

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

**BỘ Y TẾ**



**VŨ THỊ HUYỀN**

**ĐÁNH GIÁ SỰ BIẾN ĐỔI CỦA MỘT SỐ GEN  
MÃ HÓA ENZYM CHUYỂN HÓA XENOBIOTICS  
Ở NAM GIỚI VÔ SINH**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI - 2019**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

**VŨ THỊ HUYỀN**

**ĐÁNH GIÁ SỰ BIẾN ĐỔI CỦA MỘT SỐ GEN  
MÃ HÓA ENZYM CHUYỂN HÓA XENOBIOTICS  
Ở NAM GIỚI VÔ SINH**

**Chuyên ngành : Y Sinh học - Di truyền**

**Mã số : 62720111**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

*Người hướng dẫn khoa học:*

- 1. PGS.TS. Trần Đức Phần**
- 2. TS. Nguyễn Thị Trang**

**HÀ NỘI - 2019**

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

ADN	: Deoxyribonucleic acid (Acid Nucleic)
<i>CYP1A1</i>	: Cytochrome P4501A1
GSTs	: Glutathione-S-transferases
HOS	: High oxidative stress (Mức độ stress oxy hóa cao)
LOS	: Low oxidative stress (Mức độ stress oxy hóa thấp)
MDR	: Multifactor dimensionality reduction
<i>NAT2</i>	: N-acetyl-transferase 2
NST	: Nhiễm sắc thể.
OAT	: Oligo astheno teratozoospermia (Mật độ di động tiến tới và tỷ lệ hình thái bình thường thấp hơn ngưỡng tham khảo)
OS	: Oxidative stress (Stress oxy hóa)
SNP	: Single nucleotide polymorphism
TĐĐ	: Tinh dịch đồ
WHO	: Tổ chức y tế thế giới
X	: Xenobiotics

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Vũ Thị Huyền, nghiên cứu sinh khóa 34, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Y Sinh học - Di truyền, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của Thầy Trần Đức Phấn và Cô Nguyễn Thị Trang.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội, ngày tháng năm 2018*

**Người viết cam đoan ký và ghi rõ họ tên**

## MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	3
1.1. Tình hình vô sinh và vô sinh nam.....	3
1.1.1. Khái niệm vô sinh và vô sinh nam .....	3
1.1.2. Tình hình vô sinh và vô sinh nam trên thế giới.....	4
1.1.3. Tình hình vô sinh và vô sinh nam ở Việt Nam .....	5
1.2. Các nguyên nhân vô sinh nam .....	7
1.2.1. Nguyên nhân di truyền .....	7
1.2.2. Nguyên nhân sinh hóa .....	10
1.2.3. Nguyên nhân do nội tiết .....	11
1.2.4. Bệnh lý ảnh hưởng khả năng sinh sản ở nam giới .....	11
1.2.5. Độ tuổi sinh sản.....	12
1.2.6. Môi trường.....	12
1.3. Xenobiotics và quá trình chuyển hóa xenobiotics trong cơ thể .....	17
1.3.1. Khái niệm xenobiotics.....	17
1.3.2. Chuyển hoá Xenobiotics .....	17
1.3.3. Thành phần phức hợp enzym chuyển hóa xenobiotics .....	20
1.4. Biến đổi gen chuyển hóa sinh học xenobiotics .....	27
1.4.1. Đặc tính của enzym mã hóa bởi gen chuyển hóa xenobiotics .....	30
1.4.2. Các gen mã hóa enzym chuyển hóa xenobiotics chủ yếu .....	31
1.5. Một số phương pháp phát hiện đa hình gen .....	39
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	42
2.1. Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu .....	42
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	42
2.1.2. Thời gian nghiên cứu .....	44
2.1.3. Địa điểm nghiên cứu .....	44
2.2. Phương pháp nghiên cứu .....	44
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	44
2.2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	44

2.2.3. Các chỉ số nghiên cứu .....	57
2.3. Xử lý số liệu.....	60
2.4. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu.....	61
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....	62
3.1. So sánh kết quả của kỹ thuật ARMS-PCR với kết quả giải trình tự gen....	62
3.2. Đặc điểm về tuổi của nhóm vô sinh và nhóm đối chứng .....	63
3.3. Biến đổi nucleotid của các gen <i>CYP1A1</i> , <i>NAT2</i> , <i>GSTP1</i> .....	64
3.3.1. Phân bố kiểu gen và sự tương ứng với cân bằng Hardy-Weinberg ở nhóm vô sinh và nhóm chứng.....	64
3.3.2. Kết quả nghiên cứu đa hình gen <i>CYP1A1</i> 2455A>G.....	67
3.3.3. Kết quả nghiên cứu đa hình gen <i>NAT2</i> 481C>T(rs1799929) .....	68
3.3.4. Kết quả nghiên cứu đa hình gen <i>NAT2</i> 590 G>A (rs1799930) .....	71
3.3.5. Kết quả nghiên cứu đa hình gen <i>GSTP1</i> 313G>A (rs1695) .....	73
3.3.6. Kết quả nghiên cứu đa hình gen <i>GSTP1</i> 341C>T(rs1138272).....	75
3.4. Mối liên quan giữa đa hình gen <i>GSTP1</i> ; <i>NAT2</i> và <i>CYP1A1</i> với vô sinh nam....	77
3.4.1. Mối liên quan giữa đa hình gen <i>GSTP1</i> ; <i>NAT2</i> và <i>CYP1A1</i> giữa nhóm vô sinh và nhóm chứng.....	77
3.4.2. Mối liên quan giữa mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch ở bệnh nhân nam có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics .....	85
Chương 4: BÀN LUẬN .....	88
4.1. Về độ tin cậy của phương pháp ARMS - PCR dùng trong nghiên cứu	88
4.2. Đặc điểm về tuổi của đối tượng nghiên cứu.....	90
4.3. Bàn về các biến đổi nucleotid của các gen <i>CYP1A1</i> , <i>NAT2</i> , <i>GSTP1</i> với vô sinh .....	91
4.3.1. Phân bố kiểu gen và sự tương ứng với cân bằng Hardy-Weinberg ở nhóm vô sinh và nhóm chứng.....	91
4.3.2. Sự phân bố kiểu gen và mối liên quan giữa đa hình gen <i>CYP1A1</i> 2455A>G với vô sinh nam nguyên phát.....	92
4.3.3. Về phân bố kiểu gen và mối liên quan giữa đa hình gen <i>NAT2</i> 481C>T(rs1799929) và <i>NAT2</i> 590 G>A (rs1799930) với vô sinh nam nguyên phát.....	95

4.3.4. Về phân bố kiểu gen và mối liên quan giữa đa hình gen <i>GSTP1</i> 313G>A (rs1695) và <i>GSTP1</i> 341C>T(rs1138272) với vô sinh nam nguyên phát.....	99
4.4. Mối tương quan giữa các biến đổi nucleotid thường gặp của các gen <i>CYP1A1</i> , <i>GSTP1</i> và <i>NAT2</i> với vô sinh nam nguyên phát .....	104
4.4.1. Mối tương quan giữa đa hình gen <i>CYP1A1</i> , <i>GSTP1</i> và <i>NAT2</i> với vô sinh nam nguyên phát .....	104
4.4.2. Mối liên quan giữa mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch ở bệnh nhân nam có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics .....	114
KẾT LUẬN .....	120
KIẾN NGHỊ .....	122
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Một số chỉ số TDD theo tiêu chuẩn WHO 2010 .....	3
Bảng 1.2:	Đặc tính của enzym chuyển hóa .....	20
Bảng 1.3.	Các dạng SNP của gen <i>CYP1A1</i> .....	33
Bảng 2.1.	Trình tự môi của các đa hình gen <i>CYP1A1</i> 2455A>G (I462V), <i>NAT2</i> 590G>A (R197Q); <i>NAT2</i> 481C>T(L161L) và <i>GSTP1</i> 313G>A (I105V); <i>GSTP1</i> 341C>T(A114 V).....	48
Bảng 2.2.	Chu trình luân nhiệt của phản ứng ARMS-PCR .....	49
Bảng 3.1.	So sánh kết quả của kỹ thuật với kết quả giải trình tự gen của các mẫu kiểm chứng.....	62
Bảng 3.2.	Phân bố nhóm tuổi của nhóm vô sinh và nhóm chứng.....	63
Bảng 3.3.	Phân bố kiểu gen và giá trị dị hợp tử của các đa hình gen chuyển hóa xenobiotics ở nhóm chứng .....	65
Bảng 3.4.	Phân bố kiểu gen và giá trị dị hợp tử của các đa hình gen chuyển hóa xenobiotics ở nhóm vô sinh .....	66
Bảng 3.5.	Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình <i>CYP1A1</i> 2455A>G.....	67
Bảng 3.6.	Kết quả phân tích alen của đa hình <i>CYP1A1</i> 2455A>G.....	68
Bảng 3.7.	Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình gen <i>NAT2</i> 481C>T (rs1799929).....	69
Bảng 3.8.	Kết quả phân tích alen của đa hình gen <i>NAT2</i> 481C>T (rs1799929).....	70
Bảng 3.9.	Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình gen <i>NAT2</i> 590 G>A (rs1799930).....	71
Bảng 3.10.	Kết quả phân tích alen của đa hình gen <i>NAT2</i> 590 G>A (rs1799930).....	72
Bảng 3.11.	Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình gen <i>GSTP1</i> 313G>A (rs1695).....	73
Bảng 3.12.	Phân tích alen của đa hình gen <i>GSTP1</i> 313G>A (rs1695).....	74
Bảng 3.13.	Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình gen <i>GSTP1</i> 341C>T(rs1138272).....	75



Bảng 3.14.	Kết quả phân tích alen của đa hình gen <i>GSTP1</i> 341C>T(rs1138272).....	76
Bảng 3.15.	Kết quả phân tích kiểu gen kết hợp 2 đa hình <i>NAT2</i> và <i>GSTP1</i> ở nhóm vô sinh và nhóm chứng.....	77
Bảng 3.16.	Kết quả phân tích kiểu gen kết hợp 2 đa hình <i>CYP1A1</i> và <i>NAT2</i> ở nhóm vô sinh và nhóm chứng.....	80
Bảng 3.17.	Kết quả phân tích kiểu gen kết hợp 2 đa hình <i>GSTP1</i> và <i>CYP1A1</i> ở nhóm vô sinh và nhóm chứng.....	82
Bảng 3.18.	Tổ hợp tương tác gen có giá trị nhất ở các locus của các đa hình gen hệ thống Xenobiotics ở bệnh nhân vô sinh nam.....	84
Bảng 3.19.	Sự phân bố các mức độ OS trên nhóm bệnh và nhóm chứng ....	85
Bảng 3.20.	Sự phân bố số lượng đa hình gen chuyển hóa xenobiotics giữa các mức OS ở nhóm bệnh.....	86
Bảng 4.1.	Một số đa hình của gen <i>NAT2</i> .....	96
Bảng 4.2.	Phân bố đa hình 313G>A gen <i>GSTP1</i> trong nghiên cứu của Xiong D.K. (2015).....	103

## DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Các kiểu tổ hợp gen có giá trị tiên đoán cao nhất .....	84
--	----

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1: Quá trình biến đổi của Xenobiotics trong cơ thể .....	17
Hình 1.2. Hình ảnh quang phổ của Cytochrom P450 .....	21
Hình 1.3. Chu trình phản ứng của Cyt.P450 trong chuyển hóa thuốc .....	23
Hình 1.4. Vị trí của gen <i>CYP1A1</i> trên <i>NST 15</i> .....	32
Hình 1.5. Quá trình chuyển hóa giai đoạn I của benzo[a]pyrene .....	32
Hình 1.6. Sơ đồ phản ứng của Glutathione khử.....	35
Hình 1.7. Họ gen <i>GSTs</i> .....	36
Hình 1.8. Vị trí của gen <i>GSTP1</i> trên <i>NST 11</i> .....	36
Hình 1.9. Vị trí của gen <i>NAT2</i> trên <i>NST 8</i> .....	38
Hình 1.10. Quá trình acetyl hóa của <i>NAT2</i> .....	38
Hình 2.1. Máy đo quang phổ Nanodrop 2000 .....	46
Hình 2.2. Kết quả điện di sản phẩm PCR .....	49
Hình 2.3. Kết quả điện di tự động QSEP100 sản phẩm PCR .....	50
Hình 2.4. Kết quả điện di tự động QSEP100 sản phẩm PCR .....	51
Hình 2.5. Kết quả điện di tự động QSEP100 sản phẩm PCR .....	51
Hình 2.6. Hình ảnh giải trình tự đoạn gen <i>CYP1A1</i> chứa vị trí 2455A>G .....	53
Hình 2.7. Hình ảnh giải trình tự đoạn gen chứa vị trí 481 C>T gen <i>NAT2</i> .....	54
Hình 2.8. Hình ảnh giải trình tự đoạn gen chứa vị trí 590G>A gen <i>NAT2</i> .....	54
Hình 2.9. Hình ảnh giải trình tự đoạn gen chứa vị trí 313G>A gen <i>GSTP1</i> ...	55
Hình 2.10. Hình ảnh giải trình tự đoạn gen chứa vị trí 341C>T gen <i>GSTP1</i> ....	56
Hình 2.11. Kết quả đo mức độ oxy hóa tinh dịch .....	57

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Vô sinh là tình trạng bệnh lý gặp ở 12%-15% cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh sản, tương đương 50-80 triệu người trên thế giới [1]. Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 1985), có khoảng 20% là vô sinh không rõ nguyên nhân (KRNN), 80% có nguyên nhân, trong đó vô sinh do nữ chiếm 40%, do nam chiếm 40% và do cả vợ và chồng là 20%.

Có rất nhiều nguyên nhân gây ra vô sinh ở nam giới, mỗi nguyên nhân cần có cách điều trị khác nhau. Vì vậy, để có hiệu quả cao trong điều trị, việc chẩn đoán chính xác nguyên nhân gây ra vô sinh là hết sức quan trọng giúp cho các bác sĩ lâm sàng quyết định phương pháp điều trị tối ưu nhất.

Trong những năm trở lại đây, một trong những nguyên nhân vô sinh đã và đang được nghiên cứu là sự mất cân bằng trong chuyển hóa các chất của cơ thể, trong đó có chuyển hóa xenobiotics. Xenobiotics là các chất không có nguồn gốc từ sinh vật, trong đó có nhiều chất có hại với sức khỏe con người, có thể là nguyên nhân gây vô sinh. Khi quá trình chuyển hóa xenobiotics bị rối loạn, xuất hiện tình trạng tích tụ các xenobiotics và sản phẩm chuyển hóa của chúng trong cơ thể, bao gồm các gốc tự do không có lợi. Khi cơ thể có sự mất cân bằng giữa các gốc tự do và các chất chống oxy hóa sẽ dẫn đến tình trạng stress oxy hóa ở các cơ quan trong cơ thể, trong đó có hệ sinh dục, từ đó dẫn tới vô sinh.

Ở người, Cytochrome P4501A1 (*CYP1A1*) là gen mã hóa cho enzym thuộc họ Cytochrom P450 tham gia vào quá trình chuyển hóa các xenobiotics, khi các gen này bị biến đổi có thể gây vô sinh ở nam giới. Trong giai đoạn I của quá trình chuyển hóa, *CYP1A1* tham gia hoạt hóa các xenobiotics xâm nhập vào cơ thể, do đó khi *CYP1A1* bị biến đổi làm tăng hoạt tính có thể làm tăng nguy cơ vô sinh hoặc ung thư. Hiện nay, người ta đã phát hiện ra có mối

liên quan giữa tính đa hình thái của gen *CYP1A1* với vô sinh nam [2], trong đó hay gặp nhất là đa hình *CYP1A1\*2A*, *CYP1A1\*2B*.

Glutathione S transferase P1 (*GSTP1*) và N-acetyl-transferase 2 (*NAT2*) cũng là các gen mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình chuyển hóa, đào thải xenobiotics. Trong khi *CYP1A1* có chức năng hoạt hóa thì *GSTP1* và *NAT2* là những enzym của giai đoạn II có chức năng chuyển hóa các xenobiotics đã được *CYP1A1* hoạt hóa thành dạng không độc để đào thải ra ngoài. Khi bị biến đổi các gen này sẽ dẫn đến rối loạn chức năng của enzym giải độc dẫn đến ung thư hoặc vô sinh ở nam giới [2], [3].

Ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào đánh giá sự tác động của ba gen này ở bệnh nhân vô sinh nam, vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm hai mục tiêu:

1. *Xác định các biến đổi nucleotid của các gen CYP1A1, NAT2, GSTP1 ở nam giới vô sinh nguyên phát.*
2. *Phân tích mối liên quan giữa các biến đổi nucleotid thường gặp của các gen CYP1A1, NAT2, GSTP1 với vô sinh nam.*

## Chương 1

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. Tình hình vô sinh và vô sinh nam

##### 1.1.1. Khái niệm vô sinh và vô sinh nam

Theo tổ chức y tế thế giới (WHO), vô sinh là tình trạng một cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh đẻ, 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].

Nguyên nhân vô sinh có thể do vợ hoặc chồng, cũng có thể từ cả hai nhưng cũng có nhiều trường hợp không rõ nguyên nhân (KRNN). Ngày nay, xã hội ngày càng phát triển cùng với đó là sự đi xuống của vấn đề môi trường, hóa chất độc hại, stress, đặc biệt là vấn đề vệ sinh an toàn thực phẩm đã làm tỷ lệ vô sinh ngày càng cao và trở thành vấn đề cần quan tâm của toàn xã hội.

Vô sinh KRNN là trường hợp vô sinh mà thăm khám lâm sàng và làm các xét nghiệm kinh điển ở cả vợ và chồng không thấy được nguyên nhân.

Xét nghiệm tinh dịch đồ (TDD) là xét nghiệm cơ bản trong chẩn đoán vô sinh nam. Từ năm 1978, WHO đã có tài liệu hướng dẫn đánh giá TDD. Năm 2010, phiên bản V có những chỉnh sửa về tiêu chuẩn đánh giá TDD [4].

**Bảng 1.1. Một số chỉ số TDD theo tiêu chuẩn WHO 2010 [4]**

Chỉ số TDD	WHO 2010
<i>Thể tích tinh dịch (ml)</i>	≥ 1,5
<i>pH tinh dịch</i>	≥ 7,2
<i>Thời gian hoá lỏng (phút)</i>	< 30
<i>Độ nhớt<sup>1</sup> (cm)</i>	< 2
<i>Mật độ tinh trùng (10<sup>6</sup>/ml)</i>	≥ 15
<i>Tổng số tinh trùng (10<sup>6</sup>)</i>	> 39
<i>Di động (%)</i>	PR ≥ 32
<i>Hình thái bình thường (%)</i>	≥ 4
<i>Tỷ lệ sống (%)</i>	≥ 58
<i>Bạch cầu (10<sup>6</sup>/ml)</i>	≤ 1

*Chú thích: PR. Di chuyển tiến tới (Progressive).*

Theo tiêu chuẩn của WHO, trường hợp mật độ tinh trùng <15 triệu/ml được coi là thiếu tinh (oligosperm) trong đó nếu mật độ tinh trùng <5 triệu/ml được gọi là thiếu tinh nặng. Tinh trùng bất thường khi một trong các chỉ số mật độ, hình thái bình thường, tỷ lệ sống, tỷ lệ di động tiến tới của tinh trùng... dưới ngưỡng cho phép (bảng 1.1). Trường hợp Oligo astheno teratozoospermia (OAT) là cả mật độ, tỷ lệ di động và tỷ lệ hình thái bình thường thấp hơn ngưỡng.

### ***1.1.2. Tình hình vô sinh và vô sinh nam trên thế giới***

Theo WHO (1985), có khoảng 20% vô sinh là KRNN, 80% có nguyên nhân, trong đó vô sinh do nữ là 40%, do nam là 40% và do cả hai vợ chồng là 20%. Theo ước tính của WHO (1991), trên thế giới có khoảng 12%-15% cặp vợ chồng vô sinh tương đương 50-80 triệu người [5].

Theo WHO (2010), các cặp vợ chồng ở độ tuổi sinh đẻ có khoảng 8 - 10% bị vô sinh trong đó 35% nguyên nhân do vợ, 30% do chồng, 25% do cả hai và 10% là không rõ nguyên nhân. Năm 2013 tỷ lệ vô sinh là 10-15% cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh sản [4].

Ở Australia, theo Kildea (2000) tỷ lệ vô sinh là 26,3% nam giới tuổi 20 - 45 [6], tại Mỹ theo Wysahk (2001) tỷ lệ này là 17,1% [7], trong khi ở giai đoạn 2006 - 2010 là 9,4% ở nam giới độ tuổi 15 - 44 và 12% ở độ tuổi 25 - 44 [8], [9]. Ở Châu Phi, Larsen và cộng sự (cs) (2000) nghiên cứu ở 10 quốc gia cho thấy tỷ lệ vô sinh nguyên phát là 3% các cặp vợ chồng ở lứa tuổi sinh sản.

Theo Hội tiết niệu sinh dục Mỹ (2001), khoảng 6,1 triệu người ở Mỹ bị vô sinh, 1/3 là do nữ, 1/3 do nam, phần còn lại do cả hai hoặc KRNN [5].

Theo D. Stewart Irvine (2002) thì vô sinh chiếm 14-17% ở các cặp vợ chồng, trong đó vô sinh do nam khó xác định [10]. Theo Mittal (2004) ở Ấn Độ, vô sinh ảnh hưởng tới 10-20% cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh đẻ [11].

Theo Ali H (2005) ở Ả Rập có khoảng 10-15% cặp vợ chồng vô sinh, trong đó do nam là 50% [12]. Theo nghiên cứu của Dohle G.R. (2005) ở Hà

Lan, vô sinh chiếm 15% các cặp vợ chồng, trong số đó vô sinh nam khoảng 50% [13]. Nghiên cứu của Ceylan ở Thổ Nhĩ Kỳ (2009) cho thấy 10-20% cặp vợ chồng độ tuổi sinh sản bị vô sinh, trong đó vô sinh nam chiếm 50% [14].

Maya N. Mascarenhas và cs (2012) phân tích 277 cuộc điều tra của 101 nước từ 1990 đến 2010 cho thấy tỷ lệ vô sinh nguyên phát là 1,9% năm 1990 lên đến 2,2% năm 2010, vô sinh thứ phát là 9,3% năm 1990 lên 11,1% năm 2010. Như vậy, vô sinh có xu hướng ngày càng tăng. Ước tính năm 2010 trên thế giới có khoảng 48,5 triệu cặp vợ chồng bị vô sinh [15].

Theo A. Jungwirth (2013), tỷ lệ vô sinh khoảng 15%, trong đó vô sinh nam chiếm khoảng 50% và 30-40% trong số đó KRNN [16]. Theo Tracey Bushnik (2013) tỷ lệ vô sinh có xu hướng ngày càng tăng, tỷ lệ vô sinh ở Canada năm 2009 - 2010 là khoảng 11,5% - 15,7%. Tỷ lệ vô sinh tăng đặc biệt rõ ở nhóm các cặp vợ chồng trẻ. Nếu so sánh tình hình vô sinh ở những cặp vợ chồng có vợ độ tuổi từ 18 - 29 thì năm 1984 tỷ lệ vô sinh là 4,9%, năm 2009 - 2010 khoảng 7,0 - 13,7% [17].

Nghiên cứu của Ashok Agarwal (2015), thống kê các báo cáo về vô sinh trên toàn cầu cho thấy khoảng 15% các cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh đẻ bị vô sinh, ước tính có 48,5 triệu cặp vợ chồng bị vô sinh trên toàn thế giới, trong đó vô sinh do nữ là 50%, do nam là 20 - 30%, do cả nam và nữ là 20 - 30%. Tỷ lệ vô sinh nam thay đổi khác nhau ở các nước (từ 2,5 - 12%) [18].

Nhìn chung, theo các nghiên cứu trên thì tỷ lệ vô sinh trên thế chiếm khoảng 15%, đặc biệt có nơi khá cao đến hơn 20%, trong đó vô sinh nam giới chiếm khoảng 40-50% các trường hợp.

### ***1.1.3. Tình hình vô sinh và vô sinh nam ở Việt Nam***

Ở Việt Nam, các nghiên cứu cho thấy tỷ lệ vô sinh có xu hướng tăng. Điều tra dân số năm 1980, tỷ lệ vô sinh là 7-10%, đến năm 1982, tỷ lệ này lên

đến 13%, trong đó vô sinh nữ chiếm 54%, vô sinh nam chiếm 36%, vô sinh KRNN chiếm 10% [19].

Theo Phan Văn Quyền (2000) tỷ lệ vô sinh khoảng 10-15% [20]. Theo Trần Thị Phương Mai (2001), vô sinh do nữ chiếm khoảng 30-40%, vô sinh nam khoảng 30%. Khoảng 20% các trường hợp tìm thấy nguyên nhân vô sinh ở cả hai vợ chồng, có khoảng 20% các cặp vợ chồng vô sinh KRNN [21].

Trần Thị Trung Chiến (2002) cho thấy tỷ lệ vô sinh trong độ tuổi sinh đẻ chiếm 5%, trong đó nguyên nhân vô sinh do nam giới chiếm 40,8% [22]. Theo nghiên cứu ở Bệnh viện Phụ Sản Trung Ương năm 2003: tỷ lệ vô sinh nam chiếm 30,6%, vô sinh nữ là 47,5%, còn lại 10,9% là KRNN.

Nguyễn Viết Tiến (2009) nghiên cứu trên 14.396 cặp vợ chồng trong độ tuổi 15 - 49, tại 8 tỉnh đại diện cho 8 vùng sinh thái của cả nước thấy tỷ lệ vô sinh chung trên toàn quốc là 7,7%, trong đó vô sinh nguyên phát là 3,9% và vô sinh thứ phát là 3,8%. Tỷ lệ vô sinh cao nhất là ở tỉnh Khánh Hoà (13,9%) và thấp nhất là ở tỉnh Hải Phòng (3,8%) và Quảng Ninh (3,9%) [23].

Theo Trần Quán Anh (2009) tỷ lệ vô sinh ở nước ta là 15%, trong đó vô sinh nam chiếm trên 50% và tỷ lệ vô sinh đang có xu hướng ngày càng tăng [24]. Nghiên cứu của Nông Minh Hoàng (2010) về tỷ lệ vô sinh ở 4 tỉnh phía Bắc nước ta thì tỷ lệ vô sinh là 7,1%. Trong đó Hải Phòng là 8,5%, Điện Biên 6,9%, Quảng Ninh 5,7% và Thanh Hóa là 7,2% [25].

Theo báo cáo của Nguyễn Viết Tiến (2013), tỷ lệ vô sinh ở Việt Nam là 7,7%. Trong đó vô sinh nam giới chiếm 25-40%, do nữ giới 40-55%, còn lại là do cả hai hoặc KRNN [26]. Nguyễn Đức Như (2015) đã phát hiện tỷ lệ mất đoạn AZF ở những người thiếu tinh nặng và vô tinh là 14-30% [27].

Nhìn chung, theo các tác giả ở Việt Nam và trên thế giới đều thấy nguyên nhân vô sinh do nam giới chiếm tỷ lệ gần bằng do nữ giới. Với các số liệu nêu trên, rõ ràng vô sinh nói chung và vô sinh nam giới nói riêng đang trở thành một vấn đề đáng lo ngại của y học và xã hội ở Việt Nam.



## **1.2. Các nguyên nhân vô sinh nam**

### ***1.2.1. Nguyên nhân di truyền***

#### ***1.2.1.1. Nguyên nhân di truyền ở mức độ tế bào***

Các bất thường về số lượng hay cấu trúc nhiễm sắc thể (NST) có thể gặp ở cả NST giới tính (hội chứng Klinefelter, hội chứng nam 47,XYY, hội chứng nam 46,XX, hội chứng Noonan) và NST thường (Hội chứng Down, hội chứng Prader Willi, NST marker...). Các bất thường này làm giảm quá trình sinh tinh dẫn đến hậu quả suy giảm chức năng sinh sản của nam giới.

Tại Việt Nam, theo Trần Cúc Ánh (2012) nghiên cứu trên 187 cặp vợ chồng vô sinh nguyên phát thì có 15% người chồng mang bất thường NST, trong số này, có đến 89,3% là bất thường NST giới tính [28].

Theo các tài liệu công bố trên thế giới, ở nam giới vô sinh, tỷ lệ bất thường NST thường cao gấp 6 lần và bất thường NST giới tính cao gấp 15 lần so với cộng đồng [20].

#### ***1.2.1.2. Nguyên nhân di truyền ở mức độ phân tử***

##### ***Mất đoạn AZF trên NST Y***

Một trong những nguyên nhân vô sinh ở nam giới là do mất đoạn nhỏ nhánh dài của NST Y (Yq). Mất đoạn nhỏ chủ yếu xảy ra ở vùng AZF nơi có chứa nhiều gen liên quan tới quá trình sinh tinh, đây là nguyên nhân bất thường di truyền thứ hai sau hội chứng Klinefelter gây vô sinh ở nam giới [29]. Vùng AZF gồm 4 khu vực: AZFa, AZFb, AZFc, AZFd.

Theo Nguyễn Thị Việt Hà (2012), có 8% trường hợp vô sinh nam có mất đoạn AZF trên NST Y. Trong đó mất AZFc chiếm tỷ lệ cao nhất (57,89%), tiếp đến là mất đoạn AZFa (31,58%), mất đoạn AZFb và mất đoạn AZFa/b/c chiếm tỷ lệ 5,26% [30].

##### ***Đột biến gen AR (Androgen receptor)***

Androgen là hormone steroid quan trọng trong sự biểu hiện kiểu hình nam. Để thực hiện chức năng này, androgen thông qua một thụ thể là

androgen receptor (AR). Thụ thể AR được mã hóa bởi một gen nằm trên nhánh dài của NST X. Đột biến của gen *AR* dẫn đến cơ quan sinh dục không rõ ràng hoặc bị nữ hóa hoặc vẫn có cơ quan sinh dục nam nhưng khả năng sinh sản giảm [31]. Trong đó, đột biến lặp bộ ba CAG  $\geq 26$  lần gặp ở 25% số trường hợp vô sinh nam không có tinh trùng [32].

*Đột biến gen gây bệnh xơ nang CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)*

Xơ nang (*CF - cystic fibrosis*) là bệnh di truyền gen lặn trên NST thường (NST số 7). Đột biến trên gen *CFTR* dẫn đến rối loạn sản xuất protein *CFTR* chức năng gây mất chức năng của ống dẫn tinh và không có tinh trùng [33].

Đột biến gen *CFTR* gây ra bệnh xơ nang với các biểu hiện lâm sàng ở một số cơ quan bao gồm bất sản ống dẫn tinh hai bên, giãn phế quản lan tỏa, viêm tụy mãn tính, và viêm xoang mãn tính [34]. Vô sinh ở nam giới liên quan đến bệnh xơ nang là do bất sản ống dẫn tinh hai bên (CBAVD), tinh dịch của những bệnh nhân này không thấy tinh trùng. Một số nghiên cứu cho thấy hơn 70% bệnh nhân bất sản ống dẫn tinh hai bên có các triệu chứng nhẹ của bệnh xơ nang.

