), 1027-32.

179. K. Oleszczuk, L. Augustinsson, N. Bayat, A. Giwercman, and M. Bungum, *Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples,* Andrology, 2013, 1(3), 357-60.

180. H.M. Omran, M. Bakhiet, and M.G. Dashti, *DNA integrity is a critical molecular indicator for the assessment of male infertility,* Mol Med Rep, 2013, 7(5), 1631-5.

181. Y. Yin, P. Zhu, T. Luo, and X. Xia, *Association of single-nucleotide polymorphisms in antioxidant genes and their gene-gene interactions with risk of male infertility in a Chinese population,* Biomed Rep, 2020, 13(1), 49-54.

182. W. Hu, M. Chen, W. Wu, J. Lu, D. Zhao, F. Pan, C. Lu, Y. Xia, L. Hu, D. Chen, J. Sha, and X. Wang, *Gene-gene and gene-environment interactions on risk of male infertility: Focus on the metabolites,* Environ Int, 2016, 91, 188-95.

183. R.M. Smits, R. Mackenzie-Proctor, A. Yazdani, M.T. Stankiewicz, V. Jordan, and M.G. Showell, *Antioxidants for male subfertility,* Cochrane Database Syst Rev, 2019, 3(3), CD007411.

184. C. De Geyter, C. Wyns, C. Calhaz-Jorge, J. de Mouzon, A.P. Ferraretti, M. Kupka, A. Nyboe Andersen, K.G. Nygren, and V. Goossens, *20 years of the European IVF-monitoring Consortium registry: what have we learned? A comparison with registries from two other regions,* Hum Reprod, 2020, 35(12), 2832-2849.

185. G.M. Chambers, S. Dyer, F. Zegers-Hochschild, J. de Mouzon, O. Ishihara, M. Banker, R. Mansour, M.S. Kupka, and G.D. Adamson, *International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology, 2014dagger,* Hum Reprod, 2021, 36(11), 2921-2934.

186. Q. Chen, J.Y. Zhao, X. Xue, and G.X. Zhu, *The association between sperm DNA fragmentation and reproductive outcomes following intrauterine insemination, a meta analysis,* Reprod Toxicol, 2019, 86, 50-55.

187. C. Deng, T. Li, Y. Xie, Y. Guo, Q.Y. Yang, X. Liang, C.H. Deng, and G.H. Liu, *Sperm DNA fragmentation index influences assisted reproductive technology*

outcome: A systematic review and meta-analysis combined with a retrospective cohort study, Andrologia, 2019, 51(6), e13263.

188. J. Zhao, Q. Zhang, Y. Wang, and Y. Li, *Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis,* Fertil Steril, 2014, 102(4), 998-1005 e8.

189. A. Zini, *Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic?,* Syst Biol Reprod Med, 2011, 57(1-2), 78-85.

190. L. Robinson, I.D. Gallos, S.J. Conner, M. Rajkhowa, D. Miller, S. Lewis, J. Kirkman-Brown, and A. Coomarasamy, *The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis,* Hum Reprod, 2012, 27(10), 2908-17.

191. A.Z. Steiner, K.R. Hansen, K.T. Barnhart, M.I. Cedars, R.S. Legro, M.P. Diamond, S.A. Krawetz, R. Usadi, V.L. Baker, R.M. Coward, H. Huang, R. Wild, P. Masson, J.F. Smith, N. Santoro, E. Eisenberg, H. Zhang, and N. Reproductive Medicine, *The effect of antioxidants on male factor infertility: the Males, Antioxidants, and Infertility (MOXI) randomized clinical trial,* Fertil Steril, 2020, 113(3), 552-560 e3.

192. K. Tremellen, G. Miari, D. Froiland, and J. Thompson, *A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI treatment,* Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2007, 47(3), 216-21.

193. E. Geva, B. Bartoov, N. Zabludovsky, J.B. Lessing, L. Lerner-Geva, and A. Amit, *The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program,* Fertil Steril, 1996, 66(3), 430-4.

194. E. Greco, S. Romano, M. Iacobelli, S. Ferrero, E. Baroni, M.G. Minasi, F. Ubaldi, L. Rienzi, and J. Tesarik, *ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment,* Hum Reprod, 2005, 20(9), 2590-4.

195. D. Gavriliouk and R.J. Aitken, *Damage to Sperm DNA Mediated by Reactive Oxygen Species: Its Impact on Human Reproduction and the Health Trajectory of Offspring,* Adv Exp Med Biol, 2015, 868, 23-47.

196. B. Ebrahimi and S. Keshtgar, *The Effects of EGTA on the Quality of Fresh and Cryopreserved-Thawed Human Spermatozoa,* Iran J Med Sci, 2020, 45(3), 188-198.

197. J. Li, I. Barranco, A. Tvarijonaviciute, M.F. Molina, E.A. Martinez, H. Rodriguez-Martinez, I. Parrilla, and J. Roca, *Seminal plasma antioxidants are directly involved in boar sperm cryotolerance,* Theriogenology, 2018, 107, 27-35.

198. F. Amidi, A. Pazhohan, M. Shabani Nashtaei, M. Khodarahmian, and S. Nekoonam, *The role of antioxidants in sperm freezing: a review,* Cell Tissue Bank, 2016, 17(4), 745-756.

199. B. Ebrahimi, H. Matavos-Aramyan, and S. Keshtgar, *The cryoprotective effect of vitamins on human spermatozoa quality: a systematic review and meta-analysis,* Cell Tissue Bank, 2022, 23(2), 213-225.

200. N. Gleicher, A. Weghofer, J. Li, and D. Barad, *Differences in ovarian function parameters between Chinese and Caucasian oocyte donors: do they offer an explanation for lower IVF pregnancy rates in Chinese women?,* Hum Reprod, 2007, 22(11), 2879-82.

201. J.X. Xiong, Y.S. Wang, J. Sheng, D. Xiang, T.X. Huang, B.B. Tan, C.M. Zeng, H.H. Li, J. Yang, S.J. Meltzer, Y. Mori, Y.R. Qin, X.Y. Guan, and L. Fu, *Epigenetic alterations of a novel antioxidant gene SLC22A3 predispose susceptible individuals to increased risk of esophageal cancer,* Int J Biol Sci, 2018, 14(12), 1658-1668.

202. M.B. Sporn and K.T. Liby, *NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context,* Nat Rev Cancer, 2012, 12(8), 564-71.

203. M. Rojo de la Vega, E. Chapman, and D.D. Zhang, *NRF2 and the Hallmarks of Cancer,* Cancer Cell, 2018, 34(1), 21-43.

204. S. Zhang, S. Duan, Z. Xie, W. Bao, B. Xu, W. Yang, and L. Zhou, *Epigenetic Therapeutics Targeting NRF2/KEAP1 Signaling in Cancer Oxidative Stress,* Front Pharmacol, 2022, 13, 924817.

205. Y. Qin, J. Ji, G. Du, W. Wu, J. Dai, Z. Hu, J. Sha, B. Hang, C. Lu, Y. Xia, and X. Wang, *Comprehensive pathway-based analysis identifies associations of BCL2, GNAO1 and CHD2 with non-obstructive azoospermia risk,* Hum Reprod, 2014, 29(4), 860-6.

206. M.A. Kyrgiafini, M. Markantoni, T. Sarafidou, A. Chatziparasidou, N. Christoforidis, and Z. Mamuris, *Genome-wide association study identifies candidate markers related to lincRNAs associated with male infertility in the Greek population,* J Assist Reprod Genet, 2020, 37(11), 2869-2881.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Mẫu phiếu thu thập thông tin sử dụng trong nghiên cứu

PHIẾU THU THẬP THÔNG TIN NGHIÊN CỨU

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI ID :

BỘ MÔN Y SINH HỌC - DI TRUYỀN Ngày tháng năm 20

BỆNH ÁN

Chồng

Họ và tên:…… Tuổi:…….. Nghề nghiệp:……..

Địa chỉ:……

Năm kết hôn:……..ĐT:……..

Tiếp xúc phóng xạ, hóa chất (nếu có ghi rõ loại):……..

Bị thương ở bộ phận sinh dục: ……..

Bị bệnh:……..

Thuốc lá: ……điếu/ngày. Thuốc lào: ……điếu/ngày.

Bia: ……cốc/lần,……lần/tuần. Rượu: ……chén/lần,…..lần/tuần.

Lần xuất tinh gần nhất:…… Số lần giao hợp/tuần:……

Có mộng, di tinh: …… lần/tháng

Vợ

Họ và tên: ……Tuổi: …… Nghề nghiệp:……

Có kinh năm ……tuổi. Chu kì:……ngày. Đều/Không đều.