*Sự đứt gãy ADN tinh trùng*

Sự đứt gãy ADN tinh trùng là hiện tượng tổn thương ADN tinh trùng, có thể xảy ra ở bất cứ giai đoạn nào trong quá trình sinh tinh. Chỉ số đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng là DFI (ADN fragmentation index). Một nghiên cứu do Sheena Lewis chỉ ra rằng, thực tế, 80% số cặp vợ chồng vô sinh không rõ nguyên nhân có thể không thụ thai được vì chất lượng tinh trùng yếu kém hay đứt gãy ADN tinh trùng. Khi ADN đứt gãy tại những vị trí chứa gen liên quan đến khả năng sinh sản hay sự phát triển, làm tổ của phôi thì tỷ lệ có con rất thấp. Có 3 mức độ đứt gãy ADN tinh trùng:

- DFI < 15%: tỷ lệ đứt gãy ADN tinh trùng thấp.
- DFI 15 - 30%: tỷ lệ đứt gãy ADN tinh trùng trung bình.

- DFI > 30%: tỷ lệ đứt gãy ADN tinh trùng cao.

Theo Sheena E. và cs (2013), có 80% số cặp vợ chồng vô sinh KRNN là do chất lượng tinh trùng yếu hay đứt gãy ADN tinh trùng [35]. Utsuno H. (2013) thấy đứt gãy ADN có liên quan đến bất thường hình thái tinh trùng [36], là một trong những nguyên nhân dẫn đến chất lượng phôi kém, hỏng thai tự nhiên và làm giảm tỷ lệ thành công của hỗ trợ sinh sản.

#### *Hội chứng Kallmann*

Hội chứng Kallmann do đột biến gen *LAL - 1* nằm trên nhánh ngắn NST X bị đột biến dẫn đến sự thiếu hụt LH, FSH, gây giảm sản xuất tinh trùng, suy chức năng tuyến sinh dục, giảm sự sinh tinh tại tinh hoàn. Những bệnh nhân này biểu hiện mất khứu giác và suy sinh dục do suy hạ đồi [37].

#### *Đột biến gen liên quan đến chuyển hóa folate*

Các folate tham gia vào một nhóm co-enzymes có vai trò quan trọng trong tổng hợp ADN, tham gia phản ứng methyl hóa protein mới được tổng hợp. Folate giảm sẽ làm giảm chuyển hóa tương ứng gây tích lũy homocysteine (Hcy), làm tăng quá trình oxy hóa gây rối loạn phản ứng methyl hóa. Các quá trình này có thể gây nhiều bệnh lý trong đó có vô sinh nam. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR) và methionine synthase reductase (MTRR) là 3 enzym chính trong con đường chuyển hóa homocysteine và folate [38].

Gen *MTHFR* nằm ở nhánh ngắn NST số 1 (1p36.3), gen *MTR* nằm ở nhánh dài nhiễm sắc thể số 1 (1q43), protein MTRR xúc tác việc methyl hóa MTR. Đột biến ở các gen *MTHFR*, *MTR* và *MTRR* có thể là nguyên nhân gây rối loạn chức năng của các enzym chuyển hóa folate và gây vô sinh. Đặc biệt 4 thay đổi nucleotid được nhắc tới nhiều có liên quan đến vô sinh nam là MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MS A2756G và MTRR A66G [38], [39].

### **1.2.2. Nguyên nhân sinh hóa**

#### **• Fructose**

Fructose do túi tinh tiết ra dưới tác dụng của nội tiết tố androgen. Fructose là nguồn năng lượng chính của tinh trùng, đảm bảo sự sản sinh, phát triển, khả năng sống và di động của tinh trùng. Nồng độ fructose trong tinh dịch đánh giá chức năng hoạt động của túi tinh. Fructose giảm có liên quan với bất thường về cấu trúc, số lượng tinh trùng, chức năng túi tinh và ống dẫn tinh [40]. Ngoài ra, viêm tuyến tiền liệt cũng là một nguyên nhân làm giảm nồng độ fructose trong tinh dịch.

#### **• Kẽm**

Kẽm bình thường trong tinh dịch có nồng độ từ 3,0 - 15,0 g/l, nó có vai trò trong phát triển của tinh hoàn, tiền liệt tuyến và khả năng di động của tinh trùng. Kẽm có liên quan đến sự giãn xoắn của chất nhiễm sắc trong nhân và ổn định cấu trúc NST của tinh trùng, nó tham gia vào quá trình tổng hợp testosterone tại tế bào Leydig. Thiếu kẽm gây giảm khả năng sinh sản ở nam [41].

#### **• $\alpha$ - glucosidase**

$\alpha$ -glucosidase là một enzym trong tinh dịch, nó giảm có ý nghĩa thống kê ở những nam giới vô sinh.  $\alpha$ -glucosidase còn liên quan đến độ di động, mật độ tinh trùng và nồng độ androgen trong huyết thanh [42].

#### **• Phosphatase**

Trong tinh dịch, phosphatase có 2 dạng: phosphatase acid và phosphatase kiềm. Tăng hoạt tính của phosphatase acid liên quan chặt chẽ đến giảm mật độ tinh trùng. Những nghiên cứu mới đây trên động vật chứng minh phosphatase kiềm giảm rõ rệt khi tắc ống dẫn tinh [43].

#### **• Acid citric**

Cùng với fructose, acid citric cũng được chứng minh vai trò quan trọng trong sự di động cũng như độ tập trung của tinh trùng [44].

### **1.2.3. Nguyên nhân do nội tiết**

#### *Vùng dưới đồi*

GnRH là một peptid, tham gia quá trình sản xuất tinh trùng do tác dụng kích thích thụ trước tuyến yên tổng hợp và bài tiết 2 hormon LH và FSH.

#### *Thụ trước tuyến yên*

GH là một protein có chức năng kiểm soát quá trình phân chia của tinh nguyên bào. Ở bệnh nhân lùn tuyến yên, sự sinh sản tinh trùng giảm hoặc không có. LH là một glycoprotein có chức năng kích thích các tế bào Leydig bài tiết testosterone. FSH là một glycoprotein có chức năng kích thích sự phát triển của ống sinh tinh, kích thích tế bào Sertoli phát triển và bài tiết các chất dinh dưỡng giúp cho sự phát triển tinh trùng. FSH còn kích thích tế bào Sertoli bài tiết một protein gắn với androgen, giúp vận chuyển các androgen này vào ống sinh tinh phục vụ quá trình trưởng thành của tinh trùng.

#### *Tinh hoàn*

Testosterone là một steroid, chủ yếu do tế bào Leydig của tinh hoàn tiết ra và một phần nhỏ từ thượng thận. testosterone kích thích sự hình thành tinh nguyên bào, sự phân bào giảm nhiễm lần II từ tinh nguyên bào II thành tiền tinh trùng, sự tổng hợp protein và bài tiết dịch từ tế bào Sertoli.

Inhibin do tế bào Sertoli tiết ra là một glycoprotein. Nó điều hòa quá trình sinh tinh trùng thông qua điều khiển ngược âm tính với sự bài tiết FSH của tuyến yên.

### **1.2.4. Bệnh lý ảnh hưởng khả năng sinh sản ở nam giới**

Các bệnh lý ảnh hưởng đến chất và số lượng tinh trùng thường gặp là:

Giãn tĩnh mạch tinh (GTMT): GTMT là một trong những nguyên nhân phổ biến nhất của vô sinh nam, mặc dù GTMT vẫn xuất hiện ở các trường hợp có con hoặc tinh dịch đồ bình thường [45]. GTMT phải kèm theo tinh dịch đồ bất thường mới được coi là nguyên nhân vô sinh. Hậu quả của GTMT là làm

nhệt độ tinh hoàn cao hơn nhiệt độ bìu, mà bình thường nhiệt độ tinh hoàn thấp hơn nhiệt độ bìu  $0,5^{\circ}\text{C}$ , gây ảnh hưởng đến quá trình sản xuất tinh trùng.

Viêm tinh hoàn: Mặc các bệnh truyền qua đường tình dục, nhất là viêm mào tinh hoàn hay viêm tinh hoàn có thể dẫn đến vô sinh nam. Bị quai bị sau tuổi dậy thì gây viêm tinh hoàn hai bên khoảng 30%.

Ung thư tinh hoàn: Ung thư tinh hoàn là nguyên nhân ảnh hưởng không những tới khả năng sinh sản mà còn ảnh hưởng tới chất lượng phát triển đặc điểm giới tính nam. Ung thư tinh hoàn là một căn bệnh trong đó các tế bào trở thành ác tính ở một hoặc cả hai bên tinh hoàn.

Các bệnh toàn thân như suy gan, suy thận, bệnh tim mạch, tình trạng nhiễm trùng... cũng ảnh hưởng tới chức năng sinh sản ở nam giới.

Ngoài ra còn có thể kể tới các nguyên nhân khác như sỏi đá lệch thấp, tinh hoàn lạc chỗ, tinh hoàn không xuống bìu, kháng thể kháng tinh trùng, chấn thương tinh hoàn, tràn dịch màng tinh hoàn, hội chứng chỉ có tế bào Sertoli, vô sinh do tắc nghẽn đường sinh dục, nguyên nhân miễn dịch...

#### **1.2.5. Độ tuổi sinh sản**

Nam giới trên 45 tuổi có mức độ đứt gãy ADN tinh trùng cao hơn nhiều so với nam giới trẻ tuổi. Theo Sharon A. K. nam giới trên 50 tuổi có đến 22% giảm thể tích tinh dịch và 37% có tinh trùng giảm khả năng vận động [46].

Tuổi càng cao thì số lượng tinh trùng càng giảm, nên những người lớn tuổi thường có tình trạng thiếu tinh hơn là vô tinh. Tác động của tuổi trên khả năng sinh sản nam là đáng chú ý hơn sau tuổi 50, sự gia tăng tuổi đồng thời ảnh hưởng sức khỏe xấu ở con [47].

#### **1.2.6. Môi trường**

Tình trạng hệ sinh thái ngày càng xấu đi dẫn đến tích hợp nhiều hợp chất hóa học mới với nồng độ cao rất khó kiểm soát. Có hơn 5 triệu hóa chất mà con người thường xuyên tiếp xúc như các chất ô nhiễm không khí, thuốc trừ sâu, dược phẩm, mỹ phẩm, phụ gia thực phẩm...

Các chất độc hại có ảnh hưởng đến tuyến sinh dục cần phải nhắc đến là các kim loại nặng (chì...), khói thuốc lá, ethylen dibromid, polychlorinat biphenyls. Ví dụ, chì gây độc trực tiếp đến biểu mô tinh, ức chế sự sinh sản và di chuyển của tinh trùng [48], nhiễm độc chì có thể gây xơ hóa đường dẫn tinh, tạo các không bào và gây thiếu tinh [49]. Tại Mỹ, một nghiên cứu tiến hành trên 140 cặp vợ chồng làm thụ tinh trong ống nghiệm cho thấy hàm lượng chì trong tinh dịch càng cao thì cơ hội mang thai càng thấp.

Chromium và các hợp chất của nó có tác động làm rối loạn quá trình trưởng thành và làm giảm số lượng, độ di động của tinh trùng [50]. Ethylene dibromide được sử dụng trong sản xuất xăng, có tác động trực tiếp đến tinh hoàn và sau tinh hoàn, làm giảm mật độ tinh trùng, giảm khả năng vận động của tinh trùng và thể tích tinh dịch [51]. Polychlorinated biphenyls được sử dụng rất phổ biến trong công nghiệp, chúng có tác động làm tổn thương màng tế bào và các enzym thuộc bộ máy tinh hoàn, dẫn đến làm giảm kích thước tinh hoàn và rối loạn quá trình sinh tinh [52].

Một trong những yếu tố môi trường có ảnh hưởng đến tuyến sinh dục là khói thuốc lá. Nó làm giảm sự sinh tinh, độ di động và hình thái của tinh trùng. Theo Arabi [53], nicotine là một prooxidant có khả năng oxy hóa mạnh đến màng sinh học của tinh trùng, làm rối loạn sự trao đổi chất của glutathione và thay đổi hình thái và khả năng di động của tinh trùng.

Các nghiên cứu ở động vật đã chỉ ra nicotine, khói thuốc lá và các hợp chất hydrocarbon thơm (PAH) có thể gây teo tinh hoàn, giảm tinh trùng có hình thái bình thường, giảm sinh tinh gây oligospermia và teratozoospermia. Thuốc lá gây phân mảnh ADN của tinh trùng và tế bào phôi thông qua sự cảm ứng của stress oxy hóa. Thuốc lá gây giảm hoạt động các enzym chống oxy hóa GPX1, GPX4 và GSR, xuất hiện stress oxy hóa [54]. PAHs ở khói thuốc lá có khả năng kích hoạt thụ thể aryl hydrocarbon (AHR) làm tăng sự chết tế bào theo chương trình của tế bào mầm tinh hoàn và tế bào tinh trùng [55].

- **Dược phẩm:** Một số dược phẩm cũng có ảnh hưởng đến khả năng sinh sản nam giới do chúng làm rối loạn các hormon cân bằng nội mô [56]. Các tác nhân gây rối loạn nội tiết như hormon nội sinh có ảnh hưởng đến các cơ quan sinh sản nam. Các nội tiết disruptor phổ biến nhất là khói thuốc lá, cùng với tác động gonadotoxic ảnh hưởng đến sinh sản nam do gây rối loạn điều hòa nội tiết. Những người hút thuốc lá, prolactin huyết thanh và estradiol E2 tăng dẫn đến đình trệ quá trình sinh tinh [57]. Thuốc lá làm tăng norepinephrine huyết thanh, do đó làm tăng aromatization của testosterone E2 trong các tế bào Sertoli in vitro.

- **Rượu** là một chất gây rối loạn nội tiết. Nghiện rượu mạn tính gây rối loạn cương dương, giảm ham muốn tình dục và gây vú to ở nam giới [58]. Rượu làm tăng nồng độ FSH, LH và E2 và giảm nồng độ testosterone do giảm sản xuất testosterone ở tinh hoàn và tăng sự trao đổi chất của chúng trong gan. Thể tích tinh dịch, số lượng và độ di động của tinh trùng, tỷ lệ tinh trùng có hình thái bình thường giảm đáng kể đối với người nam nghiện rượu mạn tính [59]. Tăng estradiol huyết thanh do aromatization của testosterone E2 trong gan và trong các tế bào mỡ ngoại vi đồng thời làm giảm testosterone [60].

- **Với các chất độc công nghiệp:** Gần đây đã có các nghiên cứu về sự ảnh hưởng của các hóa chất công nghiệp đối với hệ thống sinh sản nam [61]. Đặc biệt, sự thay thế freon thành 2-bromopropane nếu diễn ra ở nam giới sẽ làm tăng gonadotropins, giảm sự vận động của tinh trùng và làm rối loạn quá trình sinh tinh dẫn đến oligospermia và azospermia [62]. Carbon disulfide dùng trong sản xuất sợi tổng hợp có tác động gây giảm nhu cầu tình dục, rối loạn chức năng cương dương và làm giảm khả năng sinh tinh [63]. Glycol ete (2-ethoxyethanol, 2-methoxyethanol) khi thí nghiệm ở động vật thì nó gây rối loạn ở tinh hoàn. Tiếp xúc với dung môi trinitrotoluen có thể dẫn đến những rối loạn đáng kể chức năng tình dục (liệt dương, giảm ham muốn tình dục...), làm giảm nồng độ của nguyên tố vi lượng trong tinh dịch (Cu, Zn, Se), làm mất khả năng vận động và gây bất thường hình thái của tinh trùng [64].



- **Thuốc trừ sâu:** nam giới khi nhiễm thuốc trừ sâu có thể bị rối loạn điều hòa nội tiết sinh sản. DDT có thể tạo ra hoạt tính giống estrogen. DDE - metabolit DDT có hoạt tính kháng androgen và làm rối loạn các quá trình chuyển hóa, thải trừ của estradiol [65], đồng thời ức chế chức năng biểu mô ống sinh tinh. Dibromohlorpropan có tính kháng androgen, làm tổn thương biểu bì phôi và rối loạn sự biệt hóa giới tính phụ thuộc androgen [66]. Thuốc trừ sâu linurol có hoạt tính kháng androgen, nó kích thích sản xuất hormone tuyến yên và tăng LH [67]. Thuốc diệt nấm Vinclozolin có hoạt tính kháng androgen, làm gián đoạn sự liên kết của androgen và thụ thể androgen [68]. Lindane làm tổn thương biểu bì phôi, tinh tử và các tế bào Sertoli. Endosulfan là các xenoestrogen làm tăng mức độ prolactin [69].

- **Dioxin** được coi là tác nhân nhân tạo độc hại nhất. Nó có hoạt tính kháng androgen và kháng estrogen làm giảm ham muốn tình dục, rối loạn các phản ứng của tinh hoàn dưới sự tác động của LH và FSH [70].

- **Polychlorinated biphenyls** là một nhóm chất độc công nghiệp có khả năng phá vỡ các tương tác nội tiết là polychlorinated biphenyls. Chúng làm thay đổi nồng độ estrogen, nồng độ androgen, các hormone của tuyến giáp, tuyến yên, corticosteroid và một số hormone khác. Các chất chuyển hóa của polychlorinated biphenyls có hoạt tính giống estrogen và kháng estrogen [71]. Nồng độ polychlorinated biphenyls trong máu tỷ lệ nghịch với độ di động và số lượng của tinh trùng [72]. Ở động vật thí nghiệm dưới tác động của polychlorinated biphenyls thể tích tinh hoàn, số lượng tinh trùng, estradiol huyết thanh và testosterone trong máu đều giảm [73].

- **Phthalate ete** là chất độc công nghiệp dùng trong sản xuất nhựa, bao bì, ô tô và công nghiệp y tế. Các con đường Phthalate ete vào cơ thể người là xâm nhập qua thực phẩm và phơi nhiễm nghề nghiệp trong sản xuất. Phthalate ete gây teo tinh hoàn, làm chậm sinh tinh, ức chế steroid trong các tế bào Leydig bởi tính kháng androgen [74].

Một số dược phẩm cũng có thể gây rối loạn khả năng sinh sản. Cần sa làm rối loạn sự sinh tinh, giảm thể tích tinh dịch, độ di động của tinh trùng, giảm số lượng tinh trùng có hình thái bình thường [57]. Các dẫn xuất của thuốc phiện làm giảm ham muốn tình dục, rối loạn cương dương, ức chế hoạt động của LH-RH và LH, giảm sản xuất testosterone. Liều cao của cocaine và amphetamine gây giảm ham muốn tình dục và rối loạn cương dương. Người uống thuốc hạ huyết áp có nguy cơ giảm ham muốn tình dục, rối loạn cương dương [52]. Thuốc lợi tiểu thiazide, propranolol, thuốc chẹn tim chọn lọc - atenolol, metoprolol, các chất ức chế ACE Spironolactone làm giảm khả năng sinh sản do nó gắn vào các thụ thể và ức chế sản xuất dihydrotestosterone, testosterone, gây giảm ham muốn tình dục, rối loạn cương dương và giảm sản xuất tinh trùng [52]. Ion  $Ca^{2+}$  là thành phần thiết yếu của phản ứng acrosomal, do đó chẹn kênh  $Ca^{2+}$  là yếu tố nguy cơ tiềm ẩn đối với các rối loạn về sinh tinh [75].

Thuốc trị ung thư gây tổn hại tế bào mầm và tế bào Sertoli, gây oligospermia. Phản ứng với các thuốc gây rối loạn chức năng của tế bào Leydig làm tăng LH, giảm testosterone. Tác dụng gonadotoxic của thuốc có nhân alkyl, antimetabolites (cytarabine), alkaloids (vinblastine), (cisplatin, procarbazine, mechlorethamine) [57]. Dùng lâu dài liều thấp cyclophosphamide ở nam giới làm rối loạn quá trình giãn xoắn ADN của tinh trùng do alkyl hóa của ADN hay protein nhân. Điều trị phối hợp các tác nhân alkyl hóa cho thấy có sự cải thiện khả năng sống trong điều trị bệnh như Hodgkin, lymphoma, bệnh bạch cầu. Tuy nhiên, liệu pháp này đã gây vô sinh ở nam giới, gây bất sản các tế bào mầm [76].

Một số thuốc kháng sinh cũng có thể làm giảm khả năng sinh sản. Nitrofurantoin liều cao ức chế sự trưởng thành của tinh trùng trong tinh hoàn. Erythromycin, một số macrolide, tetracycline làm giảm mật độ tinh trùng và khả năng di động bằng cách ức chế sự trưởng thành tinh trùng [77].

### 1.3. Xenobiotics và quá trình chuyển hóa xenobiotics trong cơ thể

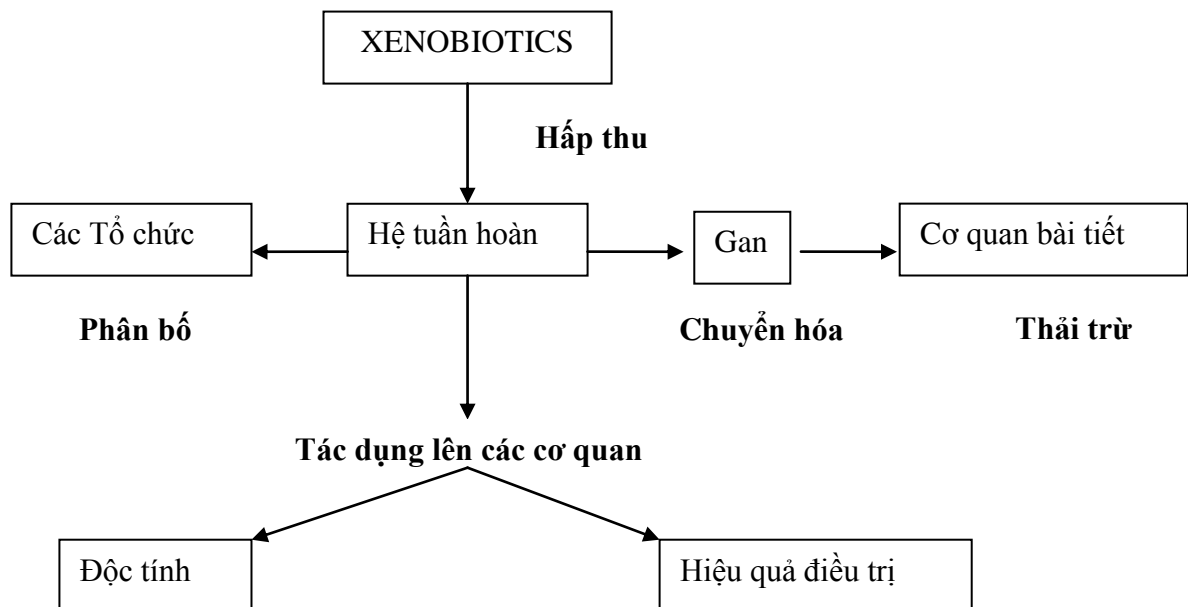
#### 1.3.1. Khái niệm xenobiotics

Xenobiotics là những hợp chất hóa học không do sinh vật tạo ra, khi vào cơ thể nếu không được chuyển hóa và thải trừ sẽ gây rối loạn các quá trình sinh lý, sinh hóa của cơ thể và gây ra các bệnh lý.

Các xenobiotics khi vào trong cơ thể nó tạo ra gốc tự do (free radical) trong đó có các gốc oxy hoạt động chúng gây oxy hóa phân tử trong đó có ADN từ đó gây biến đổi và gây bệnh cho cơ thể. Một số trường hợp khi ADN bị oxy hóa và bị biến đổi có thể gây vô sinh ở nam giới.

#### 1.3.2. Chuyển hoá Xenobiotics

##### - Quá trình biến đổi chung của xenobiotics



**Hình 1.1: Quá trình biến đổi của Xenobiotics trong cơ thể**

Quá trình hấp thu phụ thuộc vào cấu trúc của tổ chức, pH môi trường nơi xenobiotics xâm nhập và phụ thuộc cấu tạo của xenobiotics... Cơ chế hấp thu chủ yếu xenobiotics là vận chuyển theo gradient nồng độ, đi từ nơi có nồng độ cao đến nơi có nồng độ thấp.

Đối với thuốc: Khả năng hấp thu được đặc trưng bởi đại lượng sinh khả dụng: đó là tỷ lệ thuốc xâm nhập hệ tuần hoàn so với lượng đưa vào.

### - Phân bố

Sau khi vào cơ thể, xenobiotics được phân bố ở các tổ chức tùy thuộc tính chất hóa học, tính tan của mỗi chất. Các chất ít tan trong nước, ưa lipid như chloroform, hexobarbital sẽ phân bố nhiều vào mô mỡ và các cơ quan nhiều lipid như tổ chức thần kinh.

Trong huyết tương, một phần xenobiotics gắn với protein huyết tương (chủ yếu là với albumin). Đặc điểm của sự gắn xenobiotics với protein là:

+ Chất nào càng ít tan trong nước thì gắn với protein huyết tương càng nhiều.

+ Có sự cân bằng động giữa phần tự do và phần gắn với protein

Xenobiotics (X) + Protein huyết tương  $\leftrightarrow$  Xenobiotics-protein

Dạng tự do là dạng hoạt động (sẽ có tác dụng hoặc độc tính).

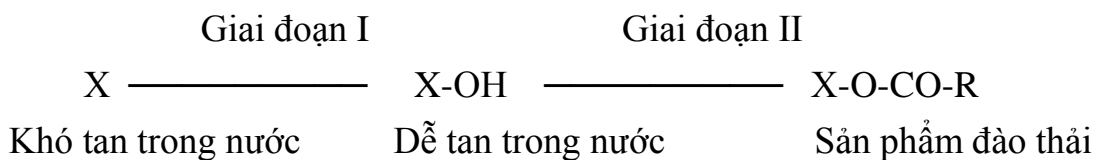
+ Có sự cạnh tranh giữa các xenobiotics khi gắn với protein: ví dụ Tolbutamid - Phenybutazon.

+ Khả năng gắn của các xenobiotics là có giới hạn và phụ thuộc hàm lượng protein huyết tương.

### - Chuyển hóa

Xenobiotics được chuyển hóa chủ yếu ở gan và đào thải chủ yếu là qua nước tiểu. Đa số các xenobiotics ít tan trong nước, vì vậy quá trình chuyển hóa nói chung nhằm tạo ra các dẫn xuất dễ tan trong nước, thường làm mất hoặc giảm độc tính rồi thải ra ngoài.

Quá trình chuyển hóa thường gồm 2 giai đoạn (phase):



+ **Giai đoạn I:**

Gồm các phản ứng oxy hóa, phản ứng khử, thủy phân... nhằm tạo ra các nhóm chức hoạt động như -OH; =O; -SH; -NH<sub>2</sub> để dễ liên hợp. Trong giai

đoạn này có vai trò quan trọng của Cytochrom P<sub>450</sub>. Qua các phản ứng, tác dụng của xenobiotics có thể mất, giảm hoặc tăng lên.

Giai đoạn I có các phản ứng oxy hóa được thực hiện nhờ các hệ thống enzym, quan trọng nhất là hệ thống cytochrom P450. Đây là hệ thống enzym có khả năng gắn một nguyên tử oxy vào nhiều loại chất hóa học khác nhau, biến chất không tan trong nước, chất độc thành chất tan trong nước và ít độc hơn. Cytochrom P450 gồm ba cấu tử: cytochrom P450 reductase, cytochrom P450 và phospholipid. Đây là một hệ thống enzym đặc hiệu cơ chất rộng, có nhiều dạng phân tử (isoenzym) (khoảng 150 dạng khác nhau). Có thể nói cytochrom P450 là một chất xúc tác sinh học đa năng nhất được biết đến cho đến nay. Cytochrom P450 được coi là một họ gen với những protein chứa hem, xúc tác sự chuyển hóa nhiều chất ngoại sinh (xenobiotics) và nhiều chất nội sinh có đặc tính ưa lipid. Ở giai đoạn chuyển hóa này các enzym thuộc hệ thống CYP450 có: *CYP1A1*, 2E1, 2D6...

+ ***Giai đoạn II:***

Gồm các phản ứng liên hợp với glucuronic, sulfuric, acetic, glutathion để tạo thành các sản phẩm mất độc tính, dễ dàng đào thải.

Giai đoạn II của quá trình giải độc các chất chuyển hóa trung gian, các phân tử nội sinh được chuyển hóa hình thành các hợp chất phân cực và được bài tiết theo cơ chế chuyên biệt. Enzym ở giai đoạn II bao gồm: arylamine acetyltransferase, methyltransferase, sulfotransferase, glutathione transferase-B, UDP-glucuronosyltransferase và nhiều loại khác. Biến đổi hóa học của xenobiotics ưa chất béo do các enzym trong giai đoạn II làm tăng tính thấm góp phần đào thải nhanh chóng chúng qua thận và gan. Giống như enzym giai đoạn I, các enzym giai đoạn II có cơ chất đặc hiệu yếu và tham gia vào chuyển hóa của nhiều chất. Nhiều tác giả còn đề xuất đến giai đoạn III là giai đoạn hệ thống vận chuyển đã kích hoạt của các dẫn xuất có nhiệm vụ đảm bảo bài tiết các sản phẩm giải độc qua phổi, thận và đường tiêu hóa [78]. Cơ chế bài tiết xenobiotics được thực hiện nhờ họ P-glycoprotein vận chuyển màng.

## - Thái trừ

Con đường thải trừ xenobiotics chủ yếu của cơ thể là qua nước tiểu, còn lại một phần qua phân, mồ hôi, hơi thở...

Đa số các xenobiotics sau khi được chuyển thành các dẫn xuất tan trong nước và đào thải ra nước tiểu. Một số chất có phân tử lượng lớn, ít tan trong nước, được gan đào thải qua mật, xuống ruột rồi ra ngoài theo phân.

Sự thải trừ được đặc trưng bởi đại lượng “thời gian bán thải” ( $T_{1/2}$ ) là thời gian để thải một nửa lượng chất so với ban đầu.

Mức độ thải trừ phụ thuộc nhiều vào chức năng thận. Khi thận suy làm giảm thải trừ, tăng độc tính.

### 1.3.3. Thành phần phức hợp enzym chuyển hóa xenobiotics

#### 1.3.3.1. Enzym chuyển hóa

Trong cơ thể có hệ thống enzym chuyển hóa các chất glucid, lipid, protid và hệ thống enzym chuyển hóa xenobiotics. Enzym chuyển hóa xenobiotics chỉ tác dụng đến cơ chất tan trong lipid vì chúng có màng lipid bao quanh.