PARA: ……(con đầu khi …… tuổi)

Các bệnh đã mắc:……..

Trường Đại Học Y Hà Nội
BM Y sinh học-Di truyền
(Phòng 201A nhà A3)

XÉT NGHIỆM TINH DỊCH
(Bằng máy CASA)

Mã số:

Họ tên bệnh nhân: Tuổi:

Chẩn đoán lâm sàng: ……

Kết quả xét nghiệm

Thể tích *(≥1,5 ml)*	pH *(7,2-8)*	Mật độ tinh trùng *(≥15 triệu/ml)*	Tổng số tinh trùng *(triệu)*	Tỉ lệ sống *(≥ 58%)*	Độ di động của tinh trùng *(%)*				Tốc độ di động trung bình của tinh trùng *(µm/giây)*
					Tiến tới *(≥32%)*		Không tiến tới	Không di động	
					Tiến tới Nhanh	Tiến tới Chậm			

Hình thái tinh trùng					Tế bào khác *(≤ 1 triệu/ml)*	Hóa lỏng	Màu sắc	Độ nhớt
Bình thường	Không bình thường *(%)*							
(≥ 4 %)	Đầu	Cổ	Đuôi	Bào tương				

Khác:

Hà Nội, ngày tháng năm 201…

Người đọc kết quả:

BỆNH VIỆN ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI
Bộ môn Y sinh học – Di truyền

PHÒNG DI TRUYỀN PHÂN TỬ
Dept. of Molecular Genetics

Địa chỉ: Số 1 Tôn Thất Tùng, Đống Đa, Hà Nội

PHIẾU KẾT QUẢ ROS

Số phiếu:

I. THÔNG TIN MẪU

Tên bệnh nhân:		Tuổi:	Giới:
Địa chỉ:			
Chẩn đoán:			
Xét nghiệm:	**Kiểm tra mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch (ROS test)**		
Ngày làm xét nghiệm:			

II. KẾT QUẢ

Mức độ stress oxy hóa	

III. KẾT LUẬN

Hà Nội, ngày tháng năm 201…

Bác sĩ trả lời kết quả

Ghi chú: Mức độ I: Stress oxy hóa thấp

Mức độ II: Stress oxy hóa trung bình thấp

Mức độ III: Stress oxy hóa trung bình

Mức độ IV: Stress oxy hóa cao

Phụ lục 2. Thông số lâm sàng của các mẫu tinh dịch thu từ các mẫu nghiên cứu

Đặc điểm	Bệnh nhân (N=107)	Đối chứng (N=85)	p OR (95% CI)
Thể tích (mL/TB± SD)	2,88 ± 1,55	3,15 ± 1,37	0,213[b]
Mật độ (10^6/mL/TB± SD)	53,17 ± 42,77	100,84 ± 56,51	$2,2x10^{-10}$ [b]
Tổng số (10^6/ TB± SD)	150,35 ± 126,85	273,73 ± 192,47	$6,8x10^{-7}$ [b]
Sống (%/TB± SD)	81,25 ± 5,09	87,02 ± 2,72	$2x10^{-16}$ [b]
Di chuyển (% tiến tới/ TB± SD)	30,41 ± 7,06	47,19 ± 5,32	$2x10^{-16}$ [b]
Hình thái (% bình thường/TB± SD)	7,46 ± 3,69	11,59 ± 3,09	$8,1x10^{-13}$ [b]

Chú thích: SD: N: số mẫu nghiên cứu, Standard deviation-Sai số chuẩn, TB: giá trị trung bình.

Phụ lục 2: Danh sách mẫu tham gia nghiên cứu và nồng độ DNA tổng số

STT	Mã mẫu	Nồng độ (ng/µl)	STT	Mã mẫu	Nồng độ (ng/µl)	STT	Mã mẫu	Nồng độ (ng/µl)
1	MI_01	15,3	37	MI_37	29,6	73	MI_73	18,5
2	MI_02	18,5	38	MI_38	22,3	74	MI_74	23,2
3	MI_03	16,4	39	MI_39	19,4	75	MI_75	18,9
4	MI_04	22,5	40	MI_40	49,3	76	MI_76	25,9
5	MI_05	12,0	41	MI_41	39,5	77	MI_77	20,5
6	MI_06	12,1	42	MI_42	32,4	78	MI_78	51,2
7	MI_07	29,4	43	MI_43	52	79	MI_79	20,7
8	MI_08	11,7	44	MI_44	35,7	80	MI_80	51,2
9	MI_09	13,2	45	MI_45	38,7	81	MI_81	33,6
10	MI_10	14,2	46	MI_46	20,9	82	MI_82	68,6
11	MI_11	14,2	47	MI_47	29,8	83	MI_83	26,8
12	MI_12	11,3	48	MI_48	30,7	84	MI_84	18,3
13	MI_13	29,0	49	MI_49	35,5	85	MI_85	30,9
14	MI_14	25,7	50	MI_50	15,7	86	MI_86	39,7
15	MI_15	18,3	51	MI_51	34,5	87	MI_87	24,7
16	MI_16	11,2	52	MI_52	25,3	88	MI_88	45
17	MI_17	19,1	53	MI_53	24	89	MI_89	29,3
18	MI_18	19,7	54	MI_54	15,4	90	MI_90	21,9
19	MI_19	21,3	55	MI_55	22,1	91	MI_91	49,9
20	MI_20	7,8	56	MI_56	18,6	92	MI_92	57,5
21	MI_21	10,1	57	MI_57	34	93	MI_93	32,8
22	MI_22	35,8	58	MI_58	38,5	94	MI_94	28,2
23	MI_23	17,8	59	MI_59	17,3	95	MI_95	35,6
24	MI_24	18,6	60	MI_60	34,1	96	MI_96	14,3
25	MI_25	26,1	61	MI_61	59,4	97	MI_97	52,8
26	MI_26	29,5	62	MI_62	24,2	98	MI_98	22,7
27	MI_27	10,0	63	MI_63	28,9	99	MI_99	27
28	MI_28	15,3	64	MI_64	12,5	100	MI 100	17,5
29	MI_29	36,8	65	MI_65	27,7	101	MI 101	34,2
30	MI_30	12,7	66	MI_66	36,4	102	MI 102	40,1
31	MI_31	40,7	67	MI_67	28,5	103	MI 103	17,7
32	MI_32	26,4	68	MI_68	23,4	104	MI 104	60,2
33	MI_33	16,2	69	MI_69	26,7	105	MI 105	20,5
34	MI_34	12,1	70	MI_70	22	106	MI 106	19,8
35	MI_35	10,8	71	MI_71	23,8	107	MI 107	27,1
36	MI_36	14,0	72	MI_72	27,6			

Phụ lục 3: Danh sách mẫu đối chứng tham gia nghiên cứu và nồng độ DNA tổng số

STT	Mã mẫu	Nồng độ (ng/µl)	STT	Mã mẫu	Nồng độ (ng/µl)	STT	Mã mẫu	Nồng độ (ng/µl)
1	MI_C01	30,9	35	MI_C35	21,9	69	MI_C69	34,6
2	MI_C02	20,1	36	MI_C36	27,9	70	MI_C70	33,0
3	MI_C03	10,3	37	MI_C37	48,6	71	MI_C71	35,3
4	MI_C04	29,9	38	MI_C38	40,5	72	MI_C72	12,0
5	MI_C05	37,6	39	MI_C39	20,7	73	MI_C73	25,7
6	MI_C06	15,0	40	MI_C40	19,0	74	MI_C74	31,5
7	MI_C07	25,8	41	MI_C41	14,5	75	MI_C75	57,3
8	MI_C08	30	42	MI_C42	13,5	76	MI_C76	43,1
9	MI_C09	48,4	43	MI_C43	25,0	77	MI_C77	14,8
10	MI_C10	58,7	44	MI_C44	22,9	78	MI_C78	13,3
11	MI_C11	26,9	45	MI_C45	40,7	79	MI_C79	19,5
12	MI_C12	78,6	46	MI_C46	19,1	80	MI_C80	20,2
13	MI_C13	27,7	47	MI_C47	22,7	81	MI_C81	32,2
14	MI_C14	25,0	48	MI_C48	19,5	82	MI_C82	12,2
15	MI_C15	18,4	49	MI_C49	24,2	83	MI_C83	25,4
16	MI_C16	17,9	50	MI_C50	31,2	84	MI_C84	19,3
17	MI_C17	21,0	51	MI_C51	21,8	85	MI_C104	40,7
18	MI_C18	22,3	52	MI_C52	25,6			
19	MI_C19	15,1	53	MI_C53	19,2			
20	MI_C20	28,9	54	MI_C54	27,3			
21	MI_C21	26,9	55	MI_C55	11,4			
22	MI_C22	14,5	56	MI_C56	13,6			
23	MI_C23	13,9	57	MI_C57	10,1			
24	MI_C24	16,5	58	MI_C58	23,1			
25	MI_C25	17,3	59	MI_C59	19,1			
26	MI_C26	19,4	60	MI_C60	18,3			
27	MI_C27	23,4	61	MI_C61	14,9			
28	MI_C28	19,9	62	MI_C62	19,3			
29	MI_C29	31,5	63	MI_C63	39,0			
30	MI_C30	20,2	64	MI_C64	14,7			