**Bảng 1.2: Đặc tính của enzym chuyển hóa**

Đặc tính	Enzym-normal	Enzym-xenobiotics
Cơ chất	Quen	Lạ
Tính đặc hiệu	Cao	Thấp
Số lượng	Nhiều	Ít
Tính cảm ứng	Không rõ	Rất rõ, quan trọng
Khu trú	Rộng	Microsome
Vỏ phospholipid	Không cần thiết	Cần thiết
Điều kiện tổ hợp	Không bắt buộc	Bắt buộc
Vai trò chính	Chuyển hóa các chất, cung cấp năng lượng	Khử độc

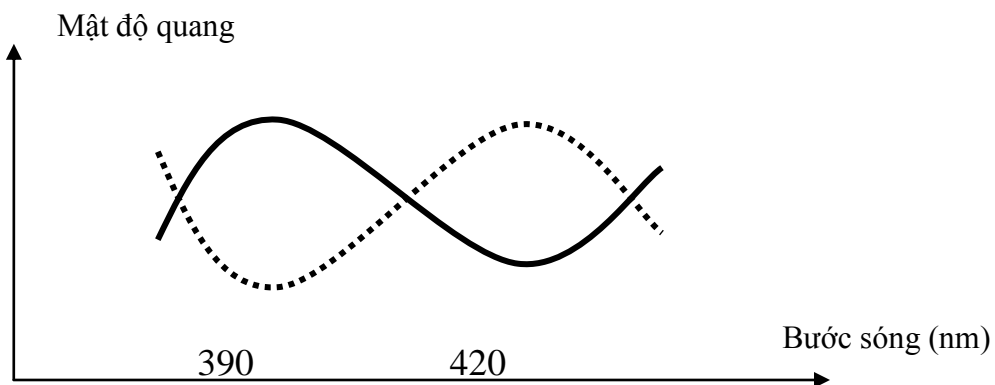
Enzym chuyển hóa xenobiotics tập hợp thành hệ thống có chức năng oxydase ở microsome (Microsomal Mixed Function Oxydase - MMFO). Phức hợp này có vỏ phospholipid do đa số các xenobiotics ít tan trong nước, ưa lipid.

Trong phức hợp enzym chuyển hóa xenobiotics có nhiều enzym khác nhau, có thể chia thành 3 loại:

- Cytochrom P<sub>450</sub>, quan trọng nhất.
- Các enzym có coenzym là NADPH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub>.
- Cytochrom B<sub>5</sub>

**\* Cytochrom P<sub>450</sub>**

Đặc tính về quang phổ:



**Hình 1.2. Hình ảnh quang phổ của Cytochrom P<sub>450</sub>**

Cytochrom P<sub>450</sub> có đỉnh hấp thụ cực đại ở 450 nm khi gắn với CO. Khi gắn với xenobiotics, cytochrome P<sub>450</sub> có 2 dạng phổ:

- Dạng 1: gắn hexobarbital, có đỉnh hấp thụ cực đại ở 390nm và cực tiểu ở 420nm.
- Dạng 2: gắn anilin, ngược lại, có đỉnh hấp thụ cực tiểu ở 390nm, cực đại ở 420nm.

Như vậy, Cytochrom P<sub>450</sub> có 2 trung tâm hoạt động, có vai trò chủ chốt trong chuyển hóa các xenobiotics ở giai đoạn I. Các phản ứng chủ yếu là oxy hóa, trong đó hydroxyl hóa (gắn gốc -OH) là quan trọng nhất.

\* **Các enzym có coenzym là NADPH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub>:**

Các enzym này thường cấu tạo là 1 flavoprotein, có trọng lượng phân tử 79000 - 761000 kDa. Chúng hỗ trợ Cytochrom trong phản ứng oxi hóa, vận chuyển điện tử từ NADPH đến Cyt.P<sub>450</sub>. Việc vận chuyển điện tử ở gan là trực tiếp, còn ở thượng thận cần thêm 1 protein trung gian chứa Fe và S.

\* **Cytochrom B<sub>5</sub>:**

Cytochrom B<sub>5</sub> có cấu tạo là một hemoprotein, không trực tiếp tham gia các phản ứng chuyển hóa mà gián tiếp bổ sung cho chuyển hóa xenobiotics. Cytochrom B<sub>5</sub> đóng vai trò như là 1 chất cạnh tranh hoặc gây hiệu ứng Cyt P<sub>450</sub>-reductase để điều hòa chuyển hóa xenobiotics.

1.3.3.2. *Chu trình phản ứng của cytochrom P<sub>450</sub> trong MMFO*

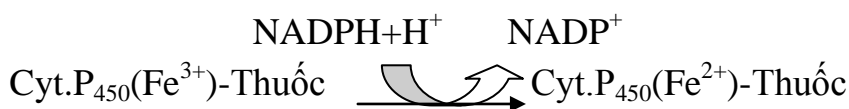
Mục đích của quá trình chuyển hóa qua Cyt.P<sub>450</sub> là chuyển các xenobiotics (X) khó tan trong nước thành các dẫn xuất có cực, dễ tan trong nước. Quá trình này chủ yếu là hydroxyl hóa, gắn gốc -OH để tạo thành X-OH.

Cytochrom P<sub>450</sub> ban đầu có chứa Fe<sup>3+</sup>. Các phản ứng cụ thể như sau:

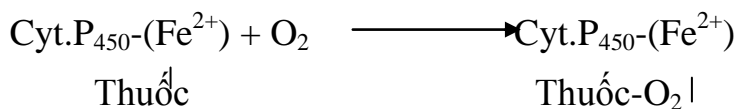
1- Gắn cơ chất với Cyt.P<sub>450</sub>:



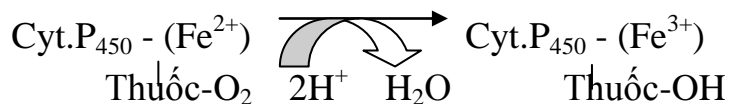
2. Khử lần 1:



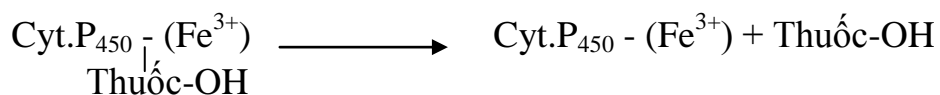
3. Gắn oxygen tạo phức:



4. Khử lần 2: tạo dẫn xuất hydroxyl (-OH) của phức Cyt.P<sub>450</sub>-(Fe<sup>2+</sup>):

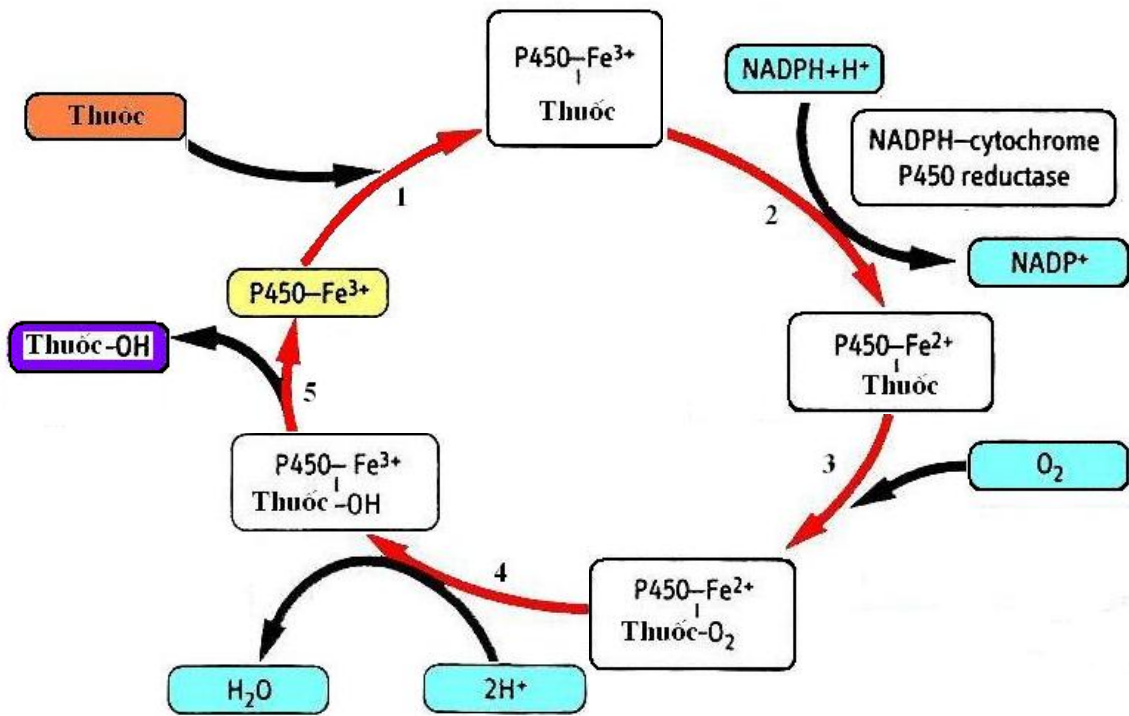


5. Giải phóng *Thuốc-OH* và tạo lại Cyt.P<sub>450</sub>:





Các xenobiotics chuyển hoá đều tạo ra các dạng ROS như  $O_2^{\cdot-}$ ,  $^1O_2$  có độc tính rất cao, gây biến đổi gen và gây hoại tử. Việc ô nhiễm môi trường có thể gây ra các bệnh tật như ung thư gan, phổi, da... và các bệnh viêm nhiễm khác. Nó xuất phát từ sự dư thừa quá mức của các gốc tự do trong cơ thể.



**Hình 1.3. Chu trình phản ứng của Cyt.P<sub>450</sub> trong chuyển hóa thuốc [79]**

Nhiều bằng chứng đã chỉ ra các hợp chất nitro hữu cơ là các tác nhân gây đột biến, gây ung thư. Khi xâm nhập vào cơ thể các nitro hữu cơ bị các cytocrom P<sub>450</sub>, nitroreductaza khử thành gốc  $RNO_2^{\cdot-}$  trước khi chuyển thành các amin. Các amin gốc nitro lại nhường điện tử cho oxy, tạo ra gốc  $O_2^{\cdot-}$ . Các hydrocacbua đa vòng, các nitroxide... và rất nhiều chất gây đột biến, gây ung thư khi chuyển hoá đều làm tăng các gốc tự do của oxy.

Các gốc tự do hay nói chính xác hơn là các chất hoạt động chứa oxy và nitơ (Reactive Oxygen Speices - ROS và Reactive Nitrogen Species - RNS) là các dẫn xuất dạng khử của oxy và nitơ phân tử. Chúng được chia thành hai nhóm lớn là các gốc tự do và các dẫn xuất không phải gốc tự do. Các gốc tự do là các phân tử hoặc nguyên tử có một hoặc nhiều điện tử độc thân. Các

*dẫn xuất không phải gốc tự do* như oxi đơn, hydroperoxide, nitroperoxide là tiền chất của các gốc tự do.

Gốc tự do được hình thành theo 3 con đường: từ chuỗi hô hấp tế bào trong ty thể, từ quá trình peroxid hóa lipid và từ các phản ứng tạo gốc khác trong cơ thể.

Các ROS và RNS được tạo ra một cách tất yếu trong quá trình trao đổi chất và tùy thuộc vào nồng độ mà chúng có tác động tốt hoặc xấu đến cơ thể. Ở nồng độ thấp, các ROS và RNS là các tín hiệu làm nhiệm vụ (1) điều hòa sự chết theo chương trình (apoptosis); (2) kích hoạt các yếu tố phiên mã (NFkB, p38 - MAP kinase...) cho các gen tham gia quá trình miễn dịch, kháng viêm; (3) điều hòa biểu hiện các gen mã hóa cho các enzym chống oxy hóa. Tuy nhiên, ở nồng độ cao, các ROS và RNS oxy hóa các đại phân tử sinh học gây nên: (1) biến đổi ở ADN; (2) biến tính protein; (3) oxy hóa lipid.

Sự phá hủy các đại phân tử do ROS và RNS là nguyên nhân của rất nhiều bệnh. Sự oxy hóa các Low Density Lipoprotein (LDL) dẫn đến hình thành mảng xơ vữa trên thành mạch máu. Các ROS và RNS tấn công phospholipide màng tế bào làm thay đổi tính mềm dẻo của màng, thay đổi chức năng của nhiều thụ thể trên màng, ảnh hưởng đến tính thấm của màng và việc trao đổi thông tin giữa tế bào và môi trường. Sự oxy hóa các ADN bởi các ROS và RNS gây đột biến là một trong những nguyên nhân phát sinh ung thư. Nhiều enzym và protein vận chuyển cũng bị oxy hóa và bất hoạt bởi các ROS và RNS. Các ROS và RNS góp phần gây các bệnh suy giảm thần kinh như Alzheimer, trong đó gắn liền với chết theo chương trình quá mức gây nên bởi các ROS và RNS.

ROS có thể có những tác động có lợi hoặc gây bất lợi đến chức năng của tinh trùng phụ thuộc vào tính chất và nồng độ của ROS cũng như vị trí và thời gian tiếp xúc ROS.

ROS được tìm thấy trong máu từ các nguồn nội sinh và ngoại sinh. Sự xuất tinh con người gồm nhiều loại tế bào khác nhau, bao gồm các tế bào

trưởng thành và chưa trưởng thành, các tế bào xung quanh từ các giai đoạn khác nhau của tinh trùng, bạch cầu và tế bào biểu mô.

Phần lớn các mẫu tinh dịch chứa bạch cầu và bạch cầu đa nhân trung tính là chủ yếu [32]. Trong điều kiện sinh lý, tinh trùng sản xuất một lượng nhỏ ROS giúp tinh trùng có khả năng thụ tinh noãn cần thiết. Các superoxide anion đóng vai trò quan trọng trong quá trình này. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng các tế bào mầm ở các giai đoạn khác nhau đều có khả năng sinh ra ROS.

Ở nam giới khỏe mạnh, ADN tinh trùng được bảo vệ bởi hai cơ chế chính: (1) ADN được đóng gói chặt chẽ và đóng gói vào chromatin sao cho vật liệu di truyền ít bị tấn công bởi ROS; (2) chất chống oxy hóa tự nhiên trong huyết tương và tinh trùng giúp giảm thiểu sản xuất ROS đến mức bình thường.

Tuy nhiên, trong các điều kiện bệnh lý, đặc biệt là khi có sự biến đổi các gen mã hóa enzym chuyển hóa xenobiotics dẫn đến việc sản xuất ra ROS một cách mất kiểm soát phá vỡ sự cân bằng phức tạp và dẫn tới stress oxy hóa (OS). ROS thường tồn tại dưới các dạng gốc tự do như: ion hydroxyl, superoxide, hydrogen peroxide, peroxy radical và hypochlorite ion.

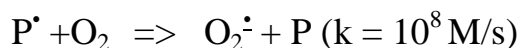
Tinh trùng đặc biệt nhạy cảm với những tổn thương gây ra bởi sự tăng quá mức ROS bởi vì màng tế bào và tế bào chất có chứa một lượng lớn acid béo không bão hòa. Hydrogen peroxide là nhà sản xuất ROS chính ở người. Nồng độ cao của hydrogen peroxide không ảnh hưởng đến khả năng sống sót của tinh trùng nhưng ảnh hưởng đến khả năng di chuyển, chủ yếu qua sự cạn kiệt ATP và sự giảm phosphoryl của sợi trục. Nồng độ cao của hydrogen peroxide gây ra sự oxy hóa lipid và gây chết tế bào. Hơn nữa, ROS quá nhiều làm mất đi tính toàn vẹn của ADN trong tinh trùng, cơ chế là do các tổn thương oxy hóa dẫn đến sự thay đổi cơ bản, phá vỡ sợi và liên kết chromatin. Đã có bằng chứng về sự đứt gãy ADN trong tinh trùng của nam giới vô sinh có ROS cao.

Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy rằng OS làm suy yếu chức năng của tinh trùng và đóng một vai trò quan trọng trong bệnh học về sự khiếm khuyết của tinh trùng. Điều này có thể dẫn tới việc vô sinh ở nam giới thông qua cơ chế liên quan đến việc gây ra tổn thương màng tế bào.

Các tác nhân gây viêm, hoại tử gan: Các hợp chất halogen hữu cơ, điển hình là  $\text{CCl}_4$  là chất gây viêm hoại tử gan, khi vào gan được chuyển hoá thành photgen và chính các dạng trung gian đã làm tăng quá trình peroxy hoá lipid (POL) gây tổn thương phá vỡ màng tế bào, gây viêm hoại tử gan.

Các chất gây thiếu máu huyết tán như diazonaphtol, diphenylhydrazin... phản ứng với oxyhemoglobin tạo ra methemoglobin và gốc phenyl hydrazin, gốc này nhường điện tử cho oxy tạo ra  $\text{O}_2^{\cdot -}$

Các thuốc trừ sâu diệt cỏ: Wofatox, paraquat... là chất gây đột biến, gây ung thư, ví dụ như paraquat bị enzym flavin khử thành các gốc bền ( $\text{P}^{\cdot}$ ). Gốc này có thể nhường điện tử cho oxy tạo ra anion superoxid và có tác dụng độc, vì vậy tác dụng diệt cỏ trừ sâu của paraquat chỉ thể hiện khi có mặt của oxy.



Trong điều kiện bình thường, các gốc tự do luôn luôn có sự sản sinh trong cơ thể. Các gốc tự do nội sinh cũng rất cần thiết cho quá trình tổng hợp cũng như phân huỷ các chất trong chu trình chuyển hoá của tế bào. Do gốc tự do có hoạt tính sinh học rất mạnh, nên nếu tăng quá mức sẽ gây ra những tổn thương tế bào làm phát sinh nhiều bệnh lý phức tạp. Chính vì thế mà trong cơ thể hình thành hệ thống chất chống oxy hoá (antioxidant) có vai trò khử các chất oxy hoá và gốc tự do gây độc đến tế bào.

Hệ thống đó gồm các enzym và các chất chống oxy hoá không có bản chất enzym nhằm bảo vệ cơ thể khỏi sự tấn công của các gốc tự do. Tất cả các nguyên nhân làm cho gốc tự do sinh ra ồ ạt, dẫn đến hệ thống bảo vệ không “thu dọn” hết, tất yếu phát sinh các rối loạn và tổn thương bệnh lý như rối loạn cấu trúc màng tế bào, giảm hoạt động enzym gắn với màng làm thay đổi cấu trúc receptor bề mặt tế bào, biến đổi các cấu trúc acid nucleic, protein, bất

hoạt các enzym như: dehydrogenase, polymerase, adenylcyclase. Do đó gốc tự do có liên quan mật thiết và có tính nhân quả với nhiều quá trình bệnh lý làm thoái hoá toàn cơ thể.

Việc sử dụng các chất chống oxy hoá như: vitamin E, vitamin C,  $\beta$ -caroten, selen, sâm ngọc linh... trong điều trị cũng như dự phòng, có tác dụng nâng cao chất lượng cuộc sống, chống lão hoá, kéo dài thời gian sống khoẻ mạnh và không bệnh tật.

#### **1.4. Biến đổi gen chuyển hóa sinh học xenobiotics**

Những chất dị sinh (xenobiotics) là những chất ít nhiều có hại cho con người và không có trong các sinh vật, hay gặp nhất là thuốc dùng trong điều trị. Những chất này khi vào cơ thể cần được chuyển hóa thành chất dễ được đào thải và ít hoặc không độc hại. Biến đổi gen chuyển hóa xenobiotics gây các bất thường ở mức phân tử nhưng chưa được nghiên cứu nhiều. Nhiều trường hợp vô sinh còn chưa rõ nguyên nhân được một số tác giả cho là do các yếu tố môi trường, trong đó xenobiotics chiếm phần lớn các yếu tố môi trường gây nên [80]. Sau khi vào cơ thể, xenobiotics được phân bố ở các tổ chức tùy thuộc vào tính chất hóa học, tính tan của mỗi chất. Xenobiotics là các chất ưa lipid, chúng sẽ dễ dàng tích lũy trong các tế bào và mô có nhiều lipid. Nếu việc khử các xenobiotics không tốt có thể dẫn đến ung thư hoặc giảm khả năng sinh sản. Như vậy, sự thay đổi hoạt tính của các enzym chuyển hóa xenobiotics có thể liên quan đến khả năng sinh sản ở nam giới và ung thư.

Hiện nay, người ta đã biết có một số lượng lớn các gen và họ gen có vai trò kiểm soát quá trình sinh tổng hợp protein enzym, kiểm soát sự tổng hợp enzym có trách nhiệm phản ứng (trung hòa) với các xenobiotics [81], [82]. Các enzym giải độc xác định phản ứng chuyên biệt với một loạt các chất độc hại, thuốc, tùy thuộc vào đặc điểm xác định về mặt di truyền của các chất chuyển hóa xenobiotics, tương tác với các thụ thể và hệ thống enzym của chúng [83]. Phụ thuộc vào các tính năng chuyên biệt của các kiểu gen khác nhau có thể giữ được tính kháng, hoặc ngược lại, làm tăng độ nhạy cảm để phát hiện tác nhân

hóa học độc hại. Hầu hết các xenobiotics, khi xâm nhập vào trong cơ thể, không có tác dụng sinh học trực tiếp, mà phải trải qua quá trình chuyển hóa và được giải phóng dưới dạng các sản phẩm chuyển hóa. Việc chuyển hóa sinh học phần lớn là chuyển hóa nhờ các chất béo tan trong nước dưới sự xúc tác của enzym thành các chất chuyển hóa phân cực tan trong nước - đây là một hình thức đơn giản để loại bỏ chúng khỏi cơ thể, đồng thời giảm thời gian tác dụng độc hại của chúng đến các cơ quan và các mô [83]. Tính cảm ứng đối với enzym chuyển hóa xenobiotics rất rõ và rất quan trọng: chuyển hóa của 1 chất rất dễ bị ảnh hưởng bởi các chất khác. Một số chất có thể gây cảm ứng enzym chuyển hóa chất khác; ngược lại, cũng có một số chất gây ức chế enzym chuyển hóa chất khác (giảm chuyển hóa). Trong trường hợp điển hình nhất của hệ thống trung hòa hóa chất lạ gồm ba giai đoạn là kích hoạt (Giai đoạn I), giải độc (giai đoạn II) và loại bỏ (giai đoạn III).

Giai đoạn I của chuyển hóa là quá trình oxy hóa khử hay thủy phân các phân tử chất độc hại chứa nhiều nhóm phân cực, một mặt, làm cho chúng dễ tan trong nước, trở thành các chất dễ phản ứng với các chất khác và ít độc hại hơn. Các enzym ở giai đoạn I của chuyển hóa xenobiotics bao gồm họ monooxygenase cytochrome P450 (CYP1, CYP3), monooxygenase chứa flavin, alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, peroxidase, flavoproteinreductase, epoxide, esterase và amidases. Một loạt các enzym chuyển hóa và các cơ chất có tính đặc hiệu yếu của chúng cho phép cơ thể chuyển hóa các chất cấu trúc hóa học khác nhau. Việc chuyển hóa các xenobiotics trong giai đoạn I làm tăng tính phân cực của chúng, đồng thời làm giảm khả năng hòa tan trong các lipid (tăng độ tan trong nước). Vì thế mà một số hợp chất lạ khác được bài tiết cùng nước tiểu tốt hơn [83]. Hiệu quả của quá trình chuyển hóa xenobiotics sẽ cao hơn nữa khi trong giai đoạn I hình thành sản phẩm trao đổi chất gắn kết với các chất nội sinh như acetate, sulfate, acid glucuronic, glutathion... Thông thường, quá trình trao đổi chất của xenobiotics là bước khởi đầu trong sự phát triển của quá trình độc hại. Do vậy, trong quá

trình oxy hóa sinh học của PAH khởi xướng quá trình hình thành arene oxit của các gốc tự do trong tế bào, từ đó tạo thành liên kết hóa trị với các cấu trúc ái nucleic tế bào (protein, nhóm sulfhydryl, axit nucleic...) kích hoạt oxy hóa peroxid của các lipid màng tế bào [84]. Kết quả khởi động sự đột biến, ung thư, các tác động gây độc tế bào. Trong nhiều trường hợp, các chất chuyển hóa độc hại là một sản phẩm không ổn định, trải qua biến đổi hơn nữa. Trong trường hợp này nó cũng được gọi là các chất chuyển hóa trung gian hoặc phản ứng (hiện tượng toxification). Chất chuyển hóa phản ứng - đây là những chất thường gây tổn thương hệ thống sinh học ở cấp độ phân tử.

Như vậy, sự chuyển hóa của PAHs được đi kèm với sự hình thành sản phẩm trung gian có khả năng phản ứng của các chất chuyển hóa, chẳng hạn như oxit arene có khả năng gây chết tế bào. Có rất nhiều loại hóa chất lạ có khả năng chuyển hóa trong cơ thể là hệ quả của sự đa dạng về các enzym tham gia vào giai đoạn I chuyển hóa xenobiotics và các chất nền có tính đặc hiệu thấp của chúng. Enzym của nhóm này, đặc biệt là cytochrome P450-phụ thuộc oxidase thường có một cơ chất có tính đặc hiệu yếu. Một tính năng quan trọng của các enzym giai đoạn I là phân bố có chọn lọc và hàm lượng cao của chúng trên các con đường chính của chuyển hóa xenobiotics trong cơ thể - trong đường tiêu hóa và phổi, cũng như sự đa dạng của các con đường chuyển hóa [85].

Giai đoạn II của quá trình giải độc các chất chuyển hóa trung gian được chia thành các phân tử nội sinh, từ đó hình thành các hợp chất phân cực, được bài tiết theo cơ chế chuyên biệt. Enzym ở giai đoạn II bao gồm: arylamine acetyltransferase, methyltransferase, sulfotransferase, glutathione transferase-B, UDP-glucuronosyltransferase và nhiều loại khác. Biến đổi hóa học của xenobiotics ưa chất béo bởi các enzym trong giai đoạn II làm tăng tính thấm, góp phần đào thải nhanh chóng qua thận và gan. Giống như enzym giai đoạn I của chuyển hóa xenobiotics, các enzym giai đoạn II có cơ chất đặc hiệu yếu và tham gia vào việc chuyển hóa của một nhóm lớn các hóa chất. Ngoài ra,

hiều nghiên cứu còn đề xuất đến giai đoạn III. Ở giai đoạn này hệ thống vận chuyển đã kích hoạt của các dẫn xuất có nhiệm vụ đảm bảo sự bài tiết các sản phẩm giải độc qua phổi, thận và đường tiêu hóa [83]. Cơ chế bài tiết xenobiotics được thực hiện nhờ họ P-glycoprotein vận chuyển màng.

Khả năng của các cơ quan và mô chuyển hóa xenobiotics phụ thuộc vào sự đồng bộ và hoạt động của các enzym tham gia vào quá trình này. Ở một mức độ khác sự hoạt động của các enzym là một đặc tính nội tại của từng mô riêng biệt, được xác định bởi các biến dị di truyền cấu trúc gen của chúng, và cũng phụ thuộc vào độ tuổi và giới tính [86].

#### ***1.4.1. Đặc tính của enzym mã hóa bởi gen chuyển hóa xenobiotics***

Gen mã hóa các enzym chuyển hóa xenobiotics được đặc trưng bởi tính đa hình đáng kể của trình tự nucleotid có cấu trúc bậc một của nó, xác định sự khác biệt kiểu hình giữa các cá thể nhờ hoạt động của enzym bằng cách vô hiệu hóa các liên kết hóa học. Mặc dù tồn tại sự đa dạng đáng kể trong mỗi họ enzym, tất cả các enzym giải độc đều có những tính chất chung như sau [87]:

1. Tính đặc hiệu của chất nền thấp, cho phép chuyển hóa một loạt các hợp chất hóa học đa dạng về cấu trúc, bao gồm cả những chất mà cơ thể không bao giờ gặp.

2. Tính đa dạng được biểu hiện, tức là, tồn tại nhiều đồng dạng của các enzym chuyển hóa xenobiotics với sự đặc hiệu của chất nền khác nhau hoặc chồng chéo nhau. Sự hiện diện nhiều đồng dạng của các enzym giải độc, có lẽ là do thích ứng với đặc điểm của chế độ dinh dưỡng của con người, khí hậu, các yếu tố môi trường và các điều kiện khác của cuộc sống [81], [82].

3. Tất cả các enzym giải độc là các chất cảm ứng, tức là nồng độ của chúng trong tế bào có thể được tăng lên đáng kể (vài trăm lần) dưới tác động của thuốc gây cảm ứng đặc hiệu, thường là chất nền.

4. Một số hóa chất có cấu trúc khác nhau xâm nhập đồng thời vào cơ thể có thể làm rối loạn sự điều hòa quá trình cảm ứng của enzym ở cả hai giai



đoạn, do đó có thể là quá trình tăng mạnh tính bất hoạt, và ngược lại, dẫn đến làm tăng độc tính của xenobiotics.

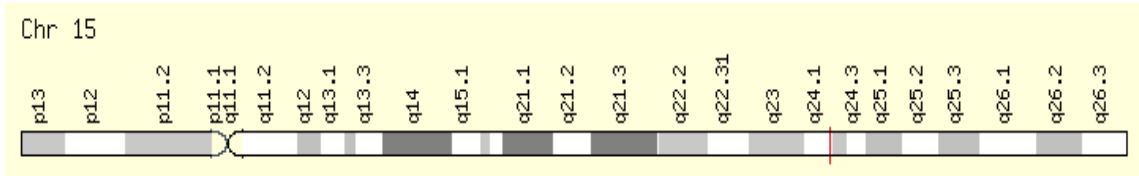
5. Hệ thống giải độc hoạt động hiệu quả nhất khi ở trạng thái kếp, nghĩa là có sự tương tác của các enzym giai đoạn I và giai đoạn II, trung hòa hàng chục ngàn xenobiotics của các nhóm hợp chất hóa học. Tính không đồng bộ của quá trình này là kết quả tác động đồng thời của xenobiotics khác nhau, hoặc là kết quả kết hợp bất lợi của các isoenzymes với thay đổi hoạt tính dẫn đến gây nhiễm độc nhanh chóng giống như kết quả của sự tích tụ các chất chuyển hóa có hoạt tính cao. Đặc biệt là sự kết hợp bất lợi giữa các enzym có hoạt tính cao ở giai đoạn I và các enzym có hoạt tính thấp ở giai đoạn II. Cần thấy rằng, hệ thống các enzym giải độc không hề có sự tiến hóa, tức là không có khả năng đáp ứng được sự thay đổi chóng mặt của môi trường hiện nay với tình trạng ô nhiễm ngày càng cao. Ở động vật tồn tại hệ thống giải độc bao gồm tất cả các loài (từ vi sinh vật đến con người) cho phép đưa ra giả thuyết chức năng ban đầu của hầu hết các enzym hệ thống giải độc là quy định quá trình chuyển hóa nội sinh của cơ chất. Tuy nhiên, do có sự đặc hiệu rộng của các cơ chất rộng và sự tăng trưởng nhanh của vấn đề ô nhiễm môi trường, các enzym này dần biến đổi thành một hệ thống xử lý các chất độc hại [88]. Do đó, sự đặc biệt được xác định về mặt di truyền của hệ thống chuyển hóa sinh học của xenobiotics tạo nên tính riêng biệt của mỗi cá nhân trong mối tương quan với khả năng thích ứng - đó là sự ổn định hoặc nhạy cảm với các yếu tố hóa học của môi trường tự nhiên.