31	MI_C31	21,1	65	MI_C65	37,5			
32	MI_C32	39,2	66	MI_C66	21,2			
33	MI_C33	24,9	67	MI_C67	50,2			
34	MI_C34	23,3	68	MI_C68	53,2			

Phụ lục 4: Tổng hợp số liệu về kiểu gen thuộc các vị trí biến thể 7958G>A (*SOD1*), c.47T>C (*SOD2*), -262C>T (*CAT*) và -786C>T (*NOS3*) của các mẫu nghiên cứu

Mã mẫu	Chú thích	*SOD1* rs4998557 7958G>A	*SOD2* rs4880 c.47T>C	*CAT* rs1001179 -262C>T	*NOS3* rs2070744 -786C>T
MI_C01	ĐC	GA	TT	CC	CT
MI_C02	ĐC	GG	TC	CC	TT
MI_C03	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C04	ĐC	AA	TC	CC	TT
MI_C05	ĐC	GG	TC	CC	CT
MI_C06	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C07	ĐC	AA	TT	CC	CT
MI_C08	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C09	ĐC	GG	TC	CC	TT
MI_C10	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C11	ĐC	AA	TC	CC	CC
MI_C12	ĐC	GG	TC	CC	TT
MI_C13	ĐC	GG	TC	CT	TT
MI_C14	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C15	ĐC	AA	TC	CC	TT
MI_C16	ĐC	GG	TT	CC	TT
MI_C17	ĐC	GA	TC	CC	TT
MI_C18	ĐC	AA	TT	CT	TT
MI_C19	ĐC	GA	CC	CC	TT
MI_C20	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C21	ĐC	GG	TT	CC	TT
MI_C22	ĐC	GG	TT	CC	TT
MI_C23	ĐC	AA	TT	CC	TT
MI_C24	ĐC	GG	TT	CC	TT
MI_C25	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C26	ĐC	GA	TC	CC	CT
MI_C27	ĐC	GA	TT	CC	CT
MI_C28	ĐC	GA	TC	CC	TT
MI_C29	ĐC	GG	TT	CC	TT

Mã mẫu	Chú thích	***SOD1*** rs4998557 7958G>A	***SOD2*** rs4880 c.47T>C	***CAT*** rs1001179 -262C>T	***NOS3*** rs2070744 -786C>T
MI_C30	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C31	ĐC	GG	TT	CC	TT
MI_C32	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C33	ĐC	AA	TT	CC	TT
MI_C34	ĐC	AA	TT	CC	TT
MI_C35	ĐC	GA	TC	CC	CT
MI_C36	ĐC	AA	TT	CC	TT
MI_C37	ĐC	GA	TC	CC	TT
MI_C38	ĐC	AA	TT	CC	TT
MI_C39	ĐC	GA	TT	CT	TT
MI_C40	ĐC	AA	TT	CC	TT
MI_C41	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C42	ĐC	AA	TT	CC	CT
MI_C43	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C44	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C45	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C46	ĐC	AA	TT	CC	TT
MI_C47	ĐC	AA	TC	CC	TT
MI_C48	ĐC	AA	TT	CC	TT
MI_C49	ĐC	AA	TC	CC	CT
MI_C50	ĐC	GG	TT	CT	CT
MI_C51	ĐC	GG	TC	CC	TT
MI_C52	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C53	ĐC	AA	TT	CC	TT
MI_C54	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C55	ĐC	GG	TT	CC	TT
MI_C56	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C57	ĐC	AA	TC	CC	TT
MI_C58	ĐC	GA	TC	CC	TT
MI_C59	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C60	ĐC	GA	TT	CC	CT
MI_C61	ĐC	GA	TT	CC	CT