#### ***1.4.2. Các gen mã hóa enzym chuyển hóa xenobiotics chủ yếu***

##### ***1.4.2.1. Gen CYP1A1***

Cytochrom P<sub>450</sub>, (CYPs) là một họ lớn chứa các hemoprotein xúc tác các enzym chuyển hóa các chất nội và ngoại sinh. Trong đó Cytochrome P<sub>450</sub> 1A1 (*CYP1A1*) là enzym chính hoạt hóa các chất và là chìa khóa để kích hoạt trao

đổi chất giữa các hydrocacbon có nhân thơm, các amin dị vòng dẫn đến biến đổi các phân tử ADN từ đó khởi đầu quá trình vô sinh ở nam giới.

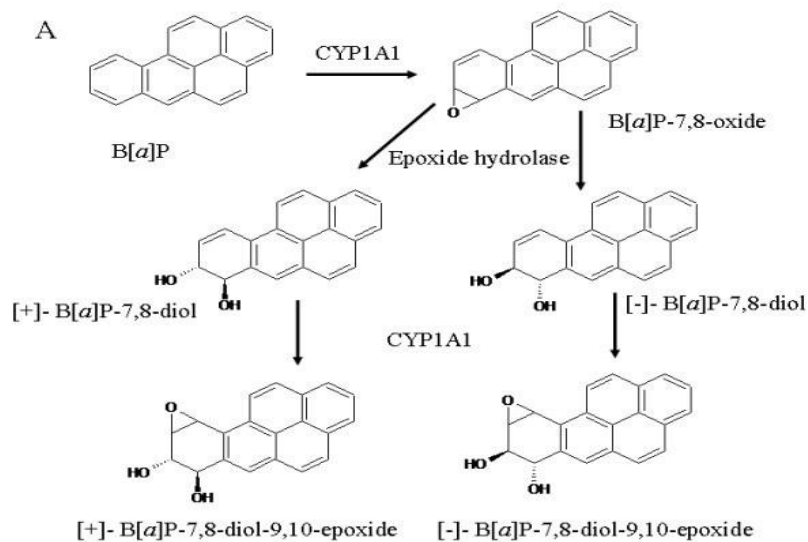


**Hình 1.4. Vị trí của gen CYP1A1 trên NST 15**

(Nguồn: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP1A1>)

**CYP1A1** (Cytochrome P<sub>450</sub>, họ 1, phân họ A, polypeptid 1) là gen mã hóa cho một enzym thuộc họ Cytochrom P<sub>450</sub>, nằm trên NST 15 (15q24.2-4). **CYP1A1** còn được gọi dưới một tên khác là Aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH). Gen gồm 6.069 cặp base, từ bp 74.719.542 đến bp 74.725.610 với cấu trúc gồm 7 exon và 6 intron, protein được mã hóa là 512 acid amin và có trọng lượng phân tử 58165 Dalton [89], [90].

Gen **CYP1A1** mã hóa enzym **CYP1A1** là enzym quan trọng trong họ CYP<sub>450</sub>, đóng vai trò chính trong chuyển hóa giai đoạn I của các xenobiotics, tham gia xúc tác biến đổi nhiều thuốc điều trị, chất nội sinh (17β-estradiol, estrone) và đặc biệt là các hydrocacbon thơm đa vòng [91], [92], [93].



**Hình 1.5. Quá trình chuyển hóa giai đoạn I của benzo[a]pyrene**

(Nguồn: Androutsopoulos V.P. et al. - 2009)[94].

Ví dụ benzo[a]pyrene (B[a]P), một hydrocacbon thơm có 5 vòng benzen, là sản phẩm của quá trình cháy hoặc phân hủy các chất hữu cơ không hoàn toàn. Chất này có trong than đá, khói bụi, khói thuốc lá và nhiều loại thực phẩm như thịt nướng. Khi vào cơ thể, B[a]P được chuyển hóa ở giai đoạn I bởi *CYP1A1* tạo ra B[a]P-7,8-epoxide, chất này có thể bị oxy hóa bởi enzym epoxide hydrolase để tạo thành B[a]P-7,8-dihydrodiol, cuối cùng *CYP1A1* xúc tác chất này tạo thành B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide.

Các chất trung gian của quá trình này đa số không ổn định, có hoạt tính cao dễ tác động vào ADN, gây độc tế bào [93]. Nhờ quá trình chuyển hóa xảy ra bình thường, tất cả chúng đều đi vào giai đoạn II của quá trình chuyển hóa và bài xuất ra ngoài mà không gây tổn hại tới cơ thể.

Hơn 10 alen đa hình của gen *CYP1A1* được nghiên cứu gồm các dạng 2B, 2C, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 gây thay đổi của amino acid ở enzym *CYP1A1*.

Đến nay, người ta đã xác định được tính đa hình đơn nucleotid (Single nucleotide polymorphism: SNP) của gen *CYP1A1* ở các dân tộc khác nhau.

**Bảng 1.3. Các dạng SNP của gen *CYP1A1* [95]**

<b>Dạng SNP</b>	<b>Vị trí thay đổi</b>	<b>Acid amin tương ứng</b>
<i>CYP1A1</i> *1	Wild type	
<i>CYP1A1</i> *2A	380 T→C	Vùng không mã hóa
<i>CYP1A1</i> *2B	2455 A → G	462 Ile→Val
<i>CYP1A1</i> *3	?T→C	Vùng không mã hóa
<i>CYP1A1</i> *4	2453 C→A	461 Thr→Asn
<i>CYP1A1</i> *5	2461 C→A	464 Arg → Ser
<i>CYP1A1</i> *6	1636 G→T	331 Met → Ile
<i>CYP1A1</i> *7	2346-2347 insT	Tạo mã kết thúc
<i>CYP1A1</i> *8	2414 T→A	448 Ile→ Asn
<i>CYP1A1</i> *9	2461 C→T	464 Arg → Cys
<i>CYP1A1</i> *10	2500 C→T	477 Arg → Trp
<i>CYP1A1</i> *11	2546 C→G	492 Pro→Arg

Hiện nay, các công bố chủ yếu chỉ ra mối liên quan giữa chuyển hóa xenobiotics với một số SNP như: *CYP1A1\*2A*, *CYP1A1\*2B*.

Gao K. và cs (2017) [96] nghiên cứu thấy đa hình của các gen *GSTM1*, *DNMT3L* và *CYP1A1* có liên quan đến thiếu tinh. Luo H. (2014), phân tích từ 6 nghiên cứu với 1060 nam giới vô sinh vô căn thấy có sự liên quan giữa đa hình gen *CYP1A1* T3801C (dạng *CYP1A1-2A*) và nguy cơ vô sinh nam vô căn [97]. Ramgir S.S. (2017) [98] nghiên cứu tại Ấn Độ cũng cho thấy đa hình *CYP1A1-2A* (thay T3801C) có liên quan đến vô tinh ở nam [99].

Đa hình 2455A>G của gen *CYP1A1* đang được quan tâm nghiên cứu:

Fritsche E. và cs (1998) cho thấy đa hình ở exon 7 (*CPY1A1* 255A>G) làm Isoleucin thay bằng Valin gây ảnh hưởng quá trình chuyển hóa xenobiotics, tỷ lệ bị vô sinh trong nhóm mang đa hình này cao hơn so với nhóm chứng [100].

Lu N. và cs (2008) [101] nghiên cứu ở 192 người nam vô tinh và thiếu tinh nặng và 266 người nhóm chứng cho thấy đa hình *CYP1A1* 255A>G gây tăng vô sinh (với OR = 0,60, 95% CI = 0,40-0,91, p = 0,011).

Ningxia L. và cs (2008) đã cho thấy đa hình của gen *CYP1A1* đóng góp vào cơ chế vô sinh nam nguyên phát, trong đó đa hình *CYP1A1* 255A>G gây tăng vô sinh (với OR = 0,56, p = 0,005) [102].

Nghiên cứu Van Erp N.P. và cs (2009) [103] ở 219 bệnh nhân được điều trị bằng thuốc sunitinib cho thấy đa hình *CYP1A1* 2455A>G ảnh hưởng tới chuyển hóa thuốc sunitinib làm cho độc tính của thuốc tăng lên, nguy cơ giảm bạch cầu tăng lên (với OR= 6,24; P = 0,029), nguy cơ viêm niêm mạc tăng lên (OR= 4,03; P = 0,021).

Chen Y.Z. và cs (2014) [104] cho thấy đa hình 11599G>C, 2455A>G, 3810T>C và 113T>C của gen *CYP1A1* làm tăng nguy cơ ung thư bàng quang. Wang Y. và cs (2014) [105] thấy đa hình 2455A>G của gen *CYP1A1* làm tăng nguy cơ ung thư bàng quang ở người châu Á.

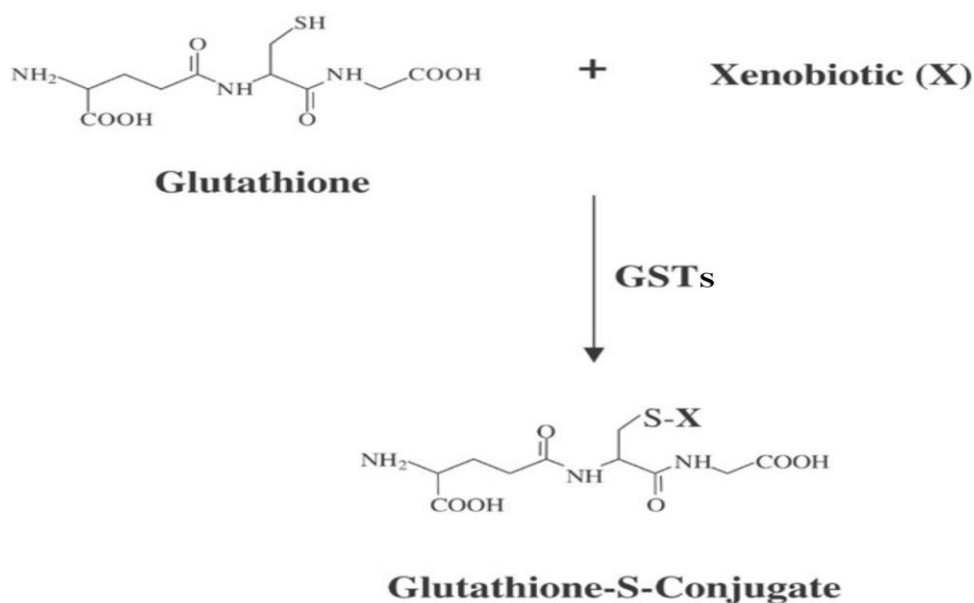
Nghiên cứu của C. M. Wright và cs (2010) [106] cho thấy: các đa hình 2455A>G; rs1799814; rs4646903; 3801T>C; rs1036143; 2453C>A có liên quan đến tăng nguy cơ ung thư phổi không tế bào nhỏ.

Chang B.L. và cs (2003) [107], Li H. (2012) [108] cho thấy đa hình 2455A>G của gen *CYP1A1* làm tăng nguy cơ ung thư tuyến tiền liệt. Ociepa Zawal M. (2009) cho thấy các đa hình của *CYP1A1* (3801T>C, 2455A>G) có thể dẫn đến ung thư vú khởi phát sớm hơn.

Như vậy, gen *CYP1A1* có nhiều đa hình, trong đó nhiều các tác giả thấy đa hình 2455A>G gây rối loạn chuyển hóa một số xenobiotic làm tăng độc tính của xenobiotic gây vô sinh và gây ung thư. Để nghiên cứu về vô sinh thì đa hình này là một lựa chọn cần được quan tâm.

#### 1.4.2.2. Gen *GSTP1*

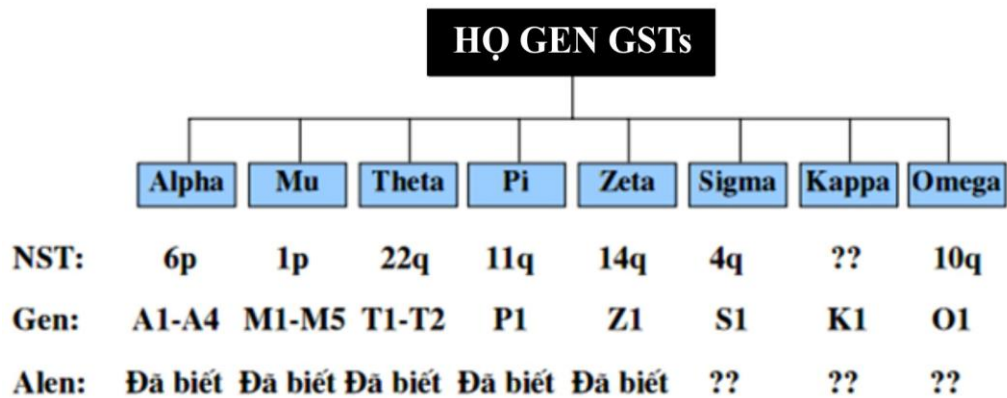
Glutathione S tranferases (*GSTs*) là một họ gen mã hóa các enzym *GSTs* có cơ chất là các xenobiotics và các sản phẩm của sự oxy hóa các chất. *GSTs* có tác dụng khử độc ở giai đoạn II của chuyển hóa các xenobiotics trong cơ thể giúp cân bằng nội môi, khử các chất độc ngoại lai bằng việc xúc tác glutathione khử. Do đó *GSTs* góp phần bảo vệ cơ thể chống lại các tác nhân xenobiotics [103].



**Nguồn:** Townsend, D. M. & Tew, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22, 7369-7375

**Hình 1.6. Sơ đồ phản ứng của Glutathione khử**

Họ gen *GSTs* gồm 8 nhóm là: *GSTA* (alpha- $\alpha$ ) nằm trên NST 6; *GSTM* (Mu- $\mu$ ) trên NST 1; *GSTT* (Theta- $\theta$ ) trên NST 22; *GSTP* (Pi- $\pi$ ) trên NST 11; *GSTZ* (Zeta- $\xi$ ) trên NST 14; *GSTS* (Sigma- $\delta$ ) trên NST 4; *GSTO* (Omega- $\omega$ ) trên NST 10 và *GSTK* (Kappa- $\kappa$ ) - chưa xác định được vị trí.

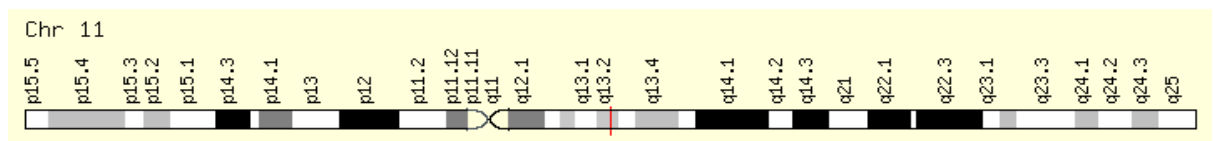


Hình 1.7. Họ gen *GSTs* [109]

**Gen *GSTP1***

*GSTP1* nằm trên nhánh dài NST số 11 (11q13.3) gồm 3066 cặp base. Các enzym *GSTs* xúc tác các phản ứng khử độc bằng cách liên hợp glutathion với các chất kỵ nước và lực điện tử để trung hòa các chất độc hại, xenobiotics và các sản phẩm của stress oxy hóa và dễ dàng đào thải ra ngoài [110].

Gen *GSTP1* có một số alen như *GSTP1*\*A, *GSTP1*\*B, *GSTP1*\*C, *GSTP1*\*D. Sự thay thế G thành A ở vị trí 313 dẫn đến thay thế acid amin Isoleucin thành Valin tại vị trí 105. Biến đổi này làm rối loạn chuyển hóa xenobiotics gây tăng nguy cơ ung thư [111], [112]. Sự đa trên exon 5 tạo 3 kiểu gen là: *GSTP1* \*A/\*A (Ile/Ile), *GSTP1* \*A/B\* (Ile/Val) và *GSTP1* \*B/\*B (Val/Val). Đa hình gây biến đổi C thành T ở vị trí 341 làm acid amin Ala thành Val ở vị trí 114 [113].



Hình 1.8. Vị trí của gen *GSTP1* trên NST 11

(Nguồn: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSTP1&keywords=GSTP1>)

Kết quả nghiên cứu của Li C. (2013) [114] và cs cho thấy các đa hình gen *GSTT1*, *GSTM1* và *GSTP1* liên quan đến vô tinh ở nam giới.

Các đa hình của gen *GSTP1* làm ảnh hưởng đến quá trình mã hóa các enzym *GSTP1*, làm chậm lại quá trình liên hợp glutathion, do đó làm giảm khả năng trung hòa các chất độc, xenobiotics và các sản phẩm của stress oxy hóa [110]. Đa hình gen *GSTP1* làm tăng nguy cơ mắc các bệnh như ung thư [115], rối loạn chuyển hóa [116]... và đặc biệt là vô sinh ở nam [117], [118], [119].

Yarosh S.L. và cs (2015) đã chỉ ra sự đa hình trong gen *GSTM1*, *GSTT1* và *GSTP1* liên quan đến vô sinh nam nguyên phát, nguy cơ này tăng lên bởi hút thuốc lá [118].

Khi tiến hành nghiên cứu đa hình trong nhóm gen *GSTs*, Xiong D.K. và cs (2015) cho thấy các biến đổi *GSTP1* 341C>T và biến đổi tại cả hai vị trí 313G>A, 341C>T làm tăng nguy cơ vô tinh và thiếu tinh ở nam giới [117].

Như vậy, với gen *GSTP1* nhiều nghiên cứu đã cho thấy đa hình 313A>G và đa hình 341C>T gây rối loạn chuyển hóa xenobiotic gây ung thư và gây vô sinh.

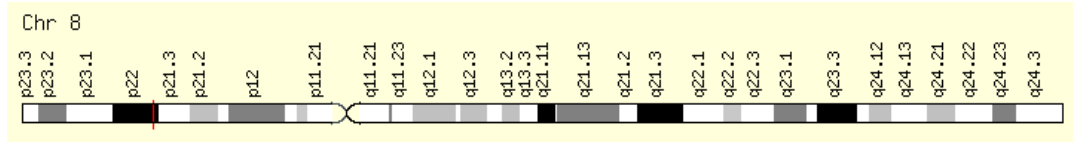
#### 1.4.2.3. Gen *NAT2* (Arylamine N-acetyltransferase 2)

Các gen nhóm *NAT* (N-acetyltransferase) gồm có *NAT1* (chromosome 8p22) và *NAT2* (chromosome 8p22), mã hóa enzym *NAT1* và *NAT2*.

*NAT2* (N-acetyltransferase 2) (8p22) nằm ở vùng 2 băng 2 trên nhánh ngắn của NST số 8, từ bp 18.391.245 đến bp 18.401.219, gồm 9.974 cặp base. Cấu trúc gồm 2 exon, 1 intron. Vùng mã hóa dài 870 bp, protein do *NAT2* mã hóa gồm 290 acid amin, có khối lượng phân tử là 33.542 Dalton [120]. Các enzym thuộc họ N-acetyltransferase tham gia vào giai đoạn 2 của chuyển hóa xenobiotics, hoạt động chủ yếu là acetyl hóa các xenobiotics kết hợp với các *GSTs* tạo ra các sản phẩm dễ dàng đào thải ra ngoài [121].

Enzym *NAT2* tham gia chuyển hóa một số chất có cấu trúc arylamines, hydrazines, amin thơm và các hợp chất dị vòng, các sản phẩm trung gian từ pha 1 vào phản ứng acetyl hóa [122], [123]. *NAT2* xúc tác việc chuyển một nhóm acetyl từ acetylCoenzym A vào chất nhận làm biến đổi các nhóm chức amin

(R-NH<sub>2</sub>) và hydrazine (R-NH-NH<sub>2</sub>) thành các nhóm amid (R-NH-COCH<sub>3</sub>) và hydrazid (R-NH-NH-COCH<sub>3</sub>). Việc thay đổi các nhóm chức amin thành các nhóm chức phân cực hơn dễ bài xuất ra ngoài cơ thể.

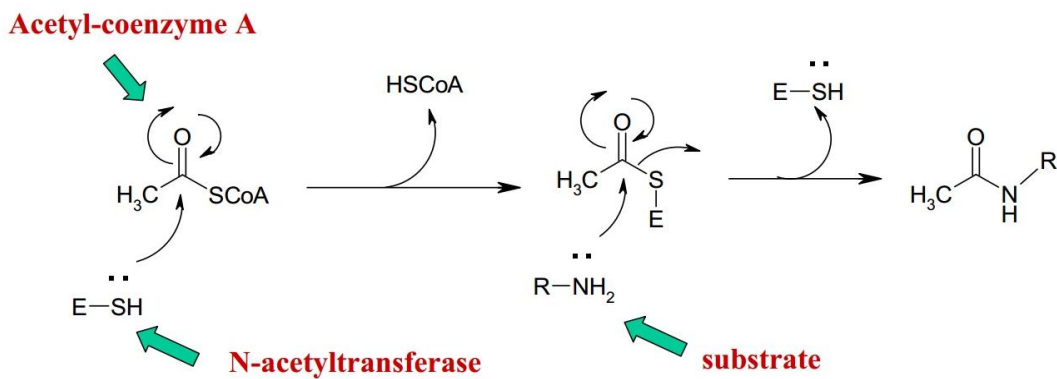


**Hình 1.9. Vị trí của gen NAT2 trên NST 8**

(**Nguồn:** [http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_NAT2.html](http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_NAT2.html))

Biến đổi gen NAT2 có thể làm chậm quá trình acetyl hóa. Giảm khả năng chuyển hóa xenobiotics của cơ thể dẫn tới tích tụ các xenobiotics và các chất chuyển hóa khác gây ảnh hưởng tới cơ thể [124, [125].

NAT2 là gen mang tính đa hình cao, có hơn 60 alen khác nhau [126]. Kiểu gen có đồng hợp tử alen lặn biểu hiện kiểu hình enzym acetyl hóa chậm, còn có một hoặc nhiều alen trội thì sẽ cho kiểu hình acetyl hóa nhanh [123]. Nhiều nghiên cứu cho thấy đa hình thường gặp của NAT2 là 590 G>A làm acid amin Arginine thay thế thành Glutamin tại vị trí 197, đa hình 481 (481C>T). Các đa hình này làm rối loạn quá trình giải độc của các enzym chuyển hóa xenobiotics từ đó dẫn đến vô sinh nam [127].



**Hình 1.10. Quá trình acetyl hóa của NAT2 [123],[126]**

Ở người enzym NAT2 tham gia chuyển hóa trong hệ sinh sản của nam như ở mô tinh hoàn, tuyến tiền liệt, ống dẫn sinh dục và các tuyến ngoại tiết. Enzym có vai trò chống lại các hóa chất gây bệnh niệu sinh dục. Đặc biệt, các enzym acetylates benzidin và 2-naphthylamine (các amin thơm có hại ở khói thuốc lá),



2-aminofluoren, thuốc chứa hydrazine (Isoniazid, simendan) và amin dị vòng (hóa chất trong thịt nấu chín ở nhiệt độ cao) đều có nguồn gốc từ quá trình chuyển hóa chính bản thân chúng và được kích hoạt bởi *CYP1A2* [128], [129]. Biến đổi ở *NAT2* được cho là kích hoạt chất gây ung thư [128].

Yarosh S.L và cs còn cho thấy đa hình 590G>A *NAT2* là một marker di truyền mới để chẩn đoán vô sinh nam nhưng nguy cơ vô sinh sinh nam sẽ được tăng cường bởi sự tiếp xúc thêm với các tác nhân oxy hóa khác từ môi trường [130].

Như vậy, với gen *NAT2* nhiều nghiên cứu đã cho thấy đa hình 481C>T và đa hình 590A>G gây rối loạn chuyển hóa xenobiotic gây ung thư và gây vô sinh.

Tóm lại các nghiên cứu đều chỉ ra rằng các gen mã hóa enzym chuyển hóa xenobiotics như *NAT2*, *CYP1A1*, *GSTP1* có ảnh hưởng lớn tới vấn đề vô sinh ở nam giới đặc biệt làm tăng khả năng không có tinh trùng và thiếu tinh, thiếu tinh năng.

### **1.5. Một số phương pháp phát hiện đa hình gen**

- Giải trình tự gen:

Có nhiều cách giải trình tự gen nhưng hiện nay phương được sử dụng phổ biến là phương pháp theo Sanger đề xuất. Nguyên tắc cơ bản của phương pháp này là dùng Dideoxy dựa vào hoạt động của enzyme ADN polymerase trong quá trình tổng hợp ADN. Enzyme ADN polymerase xúc tác gắn các nucleotide vào mạch đơn ADN đang tổng hợp ở vị trí 3' có chứa nhóm -OH tự do, khi gặp nucleotide không có nhóm 3'-OH thì phản ứng tổng hợp bị dừng lại. Đặc trưng của phương pháp là dùng dideoxynucleotide để làm ngừng phản ứng tổng hợp DNA một cách ngẫu nhiên.

Phương pháp được chia làm 4 phản ứng thực hiện riêng rẽ có ADN khuôn, ADN mẫu, đầy đủ các loại dNTP (deoxynucleotide), enzyme Taq polymerase, dung dịch đệm và các điều kiện phản ứng thích hợp đồng thời có bổ sung thêm khoảng 1% một loại ddNTP (dideoxynucleotide) cho mỗi phản

ứng khác nhau. Các dideoxynucleotide bị mất 2 nguyên tử oxy ở carbon thứ 3 và carbon thứ 4. Do đó khi mạch ADN đang tổng hợp bị gắn 1 ddNTP thì không có nhóm 3'-OH ở nucleotide cuối cùng nên mạch đang tổng hợp không được kéo dài tiếp tục phản ứng tổng hợp sẽ dừng lại.

Chính do lượng ddNTP được đưa vào với một lượng nhỏ so với lượng dNTP nên thỉnh thoảng mới có một ddNTP được sử dụng ngẫu nhiên làm phản ứng tổng hợp ADN dừng lại. Kết quả sẽ tổng hợp được các đoạn nucleotide có kích thước dài ngắn khác nhau. Để xác định trình tự, người ta điện di kết quả thu được trên gel polyacrylamid. Các đoạn oligonucleotide có kích thước khác nhau sẽ di chuyển với tốc độ khác nhau trên bản gel. Lúc này thực hiện phản ứng hiện hình phóng xạ có thể quan sát được các đoạn mạch đơn DNA bằng các vạch trên bản gel. Tổng hợp kết quả sẽ thu được trình tự sắp xếp các nucleotide của đoạn gen.

Kỹ thuật này xác định trực tiếp trình tự các nucleotid, sẽ xác định được tất cả các bất thường/ đa hình gen. Độ chính xác cao và được coi là tiêu chuẩn vàng trong xác định biến đổi gen. Tuy nhiên giải trình tự mất nhiều thời gian, giá thành cao.

- RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphisms - PCR): Kỹ thuật RFLP là kỹ thuật nghiên cứu tính đa hình chiều dài của các phân đoạn DNA dựa trên điểm cắt các enzym giới hạn (Restriction Enzyme, RE). Khi ủ DNA với enzym giới hạn ở dung dịch đệm thích hợp ở pH, nhiệt độ thích hợp sẽ tạo ra những phân đoạn DNA với kích thước khác nhau, từ đó lập nên các bản đồ gen.

Kỹ thuật này kinh tế hơn giải trình tự, tuy nhiên không xác định được toàn bộ các biến đổi gen, các khâu kỹ thuật nhiều nên giá thành thấp hơn giải trình tự nhưng vẫn còn cao và cũng tốn thời gian.

#### - Kỹ thuật ARMS-PCR

ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System - PCR): là kỹ thuật để phát hiện các đột biến điểm được biết đến và mô tả lần đầu tiên bởi Newton C.R. [131]. Kỹ thuật nhanh chóng được ứng dụng để phát hiện đặc hiệu cho các alen biến đổi [34], [132].

Nguyên lý của kỹ thuật ARMS-PCR: ARMS là kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen biến đổi do dùng TaqADN polymerase, nó chỉ khuếch đại khi đầu 3' của mồi và sợi khuôn bổ xung hoàn toàn với nhau. Khi đầu 3' của mồi không bổ xung với sợi khuôn phản ứng PCR bị ức chế hoàn toàn. Dựa trên nguyên lý này, kỹ thuật cho phép khuếch đại đặc hiệu một trình tự biến đổi ngay cả trong trường hợp alen biến đổi đó chiếm tỷ lệ rất nhỏ trong tổng số sợi khuôn ADN.

Kỹ thuật này là kỹ thuật gián tiếp phát hiện được những đa hình đã xác định nhưng kỹ thuật này tiến hành nhanh, chi phí thấp, rất thích hợp cho việc phát hiện các đa hình đã được xác định.

Hiện nay nhiều công ty trên Thế giới đã sản xuất ra các bộ kit thương mại dựa trên nguyên lý này. Công ty Lytech, Nga là một trong những Công ty tiên phong ở Nga đã sản xuất nhiều bộ kit xác định các đột biến/đa hình gen ứng dụng chẩn đoán nhiều bệnh như ung thư, tim mạch, vô sinh... Các bộ kit của công ty Lytech đều đạt chuẩn IVD sản xuất theo tiêu chuẩn ISO Châu Âu với giá thành khá thấp (khoảng 100 nghìn/1 đa hình gen), phù hợp với điều kiện Việt Nam.

## Chương 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu

##### 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của chúng tôi là những bệnh nhân nam được chẩn đoán vô sinh nguyên phát có số lượng tinh trùng  $\leq 5$  triệu/ml tinh dịch, đã được xét nghiệm tinh dịch đồ tại Trung tâm Tư vấn di truyền, bệnh viện trường Đại học Y Hà Nội, thời gian từ tháng 10/2015-tháng 6/2018.

##### 2.1.1.1. Số bệnh nhân và số mẫu

- Cỡ mẫu: cỡ mẫu cần thiết cho nghiên cứu được tính dựa trên cơ sở tần số xuất hiện các đa hình gen.

- Cỡ mẫu được xác định theo công thức:

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

Trong đó:

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

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành phân tích đa hình của 3 gen *GSTP*, *NAT2* và *CYP1A1*. 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 Sena Erdogan Aydes [132] trên đa hình gen *CYP11A1* 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 là 170 và nhóm chứng là 170.

- Nhóm vô sinh: 170 nam giới không có tinh trùng hoặc ít tinh trùng trong độ tuổi sinh sản: tuổi 18 - 50.

- Nhóm chứng: 170 nam giới trong độ tuổi sinh sản: tuổi 18 - 50, đã có ít nhất 1 con.

#### ***2.1.1.2. Tiêu chuẩn chọn đối tượng nghiên cứu***

##### **Đối với nhóm vô sinh:**

- Nam giới vô sinh không có tinh trùng hoặc ít tinh trùng (< 5 triệu/ml).
- Vô sinh không rõ nguyên nhân.
- Trong độ tuổi sinh sản.
- Đồng ý tham gia nghiên cứu.

##### **Đối với nhóm chứng:**

- Nam giới trong độ tuổi sinh sản.
- Có ít nhất một đứa con.
- Không có bất kỳ bất thường nào về chức năng sinh sản.
- Đồng ý tham gia vào nghiên cứu

### **2.1.1.3. 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, bị tâm thần...
- Nam giới bị các bệnh ảnh hưởng đến sức khỏe sinh sản.
- Những người không đồng ý tham gia nghiên cứu.

### **2.1.2. Thời gian nghiên cứu**

Nghiên cứu được tiến hành từ 9/2015 đến 5/2018.