Mã mẫu	Chú thích	***SOD1*** rs4998557 7958G>A	***SOD2*** rs4880 c.47T>C	***CAT*** rs1001179 -262C>T	***NOS3*** rs2070744 -786C>T
MI_C62	ĐC	GG	TT	CT	CT
MI_C63	ĐC	GA	TT	CT	TT
MI_C64	ĐC	GA	TC	CT	TT
MI_C65	ĐC	GG	TC	CC	TT
MI_C66	ĐC	GG	TT	CC	TT
MI_C67	ĐC	AA	TT	CC	TT
MI_C68	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C69	ĐC	GG	CC	CC	TT
MI_C70	ĐC	GA	TC	CC	CT
MI_C71	ĐC	AA	TC	CC	CT
MI_C72	ĐC	GG	TT	CC	TT
MI_C73	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C74	ĐC	GG	TT	CC	TT
MI_C75	ĐC	GG	TT	CC	TT
MI_C76	ĐC	GG	TC	CC	TT
MI_C77	ĐC	AA	TT	CC	TT
MI_C78	ĐC	GG	TC	CT	TT
MI_C79	ĐC	GG	TT	CC	TT
MI_C80	ĐC	GA	TC	CC	TT
MI_C81	ĐC	AA	TC	CT	TT
MI_C82	ĐC	GA	TT	CC	TT
MI_C83	ĐC	GG	TC	CT	TT
MI_C84	ĐC	AA	TT	CC	TT
MI_C104	ĐC	GG	TT	CC	CT
MI_01	Bệnh	GA	TC	CC	TT
MI_02	Bệnh	AA	TC	CC	TT
MI_03	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_04	Bệnh	AA	TT	CC	CT
MI_05	Bệnh	GG	TT	CC	TT
MI_06	Bệnh	GG	TT	CC	TT
MI_07	Bệnh	AA	TT	CC	TT
MI_08	Bệnh	GG	TT	CC	TT

Mã mẫu	Chú thích	***SOD1*** rs4998557 7958G>A	***SOD2*** rs4880 c.47T>C	***CAT*** rs1001179 -262C>T	***NOS3*** rs2070744 -786C>T
MI_09	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_10	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_100	Bệnh	GA	TT	CC	CT
MI_101	Bệnh	AA	TT	CC	TT
MI_102	Bệnh	GA	TC	CT	TT
MI_103	Bệnh	GG	TC	CC	TT
MI_104	Bệnh	GG	TC	CC	TT
MI_105	Bệnh	AA	TC	CT	CT
MI_106	Bệnh	AA	TC	CC	TT
MI_107	Bệnh	GA	TC	CC	TT
MI_11	Bệnh	AA	TT	CC	TT
MI_12	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_13	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_14	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_15	Bệnh	GA	TC	CC	TT
MI_16	Bệnh	GA	TC	CC	TT
MI_17	Bệnh	GG	TC	CC	TT
MI_18	Bệnh	AA	TC	CT	TT
MI_19	Bệnh	GA	TT	CT	CT
MI_20	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_21	Bệnh	GA	TT	CC	CT
MI_22	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_23	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_24	Bệnh	AA	TT	CC	TT
MI_25	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_26	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_27	Bệnh	GA	TC	CC	TT
MI_28	Bệnh	GG	TC	CC	TT
MI_29	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_30	Bệnh	GG	TT	CC	CT
MI_31	Bệnh	AA	TC	CC	TT
MI_32	Bệnh	GA	TT	CC	TT