### **2.1.3. Địa điểm nghiên cứu**

Nghiên cứu được tiến hành tại trung tâm Tư vấn di truyền, bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.2.1. Thiết kế nghiên cứu**

Nghiên cứu mô tả cắt ngang có đối chứng.

### **2.2.2. Phương pháp nghiên cứu**

2.2.2.1. Thu thập thông tin về tiền sử gia đình, bản thân và các kết quả xét nghiệm liên quan.

Tất cả các bệnh nhân được hỏi theo mẫu bệnh án dùng riêng cho nghiên cứu này.

- Phần hành chính: Các bệnh nhân nam giới 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 gia đình, tiền sử bản thân, nghề nghiệp, môi trường làm việc, tiền sử mắc bệnh, nhiễm độc, quai bị, chấn thương bộ phận sinh dục, nghiện rượu, thuốc lá... liên quan đến việc tiếp xúc với hóa chất, tia phóng xạ, mắc một số bệnh tật liên quan đến vô sinh.
- Khai thác các kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ, nội tiết, siêu âm, chọc dò và các xét nghiệm khác đã có từ trước.

#### 2.2.2.2. Xét nghiệm tinh dịch

Bệnh nhân được kiêng xuất tinh 2 - 7 ngày trước khi xét nghiệm.

Mẫu tinh dịch được phân tích ngay sau khi đã hóa lỏng hoàn toàn.

Sử dụng máy CASA để phân tích các chỉ số tinh dịch đồ theo tiêu chuẩn WHO 2010.

#### 2.2.2.3. Xét nghiệm di truyền học phân tử

- **Thu thập và xử lý mẫu**

- Cách lấy mẫu: 2 ml máu lấy từ tĩnh mạch bệnh nhân được chứa vào ống chuyên dụng chứa sẵn EDTA chống đông, đảm bảo không bị nhiễm bẩn và không bị lẫn các mẫu với nhau.

- Cách bảo quản: Mẫu được bảo quản trong điều kiện  $-20^{\circ}\text{C}$  cho đến khi được sử dụng.

- Kí hiệu mẫu: Ống chứa máu phải có đầy đủ thông tin: mã bệnh nhân, tên, tuổi, ngày lấy mẫu.

- **Tách chiết ADN**

- ADN được tách chiết theo kit ADN - express (của hãng Lytech- Nga, IVD) với các bước như sau:

- + Lấy 1ml máu tươi chống đông bằng EDTA.

- + Ly tâm 1300 vòng/phút, nhiệt độ thường ( $20^{\circ}\text{C}$ ) trong 5 phút.

- + Loại bỏ dịch nổi.

- + Ủ ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$  trong 40 phút.

- + Rã đông ở nhiệt độ thường.

- + Cho thêm thể tích kit tách bằng thể tích máu. (Tuy nhiên ở bước này chúng tôi có cải tiến nhằm giảm thể tích của hóa chất tách chiết, góp phần giảm giá thành mà vẫn đảm bảo chất lượng).

- + Tiến hành Vortex trong thời gian 10 giây.

- + Ủ ở  $99^{\circ}\text{C}$  trong 25 phút.

- + Ly tâm 1300 vòng/phút trong 20 phút.

- + Hút dịch nổi sang eppendor sạch, bảo quản  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- *Kiểm tra chất lượng ADN bằng phương pháp đo mật độ quang*

Mục đích: định lượng và kiểm tra độ tinh sạch của ADN.

Nguyên lý:

- Dựa vào sự hấp thụ cực đại của một chất ở một bước sóng nhất định. Acid nucleic hấp thụ mạnh ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 260nm. Vì vậy, giá trị mật độ quang học ở bước sóng 260nm cho phép xác định nồng độ ADN. Đồng thời ở bước sóng 280nm thì protein hấp thụ cực đại, dựa vào đó để kiểm tra độ tinh sạch của ADN. ADN gọi là tinh sạch khi tỷ số  $OD_{260nm}/280nm = 1,8 - 2$  [33].

- Tiến hành:

Sử dụng máy quang phổ Nanodrop 2000 để đo nồng độ và tính toán độ tinh sạch của ADN tách được (hình 2.1).

- + Chọn bước sóng 260nm, là bước sóng hấp thụ cực đại của acid nucleic.
- + Nhỏ 2 $\mu$ l dung dịch TE hoặc nước cất lên đầu đo cảm ứng (chứng blank).
- + Lau khô bề mặt đầu đo cảm ứng bằng giấy thấm.
- + Lấy 2 $\mu$ l dung dịch ADN/1 mẫu để đo.
- + Kết quả: kết quả đo được kết nối với hệ thống máy vi tính thể hiện bằng đồ thị độ hấp thụ và các thông số ở các bước sóng 260nm, 280nm.

Các mẫu được đo ở bước sóng 260 nm và 280nm, mỗi mẫu ADN được đo ít nhất 2 lần và lấy giá trị trung bình để xác định nồng độ ADN của mẫu.



**Hình 2.1. Máy đo quang phổ Nanodrop 2000**



\* Nhân gen bằng phản ứng PCR:

- Để khuếch đại các gen cần nghiên cứu, chúng tôi dùng kỹ thuật ARMS - PCR để nhân từng gen bằng bộ kit *CYP1A1*, *NAT2* và *GSTP1* của *Lytech*, Nga với 35 chu kỳ.

Bộ kit *CYP1A1*, *NAT2* và *GSTP1* được sản xuất bởi hãng *Lytech*, Nga được chứng nhận IVD và đã được áp dụng rộng rãi trên thế giới, đặc biệt là các nước Châu Âu. Thành phần chính trong bộ kit gồm: PCR Buffer, Taq AND polymerase, môi bình thường hoặc môi đột biến.

Với kỹ thuật AMRS cho phép phát hiện các đa hình có liên quan đến rối loạn chuyển hóa xenobiotics của gen *CYP1A1*, *NAT2* và *GSTP1*...

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng bộ kit của hãng *Lytech*, Nga loại dùng để phát hiện 5 đa hình 2455A>G của gen *CYP1A1*, 481C>T và 590G>A của gen *NAT2*, 313G>A và 341C>T của gen *GSTP1* là các đa hình đã được một số tác giả cho thấy có liên quan nhiều đến vô sinh nam.

Mẫu DNA của bệnh nhân sau tách chiết sẽ được đưa vào ARMS-PCR theo quy trình dưới đây.

Trong mỗi ống eppendorf loại 1,5ml vô trùng (ống ký hiệu là môi bình thường (N) và ống ký hiệu môi đa hình (P)) cho các thành phần phản ứng PCR (thể tích dưới đây tính cho 1 mẫu):

#### **Ống N**

PCR Buffer: 17,5 µl

Môi bình thường: 2,5 µl

Taq ADN polymerase: 0,2 µl

Trộn đều, hút 20 µl hỗn hợp PCR vào ống PCR loại 0,2ml. Thêm 5 µl ADN

#### **Ống P**

PCR Buffer: 17,5 µl

Môi đa hình: 2,5 µl

Taq ADN polymerase: 0,2 µl

Trộn đều, hút 20 µl hỗn hợp PCR vào ống PCR loại 0,2ml. Thêm 5 µl ADN

Trình tự môi sẽ sử dụng và các biến đổi gen hay gặp sẽ tập trung phát hiện với từng gen như sau:

**Bảng 2.1. Trình tự môi của các đa hình gen *CYP1A1* 2455A>G (I462V), *NAT2* 590G>A (R197Q); *NAT2* 481C>T(L161L) và *GSTP1* 313G>A (I105V); *GSTP1* 341C>T(A114 V)**

<b>Đa hình</b>	<b>Gen</b>	<b>Môi bình thường</b>	<b>Môi đa hình</b>
341C>T (A114V),	<i>GSTP1</i>	5`-CAGGTGTCAGGTGA GCTCTGAGCACC-3` 5`- ATAAGGGTGCAGGTTG TGTCTTGTCCCA-3`	5`-CGTGGAGGACCTCCGC TGCAAATC CA-3` 5`- ATAAGGGTGCAGGTTG TGTCTTGTCCCA-3`
313 G>A (I105V)	<i>GSTP1</i>	5'-AGGTTACGTAGTTTGCC CAAGGTC-3' 5'-CGTACTTGGCTGGTTG ATGTCC-3'	5'-GAGGACCTCCGCTGCAA ATTCG-3' 5'-CGTACTTGGCTGGTTG ATGTCC-3'
481C>T (L161L)	<i>NAT2</i>	5`-CAGGTGCCTTGCATTT TCT-3` 5`-GATGAAGCCCACCAA ACAGT-3`	5`- CCAATAAAAGTAGAAG CGA-3` 5`-GATGAAGCCCACCAA ACAGT-3`
590G>A (R197Q)	<i>NAT2</i>	5`- AAAGAATTTCTTAATT CTCATCTCCTG-3` 5`-AAAATGATGTGGTTATA AATGAAGATG-3`	5`- ACCACAGATCGAAGGT CGGAATATAC-3` 5`-AAAATGATGTGGTTATA AATGAAGATG-3`
2455A>G (I462V)	<i>CYP1A1</i>	5`GGAAGTGTATCGGTGAGAC CA 3` 5`TCATGTCCACCTTCACGCC CA 3`	5`GGAAGTGTATCGGTGAG ACCG 3` 5`TCATGTCCACCTTCACGC CCA 3`

• **Chu trình luân nhiệt:**

**Bảng 2.2. Chu trình luân nhiệt của phản ứng ARMS-PCR**

Hoạt hóa Tag	Biến tính	Gắn mồi	Kéo dài chuỗi	Kéo dài chuỗi cuối	Duy trì
1 chu kỳ	35 chu kỳ				1 chu kỳ
93°C 1 phút	93°C 10 giây	64°C 10giây	72°C 20 giây	72°C 10 phút	4 - 20°C ∞

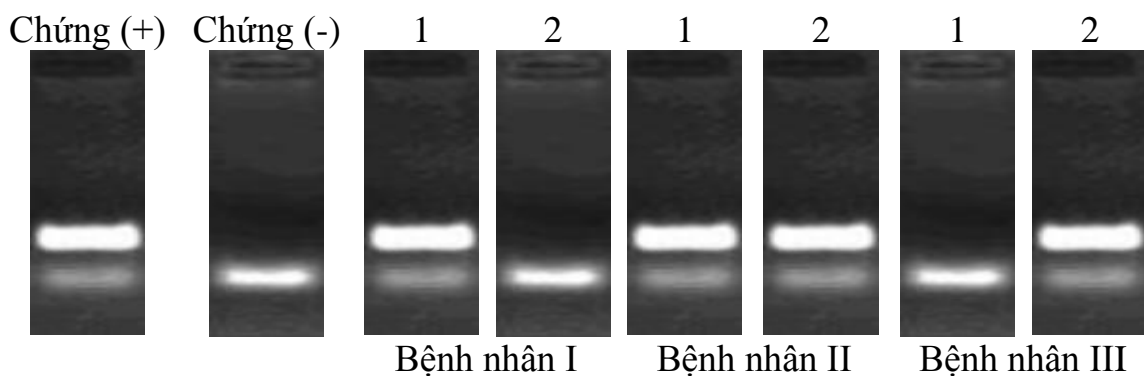
2.2.3.4. Điện di

Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 3%, kết quả hiển thị trên máy chụp gel UV để xác định đa hình gen *CYP1A1*, *NAT2* và *GSTP1*.

Dựa vào số vạch sáng xuất hiện trên kết quả điện di mà sẽ xác định được kiểu gen của mẫu:

- ✓ Dị hợp tử đa hình: vạch sáng đều xuất hiện ở môi bình thường và môi đa hình.
- ✓ Đồng hợp tử đa hình: vạch sáng chỉ xuất hiện ở môi đa hình.
- ✓ Không có đa hình: vạch sáng chỉ xuất hiện ở môi bình thường.

Không cho ra vạch sáng phù hợp hoặc không có kết quả thì quay lại kiểm tra lại nồng độ ADN và các bước trong quy trình.



**Hình 2.2. Kết quả điện di sản phẩm PCR**

**Chú thích:** 1. Môi bình thường; 2. Môi đa hình.

**Bệnh nhân I:** Bình thường (không có đa hình xảy ra)

**Bệnh nhân II:** Dị hợp tử đa hình

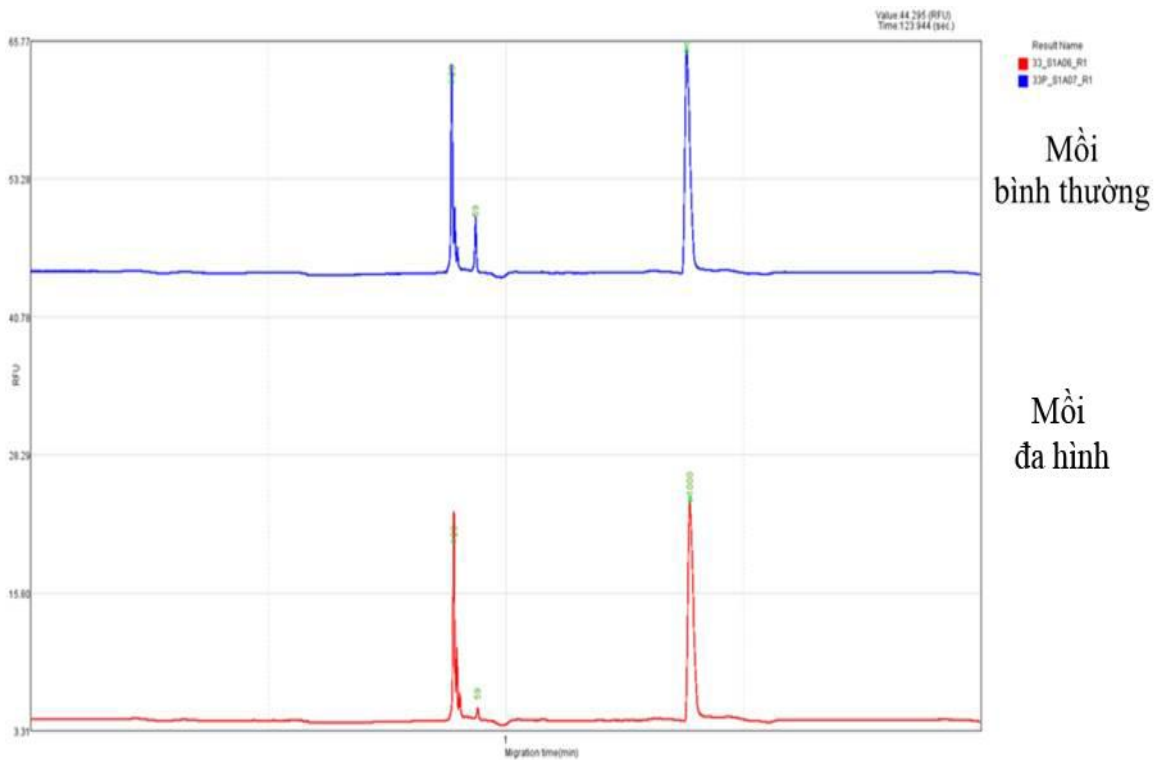
**Bệnh nhân III:** Đồng hợp tử đa hình.

\* Để kiểm chứng lại kết quả, chúng tôi cũng sử dụng mẫu nghiên cứu trên máy điện di tự động QSEP100 và cũng cho kết quả tương tự như điện di trên thạch agarose.

**Chú thích:** Môi bình thường: hiện đỉnh màu xanh nước biển;

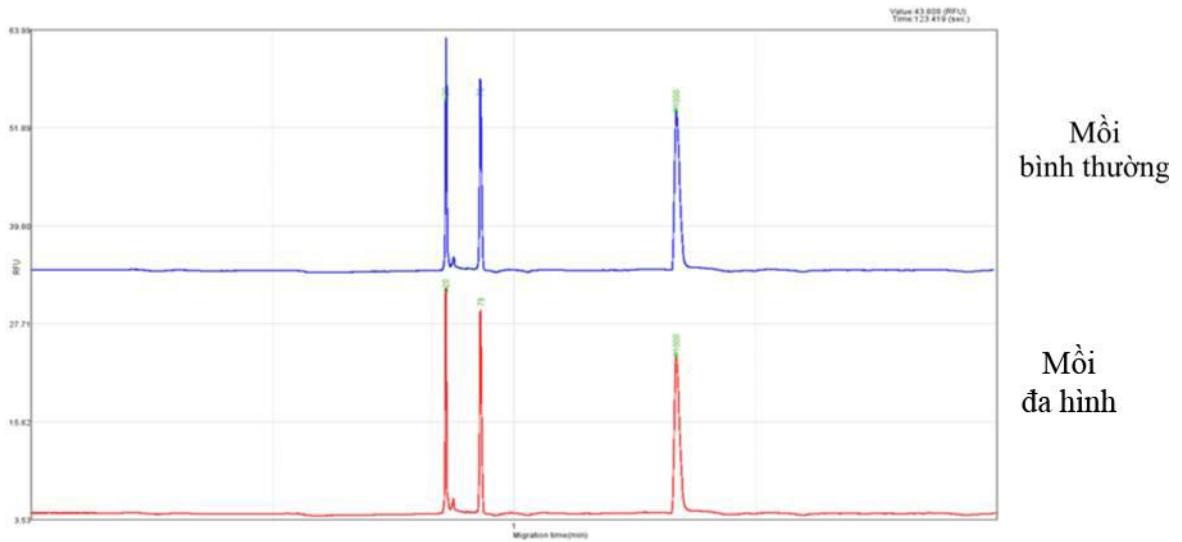
Môi đa hình: hiện đỉnh màu đỏ.

*Trường hợp 1:* Xuất hiện một đỉnh màu xanh nằm giữa hai vạch giới hạn (màu xanh) ở môi bình thường, môi đa hình (màu đỏ) không xuất hiện đỉnh nào nằm giữa hai vạch giới hạn => Bệnh nhân bình thường (không có đa hình xảy ra).



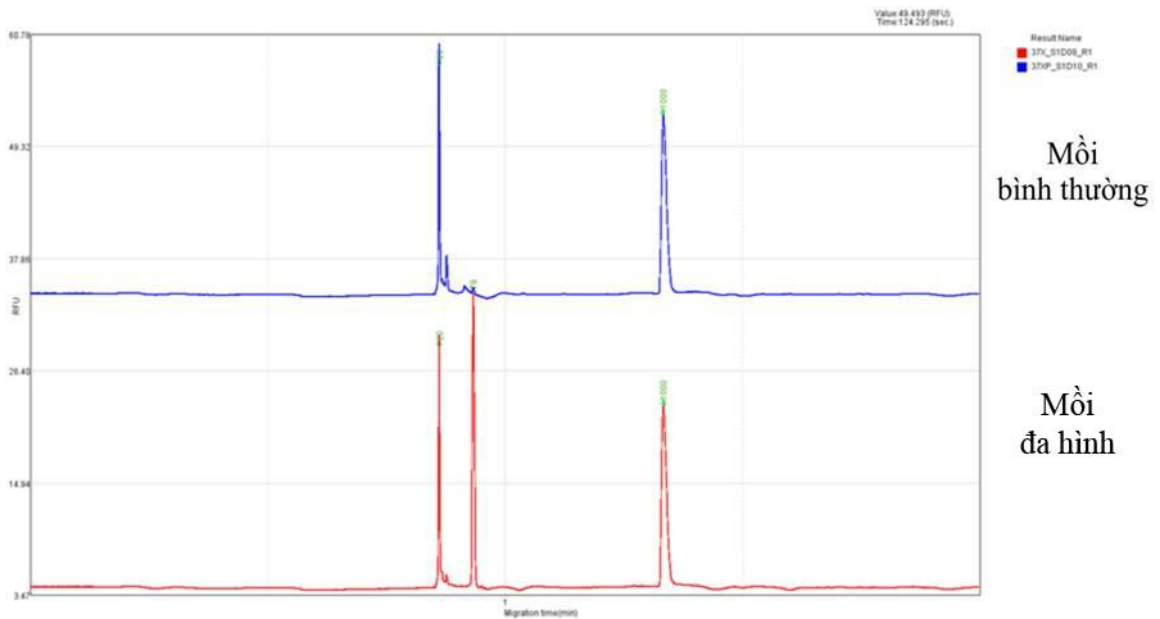
**Hình 2.3. Kết quả điện di tự động QSEP100 sản phẩm PCR (không có đa hình)**

*Trường hợp 2:* Xuất hiện một đỉnh màu xanh nằm giữa hai vạch giới hạn (màu xanh) ở môi bình thường và đỉnh màu đỏ nằm giữa hai vạch giới hạn ở môi đa hình => Bệnh nhân dị hợp tử đa hình.



**Hình 2.4. Kết quả điện di tự động QSEP100 sản phẩm PCR (dị hợp tử đa hình)**

*Trường hợp 3:* Không xuất hiện đỉnh màu xanh nào nằm giữa hai vạch giới hạn (màu xanh) ở môi bình thường nhưng xuất hiện một đỉnh màu đỏ nằm giữa hai vạch giới hạn ở môi đa hình => Bệnh nhân đồng hợp tử đa hình.



**Hình 2.5. Kết quả điện di tự động QSEP100 sản phẩm PCR (đồng hợp tử đa hình)**

\* *Kiểm chứng kết quả của ARMS-PCR đã tiến hành trong nghiên cứu*

Để kiểm chứng lại kết quả của phương pháp ARMS-PCR, chúng tôi tiến hành giải trình tự gen 10 mẫu đã được đánh giá kết quả bằng bộ kit thông qua phương pháp ARMS-PCR.

Đề tài sử dụng phương pháp giải trình tự dựa trên nguyên lý của Sanger.

DNA được tách chiết theo kit tách QIAGEN blood DNA Mini Kit. Chất lượng DNA được kiểm tra theo 2 phương pháp: điện di trên thạch agarose và đo mật độ quang.

Các đa hình 2455A>G của gen *CYP1A1*, 481C>T và 590G>A của gen *NAT2*, 313G>A và 341C>T của gen *GSTP1* được nhân lên bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi, thể tích phản ứng và chu trình luân nhiệt phù hợp.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit GeneJET PCR.

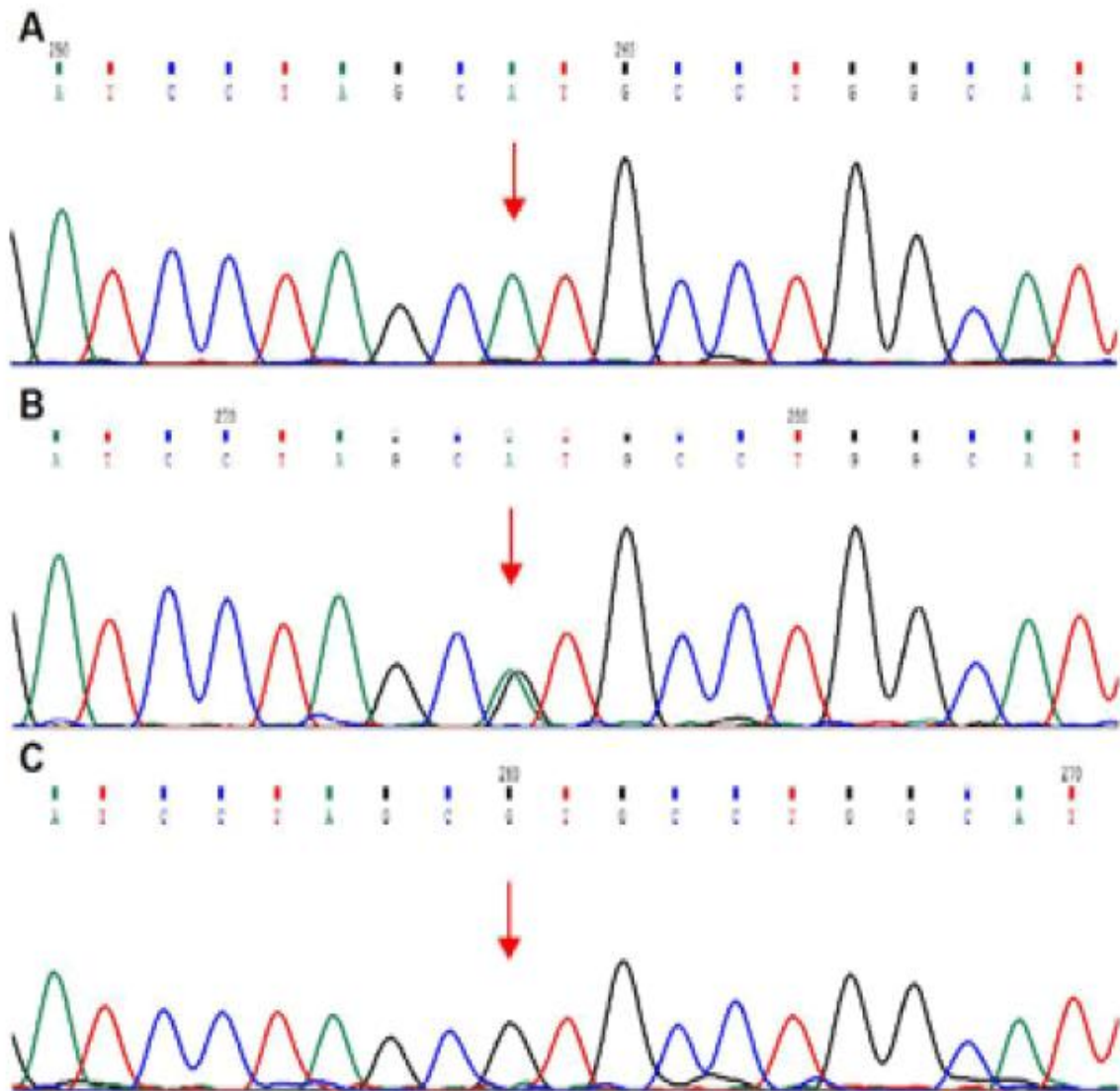
Giải trình tự gen bằng hệ thống máy giải trình tự ABI 3130 XL.

Kết quả giải trình tự gen được phân tích dựa trên phần mềm BioEdit và so sánh với kết quả xác định đa hình gen bằng phương pháp ARMS-PCR.

Trình tự mồi cho phản ứng giải trình tự các đa hình 2455A>G của gen *CYP1A1*, 481C>T và 590G>A của gen *NAT2*, 313G>A và 341C>T của gen *GSTP1* như sau:

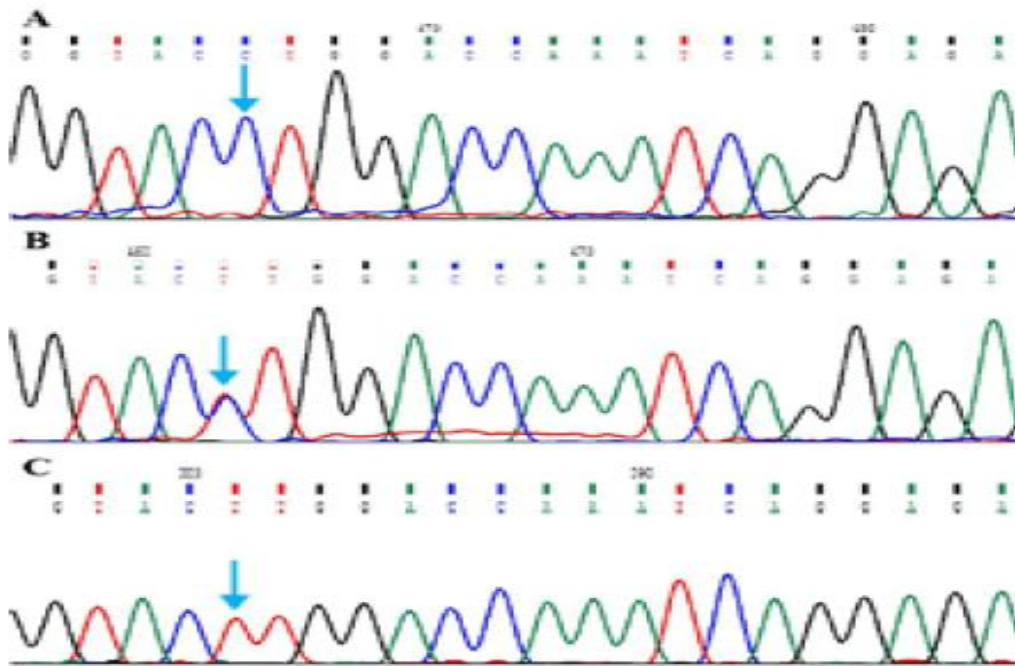
Đa hình	Mồi xuôi (Forward primer)	Mồi ngược (Reverse primer)	Nhiệt độ gắn mồi (°C)	Kích thước đoạn gen (bp)
2455A>G <i>CYP1A1</i>	5'- TTTGGAAGTGCT CACAGCAG-3'	5'- AGAGCTTAGAG GGTGGACCC3'-	59	430
481C>T và 590G>A <i>NAT2</i>	5'- CTTGCTTAGGGG ATCATGGA-3'	5'- ACGCTTGAACCT CGACAAT-3'	60	570
313G>A <i>GSTP1</i>	5'- AATGGAGGCGT GTGGAGGTT-3'	5'- CCACCCAGAACC AGAAGCAGC-3'	56.3	650
341C>T <i>GSTP1</i>	5'- GCCAGGAGGAT AGTACCCAG-3'	5'- TGTTTCCCATTG CCGTTGAT-3'	55.3	494

Hình ảnh giải trình tự gen ở một số mẫu như sau:

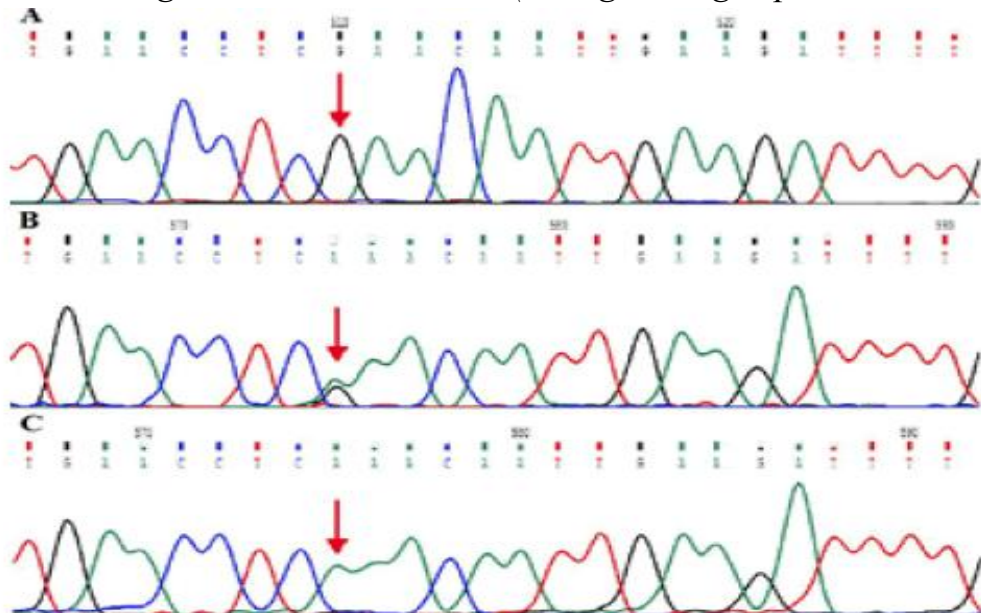


**Hình 2.6. Hình ảnh giải trình tự đoạn gen CYP1A1 chứa vị trí 2455A>G**

A. Trình tự đoạn gen chứa alen bình thường A (Kiểu gen đồng hợp tử bình thường AA). B. Trình tự đoạn gen chứa cả 2 alen A và G (kiểu gen dị hợp tử AG). C. Trình tự đoạn gen chứa alen đa hình G (Kiểu gen đồng hợp tử đa hình GG).