Mã mẫu	Chú thích	***SOD1*** rs4998557 7958G>A	***SOD2*** rs4880 c.47T>C	***CAT*** rs1001179 -262C>T	***NOS3*** rs2070744 -786C>T
MI_33	Bệnh	AA	TC	CC	TT
MI_34	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_35	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_36	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_37	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_38	Bệnh	GA	CC	CT	CT
MI_39	Bệnh	GA	TT	CC	CT
MI_40	Bệnh	GA	TC	CT	CT
MI_41	Bệnh	AA	TT	CT	TT
MI_42	Bệnh	GG	CC	CC	TT
MI_43	Bệnh	GA	TC	CC	CT
MI_44	Bệnh	GA	TC	CT	TT
MI_45	Bệnh	GA	TC	CC	CT
MI_46	Bệnh	GA	CC	CT	TT
MI_47	Bệnh	GA	TC	CC	TT
MI_48	Bệnh	GA	TT	CC	CT
MI_49	Bệnh	GG	TC	CC	CT
MI_50	Bệnh	GG	TC	CC	CC
MI_51	Bệnh	GA	TC	CC	CT
MI_52	Bệnh	AA	TC	TT	CT
MI_53	Bệnh	GA	TC	CC	TT
MI_54	Bệnh	GA	TC	CC	CT
MI_55	Bệnh	GA	CC	CC	TT
MI_56	Bệnh	GG	TT	CC	TT
MI_57	Bệnh	GA	CC	CC	TT
MI_58	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_59	Bệnh	GA	TT	CT	TT
MI_60	Bệnh	GG	TC	CC	CT
MI_61	Bệnh	GG	TT	CC	CT
MI_62	Bệnh	GG	TC	CC	CT
MI_63	Bệnh	GG	TT	CC	CT
MI_64	Bệnh	GA	TC	CC	CT

Mã mẫu	Chú thích	***SOD1*** rs4998557 7958G>A	***SOD2*** rs4880 c.47T>C	***CAT*** rs1001179 -262C>T	***NOS3*** rs2070744 -786C>T
MI_65	Bệnh	GA	TC	CT	TT
MI_66	Bệnh	GG	TC	CC	CT
MI_67	Bệnh	GA	TT	CC	CT
MI_68	Bệnh	GA	TC	CC	CT
MI_69	Bệnh	AA	TC	CC	CT
MI_70	Bệnh	GA	CC	CC	CT
MI_71	Bệnh	GG	TC	CC	CT
MI_72	Bệnh	AA	TT	CC	CT
MI_73	Bệnh	GA	TT	CC	CT
MI_74	Bệnh	GG	TC	CT	TT
MI_75	Bệnh	GA	TC	CT	CT
MI_76	Bệnh	GA	TT	CC	TT
MI_77	Bệnh	GA	TC	CC	CT
MI_78	Bệnh	GA	TC	CC	CT
MI_79	Bệnh	GA	TT	CC	CT
MI_80	Bệnh	AA	TC	CC	CT
MI_81	Bệnh	AA	TT	CC	TT
MI_82	Bệnh	GA	TC	CT	TT
MI_83	Bệnh	GG	CC	CT	TT
MI_84	Bệnh	GG	TT	CC	CT
MI_85	Bệnh	GG	TT	CC	CT
MI_86	Bệnh	GA	TT	CC	CT
MI_87	Bệnh	GA	TC	CC	CT
MI_88	Bệnh	GA	TC	CC	TT
MI_89	Bệnh	GA	TC	CC	TT
MI_90	Bệnh	GA	TC	CT	TT
MI_91	Bệnh	GA	TC	CT	CT
MI_92	Bệnh	AA	TC	CC	TT
MI_93	Bệnh	GA	TT	CC	CC
MI_94	Bệnh	GG	TT	CC	TT
MI_95	Bệnh	GA	TC	CC	CT
MI_96	Bệnh	GA	CC	CC	CT

Mã mẫu	Chú thích	***SOD1*** rs4998557 7958G>A	***SOD2*** rs4880 c.47T>C	***CAT*** rs1001179 -262C>T	***NOS3*** rs2070744 -786C>T
MI_97	Bệnh	GA	TT	CT	CT
MI_98	Bệnh	GA	TT	CC	CT
MI_99	Bệnh	GA	TT	CC	TT

Chú thích: MI-bệnh nhân vô sinh nam, MIC-người khỏe mạnh

Phụ lục 5: Cân bằng di truyền Hardy-Weinberg của các biến thể gen nghiên cứu

Gen	Biến thể	Kiểu gen	Observed	Expected	χ^2	p HWE
SOD1	rs4998557 7958G>A	GG	49	52,08	0,795	0,67
		GA	102	95,83		
		AA	41	44,08		
SOD2	rs4880 c.47T>C p.16Val>Ala	TT	107	108,75	0,46	0,79
		TC	75	71,5		
		CC	10	11,75		
CAT	rs1001179 -262C>T	CC	163	163,17	0,09	0,98
		CT	28	27,66		
		TT	1	1,17		
NOS3	rs2070744 -786C>T	CC	3	5,33	1,47	0,48
		CT	58	53,33		
		TT	131	133,33		