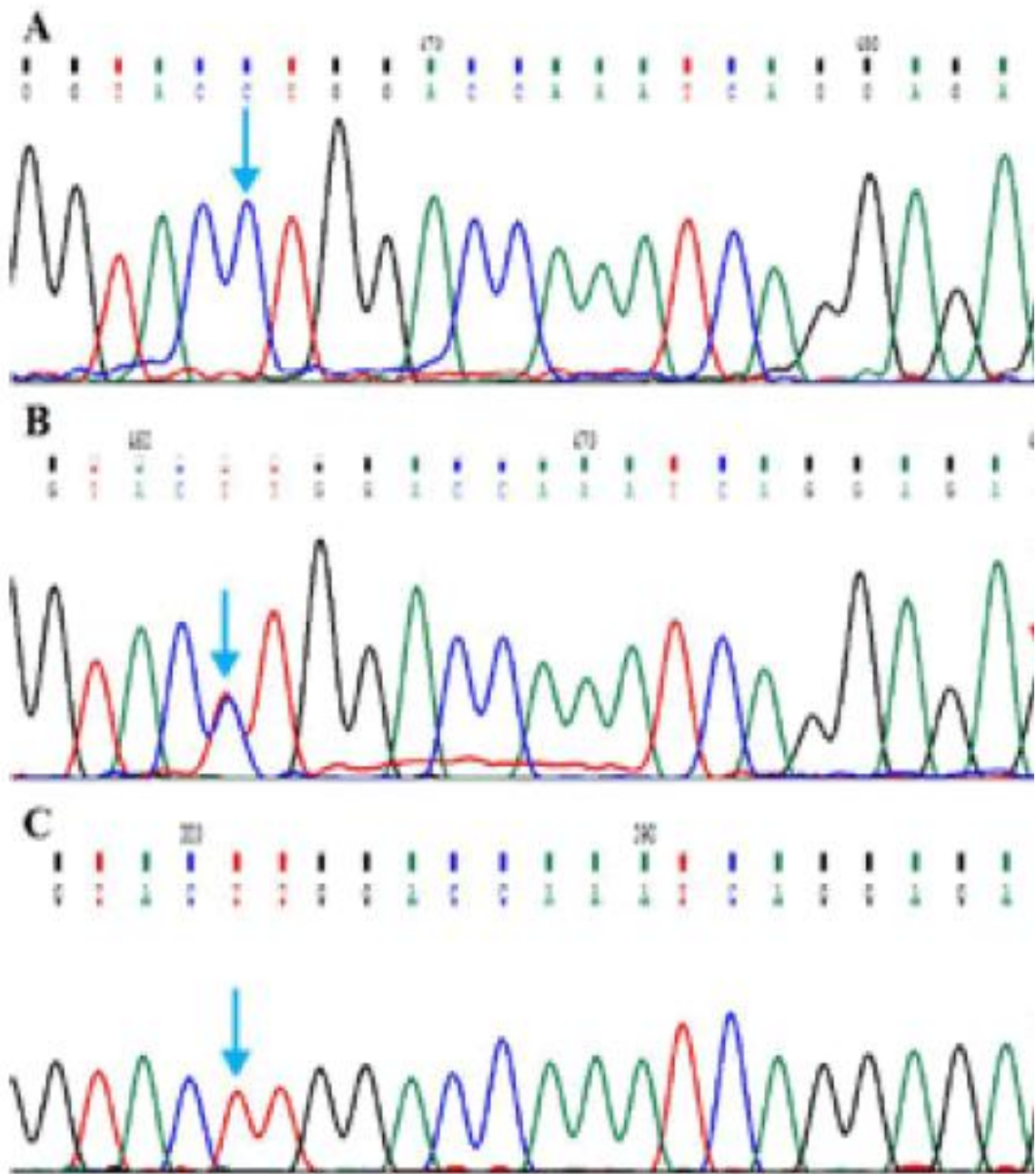


**Hình 2.7. Hình ảnh giải trình tự đoạn gen chứa vị trí 481 C>T gen NAT2**  
 A. Trình tự đoạn gen chứa alen bình thường C (Kiểu gen đồng hợp tử bình thường CC). B. Trình tự đoạn gen chứa cả 2 alen C và T (kiểu gen dị hợp tử CT).  
 C. Trình tự đoạn gen chứa alen đa hình T (Kiểu gen đồng hợp tử đa hình TT).

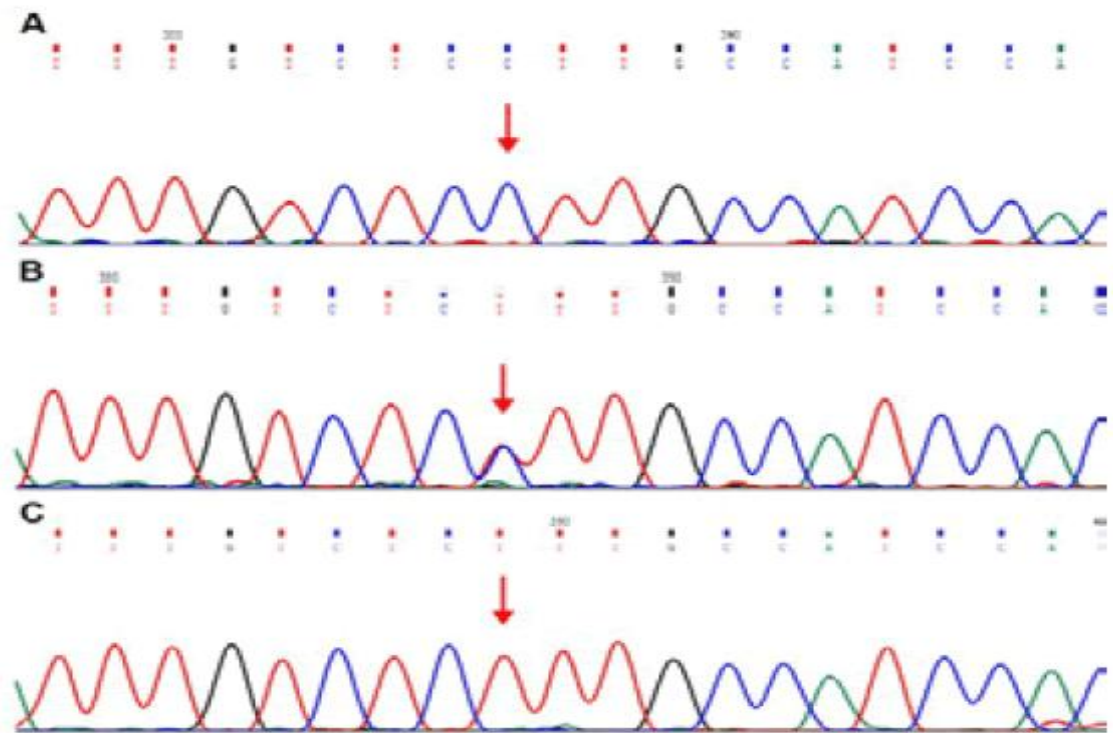


**Hình 2.8. Hình ảnh giải trình tự đoạn gen chứa vị trí 590G>A gen NAT2**  
 A. Trình tự đoạn gen chứa alen bình thường G (Kiểu gen đồng hợp tử bình thường GG). B. Trình tự đoạn gen chứa cả 2 alen G và A (kiểu gen dị hợp tử GA). C. Trình tự đoạn gen chứa alen đa hình A (Kiểu gen đồng hợp tử đa hình AA).





**Hình 2.9. Hình ảnh giải trình tự đoạn gen chứa vị trí 313G>A gen GSTP1**  
 A. Trình tự đoạn gen chứa alen bình thường G (Kiểu gen đồng hợp tử bình thường GG). B. Trình tự đoạn gen chứa cả 2 alen G và A (kiểu gen dị hợp tử GA). C. Trình tự đoạn gen chứa alen đa hình A (Kiểu gen đồng hợp tử đa hình AA).



**Hình 2.10. Hình ảnh giải trình tự đoạn gen chứa vị trí 341C>T gen GSTP1**

A. Trình tự đoạn gen chứa alen bình thường C (Kiểu gen đồng hợp tử bình thường CC). B. Trình tự đoạn gen chứa cả 2 alen C và T (kiểu gen dị hợp tử CT). C. Trình tự đoạn gen chứa alen đa hình T (Kiểu gen đồng hợp tử đa hình TT).

2.2.2.5. Kỹ thuật đánh giá mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch của bệnh nhân vô sinh nam có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics

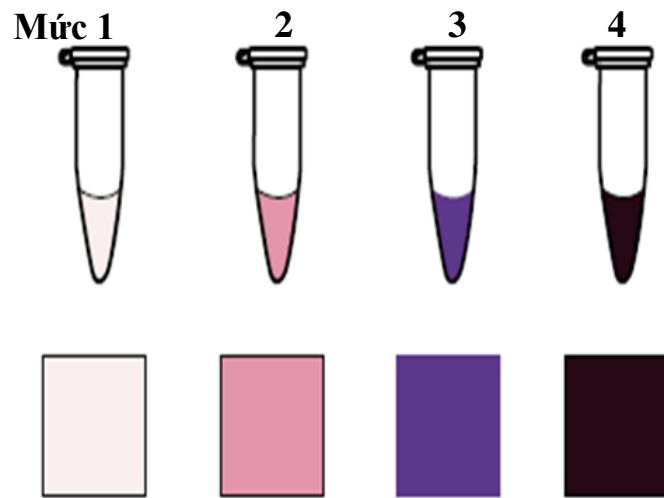
**Áp dụng kỹ thuật oxisperm để xác định mức độ stress oxy hóa** trong tinh dịch:

Để xác định mức độ stress oxy hóa sử dụng bộ kit Oxisperm (Halotech, Tây Ban Nha).

Nguyên lí của phương pháp dựa trên phản ứng của nitro blue tetrazolium (NBT) trong gel phản ứng (RG) của kit với anion superoxide trong tinh dịch tạo tinh thể màu xanh không tan trong nước. 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 tăng bắt màu trong gel phản ứng từ màu vàng tới những màu xanh tím khác nhau, có thể dễ dàng đánh giá bằng mắt thông qua sử dụng bảng màu (do vậy chỉ thực hiện được trên những bệnh nhân có ít tinh trùng trong tinh dịch).

- *Đánh giá kết quả:* Có 4 mức độ bắt màu được chia lớp như hình dưới:



**Hình 2.11. Kết quả đo mức độ oxy hóa tinh dịch**

- + 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

### **2.2.3. Các chỉ số nghiên cứu**

#### **2.2.3.1. Một số đặc điểm cận lâm sàng**

- Tinh dịch đồ:

- + Mật độ.
- + Tỷ lệ sống.
- + Độ di động.
- + Bất thường hình thái.
- + Thể tích.
- + pH.

- Các yếu tố sinh học, xã hội và đời sống gồm:

- + Trình độ văn hóa.
- + Nghề nghiệp.
- + Hút thuốc lá.
- + Sử dụng chất cồn.
- + Hoạt động thể chất.
- + Nhóm máu, tiền sử dị ứng, tiền sử cao huyết áp, nhồi máu cơ tim...

2.2.3.2. *Tác động của các đa hình gen mã hóa enzym chuyển hóa xenobiotics đến vô sinh nam*

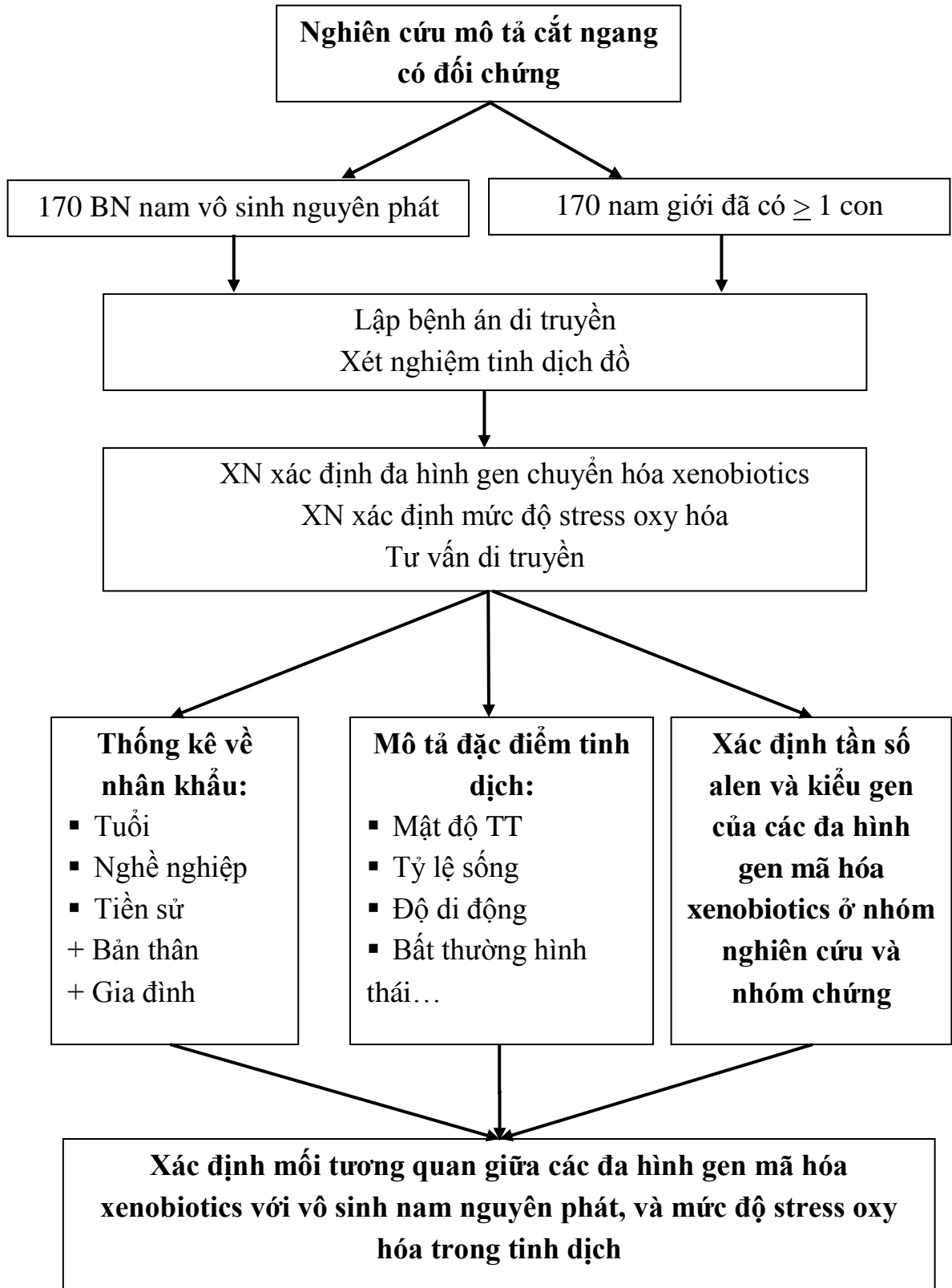
- Gen *CYP1A1* 2455A>G (I462V);
- Gen *NAT2*: 590G>A (R197Q);  
481C>T (L161L);
- Gen *GSTP1*: 313G>A (I105V);  
341C>T(A114 V).

\* Các bước nghiên cứu gồm:

- Lập bệnh án di truyền theo mẫu của nghiên cứu.
- Xét nghiệm tinh dịch đồ, phân tích các chỉ số: Mật độ tinh trùng, tỷ lệ sống, tỷ lệ các loại di động, tốc độ di chuyển của tinh trùng, tỷ lệ bất thường hình thái tinh trùng...
- Xác định tần số alen và kiểu gen của các đa hình gen *CYP1A1*, *NAT2*, *GSTP1* ở nhóm nghiên cứu và nhóm chứng bằng kỹ thuật ARMS-PCR.
- Thống kê, phân tích kết quả để xác định mối tương quan giữa các đa hình gen mã hóa xenobiotics với vô sinh nam nguyên phát, và mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch.

Quá trình nghiên cứu được thực hiện với các bước theo sơ đồ sau:

*Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu*



### 2.3. Xử lý số liệu

- Các số liệu thu được được xử lý theo chương trình SPSS 16.0; excel với các phần mềm thống kê tin học.

- So sánh độ trung bình giữa hai nhóm nghiên cứu sử dụng T - test; Chi square...

- Xác định mối liên quan giữa đa hình gen *CYP1A1*; *GSTP1* và *NAT2* với vô sinh nam nguyên phát bằng Odds ratio, (kí hiệu: OR) và khoảng tin cậy 95% (95%CI). Ý nghĩa của chỉ số OR:

- ✓ OR > 1: yếu tố khảo sát làm tăng nguy cơ vô sinh.
- ✓ OR = 1: yếu tố khảo sát không tác động tới nguy cơ vô sinh.
- ✓ OR < 1: yếu tố khảo sát không gây ảnh hưởng tới vô sinh.

- Để so sánh sự phân bố kiểu gen với phân bố trong quần thể theo định luật Hardy-Weinberg và so sánh tần số xuất hiện kiểu gen chúng tôi sử dụng kiểm định Chi bình phương Pearson và hiệu chỉnh Yates trên biến liên tục. Giá trị dị hợp tử lý thuyết được tính theo Nei. Độ lệch tương đối giữa dị hợp tử lý thuyết ( $H_e$ ) và dị hợp tử thực nghiệm ( $H_0$ ) được tính theo công thức:

$$D = (H_0 - H_e)/H_e,$$

Trong đó:

- $H_0$  là mức độ dị hợp tử thực nghiệm.
- $H_e$  mức độ dị hợp tử lý thuyết.

- Để xây dựng mô hình tương tác giữa các gen chúng tôi sử dụng 2 phương pháp:

- Phương pháp truyền thống để xác định tương tác giữa 2 gen và phương pháp dùng phần mềm MDR (Ritchie, 2003) [133] để xác định tương tác của nhiều gen mà không thể xác định được bằng các phương pháp thống kê truyền thống (Moore J.H., 2004; Motshinger 2006, Moore 2006) [134], [135].

- Phương pháp MDR cho phép giảm số lượng cỡ mẫu khi xác định các tương tác gen bằng cách tổng hợp tất cả các tổ hợp gen có nguy cơ cao và

nguy cơ thấp gây vô sinh nam. Bằng phương pháp MDR có thể xác định được tổ hợp 2, 3, 4, 5... alen tương tác. Giá trị p trong xây dựng mô hình tương tác gen với n-locus được đánh giá bằng kiểm định Monte-Carlo (1000 tổ hợp).

Phương pháp thống kê này bao gồm 10 lần kiểm định chéo và kiểm tra các hoán vị tổ hợp gen để giảm thiểu kết quả dương tính giả bằng kiểm tra giữ liệu đa chiều. Với kiểm định chéo 10 lần, dữ liệu được chia thành 10 phần bằng nhau và mô hình tương tác gen được xây dựng từ 9/10 tập dữ liệu (bộ dữ liệu thử nghiệm) và sau đó được kiểm tra lại từ 1/10 dữ liệu còn lại (bộ dữ liệu kiểm tra). Điều này được thử nghiệm lặp lại cho mỗi bộ dữ liệu thử nghiệm (9/10) và bộ dữ liệu kiểm tra (1/10), từ đó tính trung bình 10 lần dự đoán kết quả để xác định các tổ hợp có độ tái lập cao và lỗi dự đoán thấp nhất. Cuối cùng, sử dụng thử nghiệm Monte-Carlo để đánh giá sự nhất quán của mô hình tương tác gen trên các tập dữ liệu chéo được xác nhận hợp lệ. Giả định theo thuật toán Monte-Carlo thì không có mối liên kết nào giữa 1000 tổ hợp hoán vị gen và chứng minh các tổ hợp này độc lập (không liên quan nhau) khi  $p \leq 0,05$ .

#### **2.4. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu**

- Trước khi tiến hành nghiên cứu, các đối tượng nghiên cứu được nghe thông báo về mục đích nghiên cứu, quyền lợi và trách nhiệm khi tham gia nghiên cứu.

- Các thông tin riêng liên quan tới đối tượng nghiên cứu được giữ kín.

- Những trường hợp vô tình và thiếu tinh năng được tư vấn biện pháp can thiệp thích hợp.

- Đề tài này nằm trong đề tài cấp Bộ “Nghiên cứu xác định đột biến/đa hình một số gen chuyển hóa xenobiotics ứng dụng trong chẩn đoán vô sinh nam” do PGS. TS. Trần Đức Phấn làm chủ nhiệm, đề tài cấp Bộ này đã được thông qua và chấp thuận của hội đồng đạo đức trường Đại học Y Hà Nội.

### Chương 3

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. So sánh kết quả của kỹ thuật ARMS-PCR với kết quả giải trình tự gen

**Bảng 3.1. So sánh kết quả của kỹ thuật với kết quả giải trình tự gen của các mẫu kiểm chứng**

Mẫu	Phương pháp	Đa hình				
		2455A>G <i>CYP1A1</i>	481C>T <i>NAT2</i>	590G>A <i>NAT2</i>	313G>A <i>GSTP1</i>	341C>T <i>GSTP1</i>
1	Sequenc.	AA	CC	AA	GA	CT
	ARMS-PCR	AA	CC	AA	GA	CT
2	Sequenc.	AA	CC	AA	GA	TT
	ARMS-PCR	AA	CC	AA	GA	TT
3	Sequenc.	AA	CC	AA	GG	CT
	ARMS-PCR	AA	CC	AA	GG	CT
4	Sequenc.	AA	CT	AA	GA	CC
	ARMS-PCR	AA	CT	AA	GA	CC
5	Sequenc.	AG	CC	GA	AA	CT
	ARMS-PCR	AG	CC	GA	AA	CT
6	Sequenc.	AG	CC	GG	GA	TT
	ARMS-PCR	AG	CC	GG	GA	TT
7	Sequenc.	AA	CC	GG	GG	CC
	ARMS-PCR	AA	CC	GG	GG	CC
8	Sequenc.	AA	CC	GG	GG	CC
	ARMS-PCR	AA	CC	GG	GG	CC
9	Sequenc.	AG	CC	AA	GA	TT
	ARMS-PCR	AG	CC	AA	GA	TT
10	Sequenc.	AA	CC	GA	AA	CC
	ARMS-PCR	AA	CC	GA	AA	CC



**Nhận xét:** Kết quả xác định đa hình 2455A>G của gen *CYP1A1*, 481C>T và 590G>A của gen *NAT2*, 313G>A và 341C>T của gen *GSTP1* bằng phương pháp ARMS - PCR là phù hợp với kết quả giải trình tự.

### 3.2. Đặc điểm về tuổi của nhóm vô sinh và nhóm đối chứng

**Bảng 3.2. Phân bố nhóm tuổi của nhóm vô sinh và nhóm chứng**

Nhóm tuổi	Nhóm vô sinh (n = 170)		Nhóm chứng (n = 170)		p
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
18 - 24	11	6,5	9	5,3	p>0,05
25 - 34	126	74,1	120	70,6	
35 - 44	28	16,5	36	21,2	
45 - 50	5	2,9	5	2,9	
<b>X ± SD</b>	31,43± 5,548		31,94±5,074		p=0,381

**Nhận xét:**

Bảng 3.2 cho ta kết quả:

- Ở cả nhóm chứng và nhóm vô sinh, nam giới độ tuổi 25-34 đều chiếm tỷ lệ cao nhất. Độ tuổi chiếm tỷ lệ thấp nhất đều là 45 - 50 tuổi.
- Độ tuổi trung bình nhóm vô sinh là 31,43 ± 5,548, nhóm chứng là 31,94 ± 5,074. Tuổi trung bình giữa hai nhóm không có sự khác biệt với p = 0,381.

### **3.3. Biến đổi nucleotid của các gen *CYP1A1*, *NAT2*, *GSTP1***

#### ***3.3.1. Phân bố kiểu gen và sự tương ứng với cân bằng Hardy-Weinberg ở nhóm vô sinh và nhóm chứng***

Để tiến hành nghiên cứu dịch tễ học di truyền các gen mã hóa enzym thuộc hệ thống chuyển hóa xenobiotics trong chẩn đoán nguyên nhân vô sinh nam, chúng tôi lựa chọn mẫu bệnh nhân dựa trên tiêu chí đồng nhất về chủng tộc và không có quan hệ huyết thống của các nhóm vô sinh nam và nhóm có khả năng sinh sản bình thường, hiện sinh sống tại Việt Nam. Mẫu ADN của 170 nam giới bị vô sinh và 170 nam giới bình thường được sử dụng để phân tích 5 đa hình gen mã hóa enzym chuyển hóa xenobiotics. Sự phân bố kiểu gen và tương ứng với cân bằng trong quần thể theo định luật Hardy - Weinberg được tiến hành phân tích độc lập giữa nhóm chứng và nhóm vô sinh.

**Bảng 3.3. Phân bố kiểu gen và giá trị dị hợp tử của các đa hình gen chuyển hóa xenobiotics ở nhóm chứng**

Gen	Đa hình	Kiểu gen	Phân bố kiểu gen		Mức độ dị hợp tử		$\chi^2$ (p)
			n=170	%	H <sub>0</sub>	H <sub>e</sub>	
CYP1A1	2455A>G	AA	134	78,8	0,212	0,189	2,38 (p>0,05)
		AG	36	21,2			
		GG	0	0			
NAT2	481C>T	CC	136	80	0,211	0,189	2,38 (p>0,05)
		CT	34	20			
		TT	0	0			
NAT2	590G>A	GG	126	74,1	0,259	0,225	3,76 (p>0,05)
		GA	44	25,9			
		AA	0	0			
GSTP1	313G>A	GG	145	85,3	0,147	0,136	1,07 (p>0,05)
		GA	25	14,7			
		AA	0	0			
GSTP1	341C>T	CC	156	91,8	0,082	0,079	0,31 (p>0,5)
		CT	14	8,2			
		TT	0	0			

*H<sub>0</sub> là mức độ dị hợp tử thực nghiệm, H<sub>e</sub> là mức độ dị hợp tử lý thuyết.*

**Nhận xét:** Trong bảng 3.3 là tần số xuất hiện kiểu gen ở nhóm chứng, kết quả ở bảng cho thấy: sự phân bố kiểu gen của tất cả các kiểu gen thuộc 5 đa hình ở các gen nghiên cứu trong nhóm chứng đều tương ứng với sự phân bố trong quần thể theo định luật Hardy-Weinberg.

**Bảng 3.4. Phân bố kiểu gen và giá trị dị hợp tử của các đa hình gen chuyển hóa xenobiotics ở nhóm vô sinh**

Gen	Đa hình	Kiểu gen	Phân bố kiểu gen		Mức độ dị hợp tử		$\chi^2$ (p)
			n=170	%	H <sub>0</sub>	H <sub>e</sub>	
CYP1A1	2455A>G	AA	78	45,9	0,524	0,403	15,3 (p<0,05)
		AG	89	52,4			
		GG	3	1,7			
NAT2	481C>T	CC	84	49,4	0,506	0,378	19,5 (p<0,05)
		CT	86	50,6			
		TT	0	0			
NAT2	590G>A	GG	71	41,8	0,535	0,431	9,88 (p<0,05)
		GA	91	53,5			
		AA	8	4,7			
GSTP1	313G>A	GG	90	52,9	0,359	0,413	2,19 (p>0,05)
		GA	61	35,9			
		AA	19	11,2			
GSTP1	341C>T	CC	105	61,8	0,382	0,309	9,05 (p<0,05)
		CT	65	38,2			
		TT	0	0			

*H<sub>0</sub> là mức độ dị hợp tử thực nghiệm, H<sub>e</sub> là mức độ dị hợp tử lý thuyết*

**Nhận xét:** Kết quả ở bảng 3.4 cho thấy: trừ đa hình 313G>A của gen *GSTP1*, sự phân bố của các kiểu gen còn lại trong nhóm đều khác với định luật Hardy-Weinberg. Phân bố kiểu gen của đa hình 313G>A của gen *GSTP1* tương ứng với phân bố Hardy - Weinberg (với p>0,05) do mức độ dị hợp tử thực nghiệm (H<sub>0</sub>=0,359) thấp hơn mức độ dị hợp tử lý thuyết (H<sub>e</sub>=0,413).

### 3.3.2. Kết quả nghiên cứu đa hình gen *CYP1A1* 2455A>G

Tiến hành chạy điện di kiểm tra đa hình gen *CYP1A1* 2455A>G ở 170 nam giới nhóm vô sinh và 170 nam giới nhóm chứng, chúng tôi thu được kết quả như sau:

**Bảng 3.5. Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình *CYP1A1* 2455A>G**

<i>CYP1A1</i> (2455A>G)	Nhóm vô sinh (n = 170)		Nhóm chứng (n=170)		$\chi^2$ (p)	OR	95%CI
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)			
AA	78	45,9	134	78,8	40,26 p<0,001	0,23	0,14-0,37
AG	89	52,4	36	21,2		4,09	2,54-6,58
AG+GG	92	54,1	36	21,2		4,39	2,73-7,07

Từ bảng 3.5 ta thu được kết quả sau:

- Nhóm vô sinh: Tỷ lệ mang gen bình thường AA là 45,9%, tỷ lệ người mang gen dị hợp tử là AG 52,4 % và 1,8% (3 trường hợp) có kiểu gen đồng hợp tử.

- Nhóm chứng: Tỷ lệ mang gen bình thường AA là 78,8%, mang gen dị hợp tử là 21,2% và không có trường hợp nào có kiểu gen đồng hợp tử.

Ở gen *CYP1A1*, tại vị trí 2455, kiểu gen dị hợp AG làm tăng khả năng thiếu tinh và vô tinh cao hơn 4,09 lần so với kiểu gen khác (OR = 4,09; 95%CI = 2,54-6,58). Sự khác biệt giữa 2 nhóm có ý nghĩa thống kê với  $p<0,001$ .

Ở gen *CYP1A1*, tại vị trí 2455, tần số của kiểu gen dị hợp AG và kiểu gen đồng hợp GG chủ yếu gặp ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh, cao hơn nhóm chứng (OR = 4,39; 95%CI = 2,73-7,07). Sự khác biệt giữa 2 nhóm có ý nghĩa thống kê với  $p<0,001$ .

**Bảng 3.6. Kết quả phân tích alen của đa hình CYP1A1 2455A>G**

<b>CYP1A1 (2455A&gt;G)</b>	<b>Nhóm vô sinh (n = 170)</b>		<b>Nhóm chứng (n = 170)</b>		<b><math>\chi^2</math> (p)</b>	<b>OR</b>	<b>95%CI</b>
	<b>Số lượng</b>	<b>Tỷ lệ (%)</b>	<b>Số lượng</b>	<b>Tỷ lệ (%)</b>			
<b>Alen A</b>	245	72,1	304	89,4	32,91	0,31	0,20-0,46
<b>Alen G</b>	95	27,9	36	10,6	p<0,001	3,27	2,15-4,98

Từ bảng 3.6 ta thu được kết quả sau:

- Nhóm vô sinh: tỷ lệ alen A là 72,1%, tỷ lệ alen G là 27,9%.
- Nhóm chứng: tỷ lệ alen A là 89,4%, tỷ lệ alen G là 10,6%.

Ở gen *CYP1A1*, tại vị trí 2455, tần số alen A chủ yếu gặp ở nhóm chứng, nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh tần số alen A chỉ bằng 0,31 lần (OR = 0,31; 95%CI = 0,20-0,46). Sự khác biệt giữa 2 nhóm có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

Ở gen *CYP1A1*, tại vị trí 2455, tần số alen G chủ yếu gặp ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh, ở nhóm có alen G, khả năng bị thiếu tinh và vô tinh tăng lên 3,27 lần (OR = 3,27; 95%CI = 2,15-4,98). Sự khác biệt giữa nhóm vô sinh nguyên phát và nhóm chứng là có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

### **3.3.3. Kết quả nghiên cứu đa hình gen NAT2 481C>T(rs1799929)**

Tiến hành chạy điện di kiểm tra đa hình gen *NAT2* 481C>T (rs1799929) ở 170 nam giới nhóm vô sinh và 170 nam giới nhóm chứng, chúng tôi thu được kết quả sau:

**Bảng 3.7. Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình gen NAT2 481C>T (rs1799929)**

NAT2 (481 C>T) (rs1799929)	Nhóm vô sinh (n = 170)		Nhóm chứng (n = 170)		$\chi^2$ (p)	OR	95%CI
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)			
CC	84	49,4	136	80	34,82 p<0,001	0,24	0,15-0,40
CT	86	50,6	34	20		4,10	2,53-6,63
CT+TT	86	50,6	34	20		4,10	2,53 - 6,63

Từ bảng 3.7 có thể thấy:

- Nhóm vô sinh: tỷ lệ mang gen bình thường CC là 49,4%, mang gen dị hợp tử CT là 50,6%.

- Nhóm chứng: tỷ lệ mang gen bình thường CC là 80%, mang gen dị hợp tử CT là 20%.

Ở gen NAT2, tại vị trí 481, tần số kiểu gen CC chủ yếu gặp ở nhóm chứng, nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh tần số kiểu gen CC thấp hơn. Tần số kiểu gen CT chủ yếu gặp ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh, người mang kiểu gen này khả năng bị thiếu tinh và vô tinh tăng lên 4,1 lần so với nhóm chứng. Tổng hợp kiểu gen CT và TT cho thấy khả năng bị thiếu tinh và vô tinh tăng lên 4,1 lần (OR = 4,1; 95%CI = 2,53 - 6,63). Về tần số các kiểu gen, sự khác biệt giữa nhóm thiếu tinh và vô tinh với nhóm chứng là có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

**Bảng 3.8. Kết quả phân tích alen của đa hình gen NAT2 481C>T (rs1799929)**

<b>NAT2 481C&gt;T (rs1799929)</b>	<b>Nhóm vô sinh (n = 170)</b>		<b>Nhóm chứng (n = 170)</b>		<b><math>\chi^2</math> (p)</b>	<b>OR</b>	<b>95%CI</b>
	<b>Số lượng</b>	<b>Tỷ lệ (%)</b>	<b>Số lượng</b>	<b>Tỷ lệ (%)</b>			
<b>Alen C</b>	254	74,7	306	90	27,36	0,33	0,21-0,50
<b>Alen T</b>	86	25,3	34	10	p<0,001	3,05	1,98-4,69

Từ bảng 3.8 ta thu được kết quả sau:

- Nhóm vô sinh: tỷ lệ alen C là 74,7%, tỷ lệ alen T là 25,3%.
- Nhóm chứng: tỷ lệ alen C là 90%, tỷ lệ alen T là 10,0%.

Ở gen NAT2, tại vị trí 481, tần số alen C chủ yếu gặp ở nhóm chứng, nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh có tần số alen C chỉ bằng 0,33 (OR = 0,33; 95%CI = 0,21-0,50). Sự khác biệt giữa 2 nhóm có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

Ở gen NAT2, tại vị trí 481, tần số alen T chủ yếu gặp ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh, người mang alen T khả năng bị thiếu tinh và vô tinh tăng 3,05 lần (OR = 3,05; 95%CI = 1,98-4,69). Sự khác biệt về tần số alen T giữa nhóm thiếu tinh, vô tinh với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với p<0,001.



### 3.3.4. Kết quả nghiên cứu đa hình gen NAT2 590 G>A (rs1799930)

**Bảng 3.9. Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình gen NAT2 590 G>A (rs1799930)**

NAT2 590 G>A (rs1799930)	Nhóm vô sinh (n = 170)		Nhóm chứng (n = 170)		$\chi^2$ (p)	OR	95%CI
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)			
GG	71	41,8	126	74,1	39,72 p<0,001	0,25	0,16-0,40
GA	91	53,5	44	25,9		3,30	2,09-5,21
GA+AA	99	58,2	44	25,9		3,99	2,52-6,32

Kết quả ở bảng 3.9 cho thấy:

- Nhóm vô sinh: Tỷ lệ mang gen bình thường GG là 41,8%, mang gen dị hợp tử là GA là 53,5% và 4,7% (8 trường hợp) có kiểu gen đồng hợp tử.

- Nhóm chứng: Tỷ lệ mang gen bình thường GG là 74,1%, mang gen dị hợp tử là 25,9% và không có trường hợp nào có kiểu gen đồng hợp tử.

Ở gen NAT2, tại vị trí 590, tần số kiểu gen đồng hợp GG chủ yếu gặp ở nhóm chứng, nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh tần số kiểu gen GG thấp (OR = 0,25; 95%CI = 0,16-0,40). Tần số kiểu gen GG ở nhóm thiếu tinh, vô tinh và nhóm chứng khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

Ở gen NAT2, tại vị trí 590, tần số kiểu gen dị hợp GA chủ yếu gặp ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh, ở người có kiểu gen GA, khả năng bị thiếu tinh, vô tinh tăng lên 3,3 lần (OR = 3,30; 95%CI = 2,09-5,21). Tần số kiểu gen GA ở nhóm thiếu tinh, vô tinh khác biệt với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

Ở gen NAT2, tại vị trí 590, tần số kiểu gen dị hợp GA và kiểu gen đồng hợp AA chủ yếu gặp ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh, cao hơn nhóm chứng. Tổng hợp kiểu gen GA và AA, khả năng bị thiếu tinh và vô tinh tăng lên 3,99 lần (OR = 3,99; 95%CI = 2,52-6,32). Tần số kiểu gen GA và AA ở nhóm chứng và nhóm vô sinh nguyên phát khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

**Bảng 3.10. Kết quả phân tích alen của đa hình gen NAT2 590 G>A  
(rs1799930)**

<b>NAT2 590 G&gt;A (rs1799930)</b>	<b>Nhóm vô sinh (n = 170)</b>		<b>Nhóm chứng (n = 170)</b>		<b><math>\chi^2</math> (p)</b>	<b>OR</b>	<b>95%CI</b>
	<b>Số lượng</b>	<b>Tỷ lệ (%)</b>	<b>Số lượng</b>	<b>Tỷ lệ (%)</b>			
<b>Alen G</b>	233	68,5	296	87,1	33,79	0,32	0,22-0,48
<b>Alen A</b>	107	31,5	44	12,9	p<0,001	3,09	2,09-4,57

Kết quả ở bảng 3.10 cho thấy:

- Nhóm vô sinh: tỷ lệ alen G là 68,5%, tỷ lệ alen A là 31,5%.
- Nhóm chứng: tỷ lệ alen G là 87,1%, tỷ lệ alen A là 12,9%.

Ở gen *NAT2*, tại vị trí 590, tần số alen G chủ yếu gặp ở nhóm chứng, nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh tần số alen G chỉ bằng 0,32 lần (OR = 0,32; 95%CI = 0,22-0,48). Sự khác biệt giữa 2 nhóm có ý nghĩa thống kê với  $p<0,001$ .

Ở gen *NAT2*, tại vị trí 590, tần số alen A chủ yếu gặp ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh, người mang alen A khả năng bị thiếu tinh và vô tinh tăng lên 3,09 lần (OR = 3,09; 95%CI = 2,09-4,57). Tần số alen A ở nhóm thiếu tinh, vô tinh và nhóm chứng khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p<0,001$ .

### 3.3.5. Kết quả nghiên cứu đa hình gen *GSTP1* 313G>A (*rs1695*)

**Bảng 3.11. Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình gen *GSTP1* 313G>A (*rs1695*)**

<i>GSTP1</i> 313G>A ( <i>rs1695</i> )	Nhóm vô sinh (n = 170)		Nhóm chứng (n = 170)		$\chi^2$ (p)	OR	95%CI
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)			
GG	90	52,9	145	85,3	46,94 p<0,001	0,19	0,12-0,33
GA	61	35,9	25	14,7		3,25	1,92-5,50
GA+AA	80	47,1	25	14,7		5,16	3,06-8,68

Kết quả ở bảng 3.11 cho thấy:

- Nhóm vô sinh: Tỷ lệ mang gen bình thường GG là 52,9%, mang gen dị hợp tử GA là 35,9% và 11,2% (19 trường hợp) có kiểu gen đồng hợp tử.

- Nhóm chứng: Tỷ lệ mang gen bình thường GG là 85,3%, mang gen dị hợp tử GA là 14,7% và không có trường hợp nào có kiểu gen đồng hợp tử.

Ở gen *GSTP1*, tại vị trí 313, tần số kiểu gen đồng hợp GG chủ yếu gặp ở nhóm chứng, nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh tần số kiểu gen GG chỉ bằng 0,19 lần (OR = 0,19; 95%CI = 0,12-0,33). Tần số kiểu gen GG ở nhóm thiếu tinh, vô tinh so với nhóm chứng khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

Ở gen *GSTP1*, tại vị trí 313, tần số kiểu gen dị hợp GA chủ yếu gặp ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh, người có kiểu gen GA có khả năng bị thiếu tinh và vô tinh tăng 3,25 lần (OR = 3,25; 95%CI = 1,92-5,50). Tần số kiểu gen dị hợp GA giữa nhóm thiếu tinh, vô tinh và nhóm chứng khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

Ở gen *GSTP1*, tại vị trí 313, tần số kiểu gen dị hợp GA và kiểu gen đồng hợp AA chủ yếu gặp ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh, tổng hợp kiểu gen dị hợp GA và kiểu gen đồng hợp AA cho thấy khả năng bị thiếu tinh và vô tinh tăng 5,16 lần (OR = 5,16; 95%CI = 3,06-8,68). Tần số kiểu gen dị hợp GA và kiểu gen đồng hợp AA khác biệt giữa nhóm thiếu tinh, vô tinh với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

**Bảng 3.12. Phân tích alen của đa hình gen GSTP1 313G>A (rs1695)**

<b><i>GSTP1</i> 313G&gt;A (rs1695)</b>	<b>Nhóm vô sinh (n = 170)</b>		<b>Nhóm chứng (n = 170)</b>		$\chi^2$ (p)	<b>OR</b>	<b>95%CI</b>
	<b>Số lượng</b>	<b>Tỷ lệ (%)</b>	<b>Số lượng</b>	<b>Tỷ lệ (%)</b>			
<b>Alen G</b>	241	<b>70,9</b>	315	<b>92,6</b>	54,01	0,19	0,12-0,31
<b>Alen A</b>	99	<b>29,1</b>	25	<b>7,4</b>	p<0,001	5,18	3,24-8,28

Kết quả ở bảng 3.12 cho thấy:

- Nhóm vô sinh: tỷ lệ alen G là 70,9%, tỷ lệ alen A là 29,1%.
- Nhóm chứng: tỷ lệ alen G là 92,6%, tỷ lệ alen A là 7,4%.

Ở gen *GSTP1*, tại vị trí 313, tần số alen G chủ yếu gặp ở nhóm chứng, nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh tần số alen G chỉ bằng 0,19 lần (OR = 0,19; 95%CI = 0,12-0,31). Tần số alen G ở nhóm thiếu tinh, vô tinh khác biệt với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

Ở gen *GSTP1*, tại vị trí 313, tần số alen A chủ yếu gặp ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh, người có alen A khả năng bị thiếu tinh, vô tinh tăng 5,18 lần (OR = 5,18; 95%CI = 3,24-8,28). Tần số alen A ở nhóm thiếu tinh và vô tinh khác biệt với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

### 3.3.6. Kết quả nghiên cứu đa hình gen *GSTP1* 341C>T(rs1138272)

**Bảng 3.13. Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình gen *GSTP1* 341C>T(rs1138272)**

<i>GSTP1</i> 341C>T (rs1138272)	Nhóm vô sinh (n = 170)		Nhóm chứng (n = 170)		$\chi^2$ (p)	OR	95%CI
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)			
CC	105	61,8	156	91,8	42,89 p<0,001	0,14	0,08-0,27
CT	65	38,2	14	8,2		6,90	3,68-12,93
CT+TT	65	38,2	14	8,2		6,90	3,68-12,93

Kết quả ở bảng 3.13 cho thấy:

- Nhóm vô sinh: tỷ lệ mang gen bình thường CC là 61,8%, mang gen dị hợp tử CT là 38,2%.

- Nhóm chứng: tỷ lệ mang gen bình thường CC là 91,8%, mang gen dị hợp tử CT là 8,2%.

Ở gen *GSTP1*, tại vị trí 341, tần số kiểu gen đồng hợp CC chủ yếu gặp ở nhóm chứng, nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh tần số kiểu gen CC chỉ bằng 0,14 lần (OR = 0,14; 95%CI = 0,08-0,27). Tần số kiểu gen đồng hợp CC ở nhóm thiếu tinh, vô tinh khác biệt với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

Ở gen *GSTP1*, tại vị trí 341, tần số kiểu gen dị hợp CT chủ yếu gặp ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh, ở người có kiểu gen dị hợp CT, khả năng bị thiếu tinh, vô tinh tăng 6,9 lần (OR = 6,90; 95%CI = 3,68-12,93). Tần số kiểu gen dị hợp CT ở nhóm thiếu tinh, vô tinh khác biệt với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

**Bảng 3.14. Kết quả phân tích alen của đa hình gen *GSTP1*  
341C>T(rs1138272)**

<i>GSTP1</i> 341C>T (rs1138272)	Nhóm vô sinh (n = 170)		Nhóm chứng (n = 170)		$\chi^2$ (p)	OR	95%CI
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)			
<b>Alen C</b>	275	80,9	326	95,9	37,25	0,18	0,10-0,33
<b>Alen T</b>	65	19,1	14	4,1	p<0,001	5,50	3,02-10,02

Kết quả ở bảng 3.14 cho thấy:

- Nhóm vô sinh: tỷ lệ alen C là 80,9%, tỷ lệ alen T là 19,1%.
- Nhóm chứng: tỷ lệ alen C là 95,9%, tỷ lệ alen T là 4,1%.

Ở gen *GSTP1*, tại vị trí 341, tần số alen C chủ yếu gặp ở nhóm chứng, nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh tần số alen C chỉ bằng 0,18 lần (OR = 0,19; 95%CI = 0,12-0,31). Tần số alen C ở nhóm thiếu tinh, vô tinh khác biệt với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

Ở gen *GSTP1*, tại vị trí 341, tần số alen T chủ yếu gặp ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh, người có alen T khả năng bị thiếu tinh, vô tinh tăng 5,5 lần (OR = 5,50; 95%CI = 3,02-10,02). Tần số alen T ở nhóm thiếu tinh, vô tinh khác biệt so với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

### 3.4. Mối liên quan giữa đa hình gen *GSTP1*; *NAT2* và *CYP1A1* với vô sinh nam

#### 3.4.1. Mối liên quan giữa đa hình gen *GSTP1*; *NAT2* và *CYP1A1* giữa nhóm vô sinh và nhóm chứng

**Bảng 3.15. Kết quả phân tích kiểu gen kết hợp 2 đa hình *NAT2* và *GSTP1* ở nhóm vô sinh và nhóm chứng**

Mối liên quan giữa <i>NAT2</i> và <i>GSTP1</i>	Nhóm vô sinh (n = 170)	Nhóm chứng (n = 170)	OR	95%CI
<b><i>NAT2(481C&gt;T) và GSTP1(313G&gt;A)</i></b>				
481CC và 313GG	41(24,1%)	116(68,2%)	0,15	0,09 - 0,24
481CC và (313GA hoặc 313AA)	43(25,3%)	20(11,8%)	2,54	1,42 - 4,54
313GG và (481 CT hoặc 481TT)	49(28,8%)	29(17,1%)	1,97	1,17 - 3,31
(481CT hoặc 481TT) và (313GA hoặc 313AA)	37(21,8%)	5(2,9%)	9,18	3,51 - 24,01
<b><i>NAT2(481C&gt;T) và GSTP1(341C&gt;T)</i></b>				
481CC và 341CC	42(24,7%)	128(75,3%)	0,11	0,07 - 0,18
481CC và (341CT hoặc 341TT)	42(24,7%)	8(4,7%)	6,64	3,01 - 14,65
341CC và (481 CT hoặc 481TT)	63(37,1%)	28(16,5%)	2,99	1,79 - 4,98
(481CT hoặc 481TT) và (341CT hoặc 341TT)	23(13,5%)	6(3,5%)	4,28	1,69 - 10,79

<b><i>NAT2(590G&gt;A) và GSTP1(313G&gt;A)</i></b>				
590GG và 313GG	33(19,4%)	108(63,5%)	0,14	0,08 - 0,23
590GG và (313GA hoặc 313AA)	38(22,4%)	18(10,6%)	2,43	1,32 - 4,46
313GG và (590GA hoặc 590AA)	57(33,5%)	37(21,8)	1,81	1,12 - 2,94
(590GA hoặc 590AA) và (313GA hoặc 313AA)	42(24,7%)	7(4,1%)	7,64	3,32 - 17,57
<b><i>NAT2(590G&gt;A) và GSTP1(341C&gt;T)</i></b>				
590GG và 341CC	41(24,1%)	117(68,8%)	0,14	0,09 - 0,23
590GG và (341CT hoặc 341TT)	64(37,6%)	39(22,9%)	2,03	1,26 - 3,26
341CC và (590GA hoặc 590AA)	30(17,6%)	9(5,3%)	3,83	1,76 - 8,35
(590GA hoặc 590AA) và (341CT hoặc 341TT)	35(20,6%)	5(2,9%)	8,56	3,26 - 22,44

Kết quả ở bảng 3.15 cho thấy:

- Khi xem xét sự có mặt đồng thời của cả hai đa hình *NAT2(481C>T)* và *GSTP1(313G>A)* trong kiểu gen, ta thấy:
  - Kiểu gen chỉ mang một loại đa hình thì nguy cơ bị thiếu tinh năng hoặc vô tinh sẽ tăng lên:
    - ✓ 2,54 lần đối với kiểu gen 481CC và (313GA hoặc 313AA).
    - ✓ 1,97 lần đối với kiểu gen 313GG và (481 CT hoặc 481TT).
  - Ở kiểu gen mang cả hai loại đa hình (481CT hoặc 481TT) và (313GA hoặc 313AA) thì nguy cơ bị thiếu tinh năng hoặc vô tinh tăng 9,18 lần (OR = 9,18; 95%CI = 3,51 - 24,01).



- Khi xem xét sự có mặt đồng thời của cả hai đa hình *NAT2(481C>T)* và *GSTP1(341C>T)* trong kiểu gen, ta thấy:

- Kiểu gen chỉ mang một loại đa hình thì nguy cơ bị thiếu tinh nặng hoặc vô tinh sẽ tăng lên:

- ✓ 6,64 lần đối với kiểu gen 481CC và (341CT hoặc 341TT).

- ✓ 2,99 lần đối với kiểu gen 341CC và (481 CT hoặc 481TT).

- Ở kiểu gen mang cả hai loại đa hình (481CT hoặc 481TT) và (341CT hoặc 341TT) thì nguy cơ bị thiếu tinh nặng hoặc vô tinh tăng 4,28 lần (OR = 4,28; 95% CI = 1,69 - 10,79).

- Khi xem xét sự có mặt đồng thời của cả hai đa hình *NAT2(590G>A)* và *GSTP1(313G>A)* trong kiểu gen, ta thấy:

- Kiểu gen chỉ mang một loại đa hình thì nguy cơ bị thiếu tinh nặng hoặc vô tinh sẽ tăng lên:

- ✓ 2,43 lần đối với kiểu gen 590GG và (313GA hoặc 313AA).

- ✓ 1,81 lần đối với kiểu gen 313GG và (590GA hoặc 590AA).

- Ở kiểu gen mang cả hai loại đa hình (590GA hoặc 590AA) và (313GA hoặc 313AA) thì nguy cơ bị thiếu tinh nặng hoặc vô tinh tăng 7,64 lần (OR = 7,64; 95%CI = 3,32 - 17,57).

- Khi xem xét sự có mặt đồng thời của cả hai đa hình *NAT2(590G>A)* và *GSTP1(341C>T)* trong kiểu gen, ta thấy:

- Kiểu gen chỉ mang một loại đa hình thì nguy cơ bị thiếu tinh nặng hoặc vô tinh sẽ tăng lên:

- ✓ 2,03 lần đối với kiểu gen 590GG và (341CT hoặc 341TT).

- ✓ 3,83 lần đối với kiểu gen 341CC và (590GA hoặc 590AA).

- Ở kiểu gen mang cả hai loại đa hình (590GA hoặc 590AA) và (341CT hoặc 341TT) thì nguy cơ bị thiếu tinh nặng hoặc vô tinh tăng 8,56 lần (OR = 8,56; 95%CI = 3,26 - 22,44).

**Bảng 3.16. Kết quả phân tích kiểu gen kết hợp 2 đa hình CYP1A1 và NAT2 ở nhóm vô sinh và nhóm chứng**

Mối liên quan giữa NAT2 và CYP1A1	Nhóm vô sinh (n = 170)	Nhóm chứng (n = 170)	OR	95%CI
<b>NAT2 (481C&gt;T) và CYP1A1 (2455A&gt;G)</b>				
481CC và 2455AA	44 (25,9%)	111 (65,3%)	0,19	0,12 - 0,30
481CC và (2455AG hoặc 2455GG)	40 (23,5%)	25 (14,7%)	1,78	1,03 - 3,10
2455AA và (481 CT hoặc 481TT)	34 (20%)	23 (13,5%)	1,60	0,90 - 2,85
(481CT hoặc 481TT) và (2455AG hoặc 2455GG)	52 (30,6%)	11 (6,5%)	6,37	3,19 -12,73
<b>NAT2 (590G&gt;A) và CYP1A1 (2455A&gt;G)</b>				
590GG và 2455AA	36 (21,2%)	106 (62,4%)	0,16	0,10 - 0,26
590GG và (2455AG hoặc 2455GG)	35 (20,6%)	20 (11,8%)	1,94	1,07 - 3,53
2455AA và (590GA hoặc 590AA)	42 (24,7%)	28 (16,5%)	1,66	0,98 - 2,84
(590GA hoặc 590AA) và (2455AG hoặc 2455GG)	57 (33,5%)	16 (9,4%)	4,86	2,65 - 8,89

Kết quả ở bảng 3.16 cho thấy:

- Khi xem xét sự có mặt đồng thời của cả hai đa hình *NAT2(481C>T)* và *CYP1A1 (2455A>G)* trong kiểu gen, ta thấy:
  - Kiểu gen chỉ mang một loại đa hình thì nguy cơ bị thiếu tinh năng hoặc vô tinh sẽ tăng lên:
    - ✓ 1,78 lần đối với kiểu gen 481CC và (2455AG hoặc 2455GG).
    - ✓ 1,6 lần đối với kiểu gen 2455AA và (481 CT hoặc 481TT).
  - Ở kiểu gen mang cả hai loại đa hình (481CT hoặc 481TT) và (2455AG hoặc 2455GG) thì nguy cơ bị thiếu tinh năng hoặc vô tinh tăng 6,37 lần (OR = 6,37; 95%CI = 3,19 -12,73).
- Khi xem xét sự có mặt đồng thời của cả hai đa hình *NAT2(590G>A)* và *CYP1A1 (2455A>G)* trong kiểu gen, ta thấy:
  - Kiểu gen chỉ mang một loại đa hình thì nguy cơ bị thiếu tinh năng hoặc vô tinh sẽ tăng lên:
    - ✓ 1,94 lần đối với kiểu gen 590GG và (2455AG hoặc 2455GG).
    - ✓ 1,66 lần đối với kiểu gen 2455AA và (590GA hoặc 590AA).
  - Ở kiểu gen mang cả hai loại đa hình (590GA hoặc 590AA) và (2455AG hoặc 2455GG) thì nguy cơ bị thiếu tinh năng hoặc vô tinh tăng 4,86 lần (OR = 4,86; 95%CI = 2,65 - 8,89).

**Bảng 3.17. Kết quả phân tích kiểu gen kết hợp 2 đa hình GSTP1 và CYP1A1 ở nhóm vô sinh và nhóm chứng**

Mối liên quan giữa GSTP1 và CYP1A1	Nhóm vô sinh (n = 170)	Nhóm chứng (n = 170)	OR	95%CI
<b>GSTP1(313G&gt;A) và CYP1A1 (2455A&gt;G)</b>				
313GG và 2455AA	35(20,6%)	120(70,6%)	0,11	0,07 - 0,18
313GG và (2455AG hoặc 2455GG)	43(25,3%)	14(8,2%)	3,77	1,98 - 7,21
2455AA và (313GA hoặc 313AA)	55(32,4%)	25(14,7%)	2,77	1,63 - 4,72
(313GA hoặc 313AA) và (2455AG hoặc 2455GG)	37(21,8%)	11(6,5%)	4,02	1,97 - 8,19
<b>GSTP1(341C&gt;T) và CYP1A1 (2455A&gt;G)</b>				
341CC và 2455AA	40(23,5%)	123(72,4%)	0,12	0,07 - 0,19
341CC và (2455AG hoặc 2455GG)	65(38,2%)	33(19,4%)	2,57	1,57 - 4,20
2455AA và (341CT hoặc 341TT)	38(22,4%)	11(6,5%)	4,16	1,57 - 4,20
(341CT hoặc 341TT) và (2455AG hoặc 2455GG)	27(15,9%)	3(1,8%)	10,51	3,12- 35,37

Kết quả ở bảng 3.17 cho thấy:

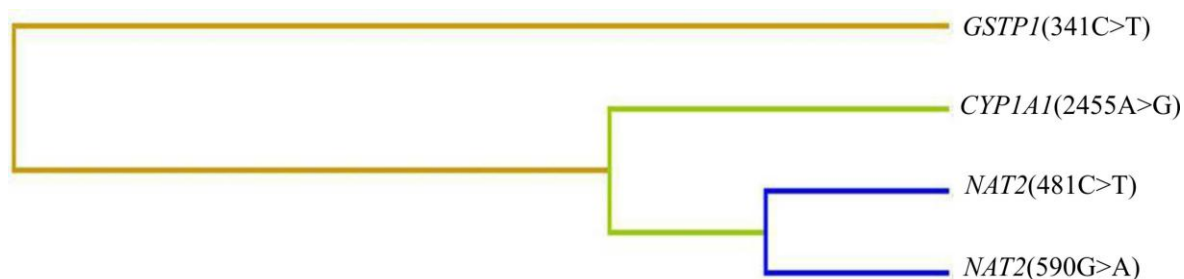
- Khi xem xét sự có mặt đồng thời của cả hai đa hình *GSTP1(313G>A)* và *CYP1A1(2455A>G)* trong kiểu gen, ta thấy:
  - Kiểu gen chỉ mang một loại đa hình thì nguy cơ bị thiếu tinh năng hoặc vô tinh sẽ tăng lên:
    - ✓ 3,77 lần đối với kiểu gen 313GG và (2455AG hoặc 2455GG).
    - ✓ 2,77 lần đối với kiểu gen 2455AA và (313GA hoặc 313AA).
  - Ở kiểu gen mang cả hai loại đa hình (313GA hoặc 313AA) và (2455AG hoặc 2455GG) thì nguy cơ bị thiếu tinh năng hoặc vô tinh tăng 4,02 lần (OR = 4,02; 95%CI = 1,97 - 8,19).
- Khi xem xét sự có mặt đồng thời của cả hai đa hình *GSTP1(341C>T)* và *CYP1A1(2455A>G)* trong kiểu gen, ta thấy:
  - Kiểu gen chỉ mang một loại đa hình thì nguy cơ bị thiếu tinh năng hoặc vô tinh sẽ tăng lên:
    - ✓ 2,57 lần đối với kiểu gen 341CC và (2455AG hoặc 2455GG).
    - ✓ 4,16 lần đối với kiểu gen 2455AA và (341CT hoặc 341TT).
  - Ở kiểu gen mang cả hai loại đa hình (341CT hoặc 341TT) và (2455AG hoặc 2455GG) thì nguy cơ bị thiếu tinh năng hoặc vô tinh tăng 10,51 lần (OR = 10,51; 95%CI = 3,12- 35,37).

**Bảng 3.18. Tổ hợp tương tác gen có giá trị nhất ở các locus của các đa hình gen hệ thống Xenobiotics ở bệnh nhân vô sinh nam**

Các kiểu tương tác 2, 3, 4, 5 locus	Độ tái lập (%)	Lỗi dự đoán	
		Thực nghiệm (%)	Lý thuyết (%)
<i>GSTP1</i> (341C>T) và <i>CYP1A1</i> (2455A>G)	50	14,1	38,9
<i>GSTP1</i> (341C>T) và <i>CYP1A1</i> (2455A>G) và <i>NAT2</i> (590G>A);	100	30,8	46,4
<i>GSTP1</i> (341C>T) và <i>CYP1A1</i> (2455A>G) và <i>NAT2</i> (590G>A) và <i>NAT2</i> (481C>T)	100	22,3	52,5

Kết quả ở bảng 3.18 cho thấy:

Từ tất cả khả năng tương tác gen, tổ hợp có giá trị nhất là kiểu tổ hợp *GSTP1*(341C>T) và *CYP1A1*(2455A>G) và *NAT2*(590G>A); với độ tái lập 100%, lỗi dự đoán 30,8% (theo Monte-Carlo,  $p < 0,01$ , lỗi dự đoán cho phép là <46,4%) và kiểu tổ hợp *GSTP1*(341C>T) và *CYP1A1*(2455A>G) và *NAT2*(590G>A) và *NAT2*(481C>T) với độ tái lập 100% và lỗi dự đoán là 22,3% (lỗi dự đoán cho phép <52,5%).



**Biểu đồ 3.1. Các kiểu tổ hợp gen có giá trị tiên đoán cao nhất**

Kết quả ở bảng trên cho thấy: Trên cơ sở của mô hình xây dựng bằng phần mềm MDR chúng tôi tiến hành phân tích gom nhóm (clustering) các tổ hợp gen và xây dựng bản đồ cây (Dendrogram). Mô hình cho thấy tổ hợp giữa các đa hình gen *GSTP1*(341C>T) và *CYP1A1*(2455A>G) và *NAT2*(590G>A); hoặc *GSTP1*(341C>T) và *CYP1A1*(2455A>G) và *NAT2*(481C>T) biểu hiện tương tác cộng gộp, trong đó *CYP1A1*(2455A>G) và *NAT2*(590G>A) hoặc *CYP1A1*(2455A>G) và *NAT2*(481C>T) là tương tác hỗ trợ.

### ***3.4.2. Mối liên quan giữa mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch ở bệnh nhân nam có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics***

Trong bộ kit Oxisperm, mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch được chia làm 4 mức từ 1 đến 4. Trên cơ sở đó, trong nghiên cứu này chúng tôi chia số lượng bệnh nhân thành 2 nhóm: Nhóm HOS có mức độ stress oxy hóa cao (gồm mức độ OS 3 và 4) và nhóm LOS có mức độ stress oxy hóa thấp (gồm mức độ OS 1 và 2).

Nhóm bệnh là những bệnh nhân có tinh trùng trong tinh dịch và có ít nhất một đa hình gen chuyển hóa xenobiotics. Nhóm chứng là những đối tượng nghiên cứu không có bất kỳ đa hình gen nào đã kể trên. Trên cơ sở đó chúng tôi thu được 71 bệnh nhân ở nhóm bệnh và 72 bệnh nhân ở nhóm chứng trong nghiên cứu này.

***Bảng 3.19. Sự phân bố các mức độ OS trên nhóm bệnh và nhóm chứng***

Mức OS	Nhóm bệnh (n = 71)		Nhóm chứng (n = 72)		$\chi^2$ (p)	OR	(95% CI)
	n <sub>1</sub>	%	n <sub>2</sub>	%			
<b>HOS</b>	56	78,9	8	11,1	66,39	29,87	11.78 - 75.70
<b>LOS</b>	15	21,1	64	88,9	p<0,001	0,03	0.01 - 0.08

Kết quả ở bảng 3.19 cho thấy:

- Ở nhóm bệnh, tỷ lệ bệnh nhân có mức OS cao (HOS) là 78,9% và tỷ lệ bệnh nhân có mức OS thấp (LOS) là 21,1%.

- Ngược lại, ở nhóm chứng, tỷ lệ bệnh nhân có mức OS cao (HOS) chỉ chiếm 11,1%, trong khi đó tỷ lệ bệnh nhân có mức OS thấp là 88,9%.

- Những nam giới vô sinh có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics, có nguy cơ tăng mức độ stress oxy hóa hơn những người bình thường 29,87 lần (OR = 29,87, 95% CI = 11,78 - 75,70).

➤ *Mối liên quan giữa mức độ stress oxy hóa và số lượng đa hình gen chuyển hóa xenobiotics ở nhóm bệnh*

Xét riêng sự phân bố mức độ stress oxy hóa ở nhóm bệnh với số lượng các đa hình gen chuyển hóa xenobiotics chúng tôi thu được kết quả sau:

**Bảng 3.20. Sự phân bố số lượng đa hình gen chuyển hóa xenobiotics giữa các mức OS ở nhóm bệnh**

Số lượng đa hình	Nhóm HOS (n = 56)		Nhóm LOS (n = 15)		$\chi^2$	p
	n <sub>1</sub>	%	n <sub>2</sub>	%		
≥ 2	49	87,5	11	73,3	1,81	0,4
1	7	12,5	4	26,7		



Kết quả ở bảng 3.20 cho thấy:

- Nhóm HOS (mức OS cao) có 49 bệnh nhân có từ 2 đa hình gen chuyển hóa xenobiotics trở lên và chiếm 87,5%, chỉ có 7 bệnh nhân có tối đa 1 đa hình gen chuyển hóa xenobiotics chiếm 12,5%.

- Nhóm LOS (mức OS thấp) có 11 bệnh nhân có từ 2 đa hình gen chuyển hóa xenobiotics trở lên chiếm 73,3% và có 4 bệnh nhân có 1 đa hình gen chuyển hóa xenobiotics và chỉ chiếm 26,7%.

Về mức độ oxy hóa trong tinh dịch, tuy chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm có  $\geq 2$  đa hình và nhóm còn lại (có thể do cỡ mẫu còn chưa lớn với nhóm thiếu tinh), nhưng nhìn chung nhóm có  $\geq 2$  đa hình có xu hướng mức oxy hóa cao hơn nhóm còn lại.

## **Chương 4**

### **BÀN LUẬN**

#### **4.1. Về độ tin cậy của phương pháp ARMS - PCR dùng trong nghiên cứu**

ARMS - PCR là kỹ thuật dùng mồi đặc hiệu bắt đúng vào chỗ thay đổi cần nghiên cứu, phương pháp này không chỉ ra trực tiếp nucleotide thay đổi là gì mà chỉ cho biết có biến đổi cần tìm hay không. Nói cách khác đây là phương pháp gián tiếp phát hiện thay đổi nucleotide. Để kiểm định kết quả xác định có đúng nucleotide thay đổi không thì giải trình tự là biện pháp kiểm chứng chính xác. Nghiên cứu kiểm chứng lại kết quả ARMS - PCR bằng phương pháp giải trình tự 10 mẫu đã được xác định đa hình gen bằng phương pháp ARMS - PCR cho thấy kết quả xác định đa hình 2455A>G của gen *CYP1A1*, 481C>T và 590G>A của gen *NAT2*, 313G>A và 341C>T của gen *GSTP1* bằng phương pháp ARMS - PCR đúng với với kết quả giải trình tự. Như vậy, với bộ kit của hãng Lytech, Nga đã có sẵn mồi dùng để phát hiện các đa hình 2455A>G của gen *CYP1A1*, 481C>T và 590G>A của gen *NAT2*, 313G>A và 341C>T của gen *GSTP1*, dùng kỹ thuật ARMS-PCR là có thể phát hiện chính xác các đa hình này.

Mặc dù dựa trên kỹ thuật Sanger, nhưng thiết bị giải trình tự tự động hiện nay đã sử dụng huỳnh quang, chứ không phải phóng xạ để đánh dấu. Mỗi màu sẽ tương ứng cho một nucleotide, điều này có nghĩa là khi giải trình tự mỗi đoạn DNA chỉ cần một lần trong một gel thay vì bốn. Sau điện di, trình tự base có thể được đọc từ gel qua máy tính được trang bị thấu kính và bộ khuếch đại. Công nghệ trên không phải là rẻ với giá từ 2 đôla đến 5 đôla cho mỗi base được giải trình tự, nhưng việc đọc DNA trở nên thực tiễn hơn.

ARMS - PCR là kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen biến đổi do dùng TaqADN polymerase, nó chỉ khuếch đại khi đầu 3' của mồi và sợi khuôn bổ

xung hoàn toàn với nhau. Khi đầu 3' của mỗi không bổ xung với sợi khuôn phản ứng PCR bị ức chế hoàn toàn. Dựa trên nguyên lý này, kỹ thuật cho phép khuếch đại đặc hiệu một trình tự biến đổi ngay cả trong trường hợp alen biến đổi đó chiếm tỷ lệ rất nhỏ trong tổng số sợi khuôn ADN. Kỹ thuật này cho kết quả chính xác, thời gian thực hiện ngắn, giá thành thấp và quy trình kỹ thuật đơn giản hơn so với giải trình tự nhiều. Bộ kit chúng tôi sử dụng để xác định đa hình các gen mã hóa enzym chuyển hóa xenobiotic là những bộ kit đạt chuẩn IVD và được sử dụng rộng rãi ở nhiều nước Châu Âu. Hạn chế của ARMS-PCR là chỉ phát hiện các thay đổi nucleoid đã biết, không phát hiện được các biến đổi mới. Tuy nhiên, nếu đã được gợi ý các biến đổi từ trước thì đây là kỹ thuật phù hợp nên dùng.

Qua nghiên cứu chúng tôi nhận thấy: một số đa hình 2455A>G của gen *CYP1A1*, 481C>T và 590G>A của gen *NAT2*, 313G>A và 341C>T của gen *GSTP1* bằng 2 kỹ thuật ARMS - PCR và giải trình tự đều cho kết quả hoàn toàn giống nhau, không có trường hợp âm tính giả hay dương tính giả. Từ đó chúng tôi thấy kỹ thuật ARMS - PCR phát hiện đa hình hình 2455A>G của gen *CYP1A1*, 481C>T và 590G>A của gen *NAT2*, 313G>A và 341C>T của gen *GSTP1* theo bộ kit của hãng Lytech cho kết quả chính xác. Như vậy, kỹ thuật ARMS - PCR có khả năng dùng xác định nhanh các đa hình này.

Khi tiến hành kỹ thuật ARMS - PCR, các bước của quy trình cũng tinh gọn và đơn giản hơn giải trình tự. Khi giải trình tự, cần phải thực hiện kỹ thuật PCR khuếch đại đoạn gen đích lên một số lượng đủ lớn, điện di xem có hay không có sản phẩm PCR, sản phẩm PCR đã đạt chất lượng chưa, sau đó tinh sạch sản phẩm PCR để được các đoạn gen tinh khiết làm nguyên liệu cho giải trình tự. Như vậy, khi dùng kỹ thuật ARMS - PCR đã tinh gọn được 3 bước thực hiện thủ công so với giải trình tự, giúp cho người thực hiện tiết kiệm được nhiều thời gian và hóa chất, đồng thời giảm sai sót do nguyên nhân

chủ quan trong quá trình thực hiện cũng như giảm chi phí và thời gian chờ đợi cho bệnh nhân.

Mặt khác, để giải trình tự cần đầu tư chi phí rất lớn cho máy giải trình tự gen và các hóa chất, thiết bị đi kèm cũng như cần chi phí cho đào tạo kỹ thuật viên thực hiện lớn hơn so với máy PCR, do đó, kỹ thuật ARMS - PCR có khả năng ứng dụng cao hơn tại các cơ sở thực hành lâm sàng khám. Các máy giải trình tự ở nước ta hiện nay hầu hết mới chỉ được đầu tư cho các cơ sở nghiên cứu đầu ngành.

#### **4.2. Đặc điểm về tuổi của đối tượng nghiên cứu**

Đối tượng nghiên cứu của chúng tôi gồm 170 nam vô sinh nguyên phát, có thiếu tinh năng và vô tinh và 170 người khỏe mạnh chia làm hai nhóm nhóm vô sinh và nhóm chứng. Kết quả ghi nhận độ tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân vô sinh là  $31,43 \pm 5,548$ , người trẻ tuổi nhất là 18 tuổi, người cao tuổi nhất là 50 tuổi. Đối với nhóm chứng, tuổi thấp nhất là 22, cao nhất là 50 tuổi; độ tuổi trung bình là  $31,94 \pm 5,074$ . Không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê đối với tuổi trung bình giữa hai nhóm nghiên cứu ( $p = 0,381$ ). Như vậy là 2 nhóm nghiên cứu tương đồng với nhau về điều kiện tuổi, đảm bảo kết quả về đa hình gen chuyển hóa xenobiotics, mức độ thiếu tinh không phải do tuổi.

Nghiên cứu của Yufeng Qin và cs (2013) ở Trung Quốc, tuổi trung bình của 589 nam giới vô sinh là  $28,41 \pm 4,61$  [136]. Nghiên cứu của Sonia Brahem và cs (2011) trên 140 nam giới vô sinh cho thấy độ tuổi trung bình của nhóm nam giới vô sinh là 37,65, trong đó nhóm tuổi 30-40 chiếm tỷ lệ cao nhất là 56,83% [137]. Nghiên cứu của M. Dorostghoal và cs (2016) ở Iran trên 105 nam giới vô sinh thì độ tuổi trung bình là 36 trong đó tuổi thấp nhất là 32, lớn nhất là 40 [138]. Aleksandra Kasperczyk và cs (2015) ở Phần Lan nghiên cứu trên 35 nam giới vô sinh thì độ tuổi trung bình là  $31,7 \pm 5,09$  [139].

Như vậy, độ tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu của chúng tôi cao hơn một chút so với nghiên cứu của tác giả Yufeng Quin tại Trung Quốc, và thấp hơn so với các nghiên cứu ở các nước ở phương Tây. Điều này có thể giải thích là độ tuổi kết hôn ở Việt Nam thấp hơn so với các nước phương Tây, đồng thời việc quan tâm đến sức khỏe người dân đã tốt hơn trước, vì vậy họ đã đi khám sớm hơn. Ở phương Tây, nam giới lập gia đình muộn hơn so với Việt Nam, do đó nam giới đi khám và điều trị vô sinh cũng muộn hơn [84], [86], [87],[112],[136],[137],[138],[139].

Tại Việt Nam, nghiên cứu của Nguyễn Đức Nhự (2015) cho thấy nam giới vô sinh đi khám và điều trị có tuổi thấp nhất là 20 và cao nhất là 55, độ tuổi trung bình là  $31,98 \pm 5,71$  [27]. Nghiên cứu của Trần Đức Phần (2009) cũng cho thấy tỷ lệ bệnh nhân thiếu năng sinh sản chiếm tỷ lệ cao ở nhóm tuổi 30-39 [140]. Như vậy, số liệu trong nghiên cứu của chúng tôi là phù hợp với các nghiên cứu của các tác giả trên tại Việt Nam.

### **4.3. Bàn về các biến đổi nucleotid của các gen *CYP1A1*, *NAT2*, *GSTP1* với vô sinh**

#### **4.3.1. Phân bố kiểu gen và sự tương ứng với cân bằng Hardy-Weinberg ở nhóm vô sinh và nhóm chứng**

Khi so sánh sự phân bố kiểu gen ở nhóm chứng và nhóm vô sinh. Nhận thấy sự phân bố kiểu gen ở nhóm chứng phù hợp với sự phân bố trong quần thể theo định luật Hary-Weinberg với mức độ dị hợp tử ở các đa hình đều cao hơn mức độ dị hợp tử lý thuyết. Trong khi đó ở nhóm vô sinh, trừ 313G>A gen *GSTP1*, tất cả các kiểu gen khác có sự phân bố khác với phân bố Hary-Weinberg. Đa hình 313G>A gen *GSTP1* có mức độ dị hợp tử thấp hơn so với mức độ dị hợp tử theo Hardy-Weinberg. Sự phân bố các kiểu gen ở nhóm chứng phải phù hợp với sự phân bố Hardy-Weinberg, còn ở nhóm vô sinh có

thể khác biệt hoặc không khác biệt với sự phân bố Hardy-Weinberg. Như vậy sự phân bố kiểu gen trong nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với yêu cầu của định luật Hardy-Weinberg về phân bố kiểu gen trong quần thể người bình thường và người bị bệnh.

#### ***4.3.2. Sự phân bố kiểu gen và mối liên quan giữa đa hình gen CYP1A1 2455A>G với vô sinh nam nguyên phát***

Fritsche E. và cs là nhóm tác giả đầu tiên nghiên cứu về vai trò của các gen chuyển hóa xenobiotics trong vô sinh nam ở cộng đồng người Đức gồm 134 nam giới vô sinh. Nhóm tác giả này đã nghiên cứu về 2 đa hình gen *CYP1A1* gồm I462V và MspI [100]. Tuy nhiên kết quả không tìm thấy mối liên quan giữa các đa hình trên với vô sinh nam. Một nghiên cứu khác cũng tại Đức khi khảo sát 58 trường hợp nam giới mắc hội chứng OAT, kết quả chỉ ra rằng kiểu gen 462IV có nguy cơ cao gây vô sinh [88].

Gen *CYP1A1* mã hóa cho enzym tham gia vào giai đoạn I của quá trình chuyển hóa xenobiotics trong cơ thể. Nó đóng vai trò chính trong chuyển hóa và thải trừ các hợp chất hydrocacbon thơm đa vòng có nhiều trong khói thuốc lá, thịt nướng,... Nhiều nghiên cứu đã khẳng định đa hình gen *CYP1A1* có liên quan chặt chẽ với vô sinh nam giới: Luo H. (2014) [97], Nejati M. (2016) [141], Ramgir S.S. (2017) [99].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát sự phân bố kiểu gen và phân tích mối liên quan tới vô sinh nam của đa hình 2455A>G gen *CYP1A1* trên 170 nam giới vô sinh và 170 người khỏe mạnh. Kết quả ghi nhận: ở nhóm vô sinh có 45,9% mang kiểu gen AA, 52,4% mang kiểu gen dị hợp tử AG, có 3 trường hợp (1,8%) mang kiểu gen đồng hợp tử GG. Nhóm chứng, kiểu gen AA chiếm 78,8%, kiểu gen dị hợp tử AG là 21,2 không có trường hợp nào mang kiểu gen đồng hợp tử GG.

Kết quả phân tích còn cho thấy kiểu gen AG làm tăng khả năng bị thiếu tinh và vô tinh lên gấp 4,09 lần so với nhóm chứng (OR = 4,09; 95%CI = 2,54-6,58); Kiểu gen đồng hợp GG và kiểu gen dị hợp AG làm tăng khả năng bị vô sinh nguyên phát (thiếu tinh hoặc vô tinh) 4,39 lần so với nhóm chứng (AG+GG: OR = 4,39; 95%CI = 2,73-7,07). Sự khác biệt giữa nhóm bệnh nhân thiếu tinh, vô tinh với nhóm chứng là có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ . Alen G làm tăng khả năng bị vô sinh nguyên phát lên 3,27 lần so với nhóm chứng (OR = 3,27; 95%CI = 2,15-4,98; với  $p < 0,001$ ). Như vậy mang alen G làm tăng nguy cơ vô sinh ở nam giới, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ .

Theo nghiên cứu của Yarosh S.L. (2013), nguy cơ vô sinh tăng lên đáng kể ở những nam giới mang kiểu gen 2455A>G gen *CYP11A1* khi có kèm theo hút thuốc lá (OR = 1,91; 95%CI = 1,01-3,59), những người không hút thuốc lá ít bị ảnh hưởng hơn (OR = 1,58; CI 95% 0,66-3,76) [142].

Một số tác giả khác khi nghiên cứu cũng cho thấy đa hình gen *CYP11A1* ở một vài vị trí nhưng chủ yếu là ở vị trí 2455 và làm tăng khả năng bị vô sinh [91],[92],[93].

Nghiên cứu của Aydos S.E. (2009) về đa hình 2455A>G gen *CYP11A1* trên 110 nam giới vô sinh người Thổ Nhĩ Kỳ và 115 người sinh đẻ bình thường. Kết quả cho thấy sự phân bố kiểu gen chứa alen đa hình (AG, GG) chủ yếu gặp ở nhóm bệnh nhân vô sinh, sự khác biệt giữa nhóm vô sinh và nhóm người bình thường là có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ . Ngoài ra, nghiên cứu cũng chỉ ra rằng kiểu gen AG gặp nhiều ở người nam vô sinh (OR = 3,65; 95%CI = 1,68 - 7,94;  $p < 0,001$ ) và alen G làm gia tăng nguy cơ vô sinh ở nam giới lên 3,67 lần (OR = 3,67; 95%CI = 1,76-7,61;  $p < 0,01$ ) [3]. Tương tự, nghiên cứu của Lu N. và cs trên 192 nam giới người Trung Quốc bị

vô sinh đã nhận thấy kiểu gen 462IV của gen *CYP1A1* liên quan đến vô sinh nam [101].

Nejati M. (2016), đã nghiên cứu mối liên hệ của đa hình gen *CYP1A1* ở vị trí T3801C (rs4646903) trong gen với tình trạng vô sinh ở nam giới ở Iran [141]. Kết quả cho thấy có một mối liên quan đáng kể về kiểu gen CC (OR = 3,00, 95% CI = 1,20- 7,48, P = 0,018) và alen C (OR = 1,93, 95% CI = 1,09- 3,39, p = 0,023) với vô sinh nam. Ngoài ra, nhóm tác giả còn tiến hành phân tích gộp các kết quả nghiên cứu tương tự trước đó ở châu Á và cũng cho kết quả là có sự liên quan đáng kể giữa rs4646903 và sự vô sinh của nam giới. Kết quả nghiên cứu này chỉ ra rằng, quá trình chuyển *CYP1A1* T3801C có nguy cơ gây vô sinh nam ở các cộng đồng châu Á.

Như vậy kết quả thu được của chúng tôi có sự tương đồng với nghiên cứu của Schuppe (2000), Lu N. (2008), Aydos S.E. (2009), Yarosh S.L. (2013) khi cho rằng đa hình 2455A>G gen *CYP1A1* làm tăng nguy cơ vô sinh ở nam giới (hiệu ứng trội của đột biến). Hậu quả làm giảm hoạt tính và tính cảm ứng của enzym *CYP1A1* [3], [100], [101], [103].

Một số nghiên cứu khác chỉ ra rằng, alen 462V có thể làm tăng hoạt tính và tính cảm ứng của enzym *CYP1A1* lên gấp 2 lần trong quá trình chuyển hóa xenobiotics [143]. Trong khi đó ở kiểu gen dị hợp tử đa hình 462IV có thể kích hoạt hoặc gây biểu hiện quá mức hoạt tính của enzym *CYP1A1*, kết quả làm tăng mức độ kích hoạt chuyển hóa xenobiotics, làm tăng sản xuất các sản phẩm chuyển hóa trung gian, gây độc tính cho các cơ quan sinh sản ở nam giới và hậu quả dẫn đến vô sinh nam. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu trên thế giới chỉ ra mối liên quan giữa các đa hình gen *CYP1A1* với một số yếu tố môi trường như hút thuốc lá, uống rượu... và đưa ra kết luận rằng ở những người



mang kiểu gen 462IV hoặc 462VV nếu hút thuốc sẽ gây rối loạn quá trình hình thành các gốc tự do và tăng nguy cơ vô sinh nam lên rất nhiều lần [144].

*CYP1A1* là gen mã hóa enzym tham gia oxy hóa xenobiotics nhóm lipid được tìm thấy trong các microsome của gan. Nhiều nghiên cứu cũng đã chỉ ra rằng đột đa hình này làm tăng tính nhạy cảm với xenobiotics, giảm khả năng oxy hóa của enzym được mã hóa với xenobiotics. Những người mang đa hình này có tỷ lệ vô sinh cao hơn nhóm người không bị vô sinh [89],[91],[93],[94].

#### ***4.3.3. Về phân bố kiểu gen và mối liên quan giữa đa hình gen NAT2 481C>T(rs1799929) và NAT2 590 G>A (rs1799930) với vô sinh nam nguyên phát***

*NAT2* là gen mã hóa enzym có chức năng acetyl hóa xenobiotics trong quá trình chuyển hóa xenobiotics ở giai đoạn II, chức năng chính là làm biến đổi các nhóm chức amin ( $R-NH_2$ ) và hydrazine ( $R-NH-NH_2$ ) thành các nhóm amid ( $R-NH-COCH_3$ ) và hydrazid ( $R-NH-NH-COCH_3$ ). Việc thay đổi các nhóm chức amin thành các nhóm chức dễ hòa tan trong nước hơn sẽ giúp cho đào thải xenobiotics ra khỏi cơ thể. Khi xảy ra biến đổi của gen này, sẽ gây ra chậm quá trình acetyl hóa. Giảm khả năng chuyển hóa xenobiotics của cơ thể dẫn tới tích tụ các xenobiotics và các chất chuyển hóa khác gây ảnh hưởng tới cơ thể. Nhiều nghiên cứu cho thấy đó là nguyên nhân gây ra nhiều bệnh mãn tính, trong đó có cả vô sinh [124],[128],[145].

Một số tác giả khác khi nghiên cứu cũng cho thấy đa hình của gen *NAT2* ở một vài vị trí làm tăng khả năng bị vô sinh [120],[127],[130],[145].

**Bảng 4.1. Một số đa hình của gen NAT2 [127]**

<b>Đa hình</b>	<b>Mã số</b>	<b>Alen</b>	<b>Kiểu hình</b>
NAT2.1-1146	rs4646243	T/C	Acetyl hóa chậm
NAT2.1-1049	NA	del(AG)	
NAT2.1-1037	rs4646244	T/A	
NAT2.1- 949	NA	del(TA)	
NAT2.1- 842	rs4646267	A/G	
NAT2.1- 815	NA	A/G	
NAT2.1 - 547	rs4345600	A/G	
NAT2.1 - 542	rs4345601	A/T	
NAT2.1 - 521	rs5889794	del(AATT)	
NAT2.1 - 487	rs4271002	G/C	
NAT2.1 - 327	NA	A/G	
NAT2.1 - 94	rs4646246	A/G	
NAT2.1 46	NA	A/G	
NAT2.1 112	NA	C/T	
NAT2 70	NA	T/A	
NAT2 191	rs1801279	G/A	
NAT2 282	rs1041983	C/T	
NAT2 341	rs1801280	T/C	
NAT2 481	rs1799929	C/T	
NAT2 578	NA	C/T	
NAT2 590	rs1799930	G/A	
NAT2 622	NA	T/C	
NAT2 803	rs1208	A/G	
NAT2 857	rs1799931	G/A	
NAT2 1021	rs2552	T/C	
NAT 1085	NA	G/A	
NAT2 1101	NA	C/G	

*NAT2* 590G>A (rs1799930) và *NAT2* 481C>T(rs1799929) được xác định và được biết đến là một trong những biến thể di truyền quan trọng và phổ biến nhất trong *NAT2* [123], nguyên nhân gây ra kiểu hình acetylator chậm do sản xuất các protein không ổn định hoặc có hoạt tính xúc tác giảm dẫn tới tích tụ các xenobiotics, các sản phẩm trung gian phần lớn là các hợp chất không ổn định, làm tăng tính nhạy cảm với vô sinh ở nam giới [130],[145].

Tiến hành phân tích đa hình gen *NAT2* 590G>A (rs1799930) trên 170 bệnh nhân vô sinh nam nguyên phát và 170 nam giới khỏe mạnh. Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận ở nhóm vô sinh, số trường hợp mang kiểu gen dị hợp tử GA chiếm 53,5% lớn hơn rất nhiều so với nhóm đối chứng chỉ chiếm 25,9%. Có 8 trường hợp xuất hiện kiểu gen đồng hợp tử AA ở nhóm vô sinh (4%) còn nhóm đối chứng thì không. Đối với sự phân bố alen A, ở nhóm vô sinh chiếm 31,5%, nhóm chứng là 12,9%. Từ đó có thể thấy có sự khác biệt trong phân bố kiểu gen, alen A giữa hai nhóm đối tượng nghiên cứu với kiểu gen dị hợp tử GA, người mang kiểu gen dị hợp GA tăng khả năng bị thiếu tinh năng hoặc vô tinh lên 3,3 lần: OR = 3,3; 95%CI = 2,09-5,21; Những người có kiểu gen dị hợp GA và đồng hợp AA, khả năng bị vô sinh nguyên phát tăng lên 3,99 lần: Kết hợp GA+AA: OR = 3,99; 95%CI = 2,52-6,32;  $p < 0,001$ ; mang alen A, khả năng bị vô sinh nguyên phát tăng lên 3,09 lần: OR = 3,09; 95%CI = 2,09-4,57; sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ .

Nghiên cứu về đa hình gen *NAT2* tại vị trí 481 cho thấy: 481C>T (rs1799929) ở nhóm vô sinh có 50,6% mang kiểu gen dị hợp tử, 49,4% mang kiểu gen bình thường, không có trường hợp nào mang gen đồng hợp tử đa hình. Ở nhóm chứng có 20% mang kiểu gen dị hợp tử, 80% mang kiểu gen bình thường (CC) và không có trường hợp đồng hợp tử đa hình (TT).

Ở gen *NAT2*, tại vị trí 481, tần số kiểu gen CC chủ yếu gặp ở nhóm chứng, nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh tần số kiểu gen CC chỉ bằng 0,24 lần so với nhóm chứng. Tần số kiểu gen CT chủ yếu gặp ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh và vô tinh, gấp 4,1 lần nhóm chứng. Tần số kiểu gen CT và TT ở nhóm vô sinh cao gấp 4,1 lần so với nhóm chứng (OR = 4,1; 95%CI = 2,53 - 6,63). Sự khác biệt giữa 2 nhóm có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ .

Kết quả cho thấy tỷ lệ phân bố kiểu gen biến đổi (CT) tại vị trí 481 gen *NAT2* làm tăng khả năng vô sinh nguyên phát lên 4,1 lần, tần số gen bệnh ở nhóm vô sinh lớn hơn nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$  (OR = 4,1; 95%CI = 2,53-6,63). Tỷ lệ phân bố alen biến đổi (T) ở nhóm vô sinh cũng lớn hơn nhóm chứng có ý nghĩa thống kê (OR = 3,05; 95%CI = 1,98-4,69;  $p < 0,001$ ).

Về đa hình gen *NAT2* 590G>A, Đinh Đoàn Long (2010) nghiên cứu đa hình gen *NAT2* trên 100 người Việt Nam chọn ngẫu nhiên từ quần thể, kết quả cho thấy tỷ lệ alen A trong đa hình gen *NAT2* 590G>A chiếm 12,5% [146], có khác biệt đối với tỷ lệ alen A ở nhóm bệnh nhân nghiên cứu. Điều này chứng tỏ có sự tăng lên có ý nghĩa của alen A đa hình *NAT2* 590G>A ở nhóm vô sinh nam so với nhóm sinh sản bình thường.

Cũng nghiên cứu đa hình *NAT2* 590G>A, theo Yarosh và cs (2014) nghiên cứu trên gen *NAT2* ở 203 bệnh nhân vô sinh nam và 227 nam giới bình thường cho kết quả: Ở nhóm bệnh có 46,8% trường hợp dị hợp tử, 34,5% trường hợp bình thường, 18,7% trường hợp đồng hợp tử đa hình. Ở nhóm chứng: 51,5% trường hợp dị hợp tử, 34,8% trường hợp bình thường và 14,1% trường hợp đồng hợp tử đa hình.

Tác giả nhận thấy đa hình gen *NAT2* 590G>A và *NAT2* 481C>T làm tăng cường tính nhạy cảm dẫn đến vô sinh nam khi có sự tiếp xúc với các chất oxy hóa như: khói thuốc lá (OR = 1,7; 95%CI = 1,02 - 2,87; p = 0,042), lạm dụng rượu (OR = 2,14; 95%CI = 1,08 - 4,27; p = 0,029), lượng thức ăn ít chất xơ (OR = 1,68; 95%CI = 1,01 - 2,79; p = 0,04). Yarosh giả định rằng lạm dụng rượu và chất độc hóa học trong khói thuốc lá tác động lên những cơ thể mang đa hình gen *NAT2* 590G>A và *NAT2* 481C>T sẽ sản xuất nhiều gốc oxy hóa với nồng độ cao hơn, do đó làm tăng tính nhạy cảm với vô sinh nam [130].

Như vậy nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Đinh Đoàn Long và Yarosh và cs.

#### **4.3.4. Về phân bố kiểu gen và mối liên quan giữa đa hình gen *GSTP1* 313G>A (rs1695) và *GSTP1* 341C>T(rs1138272) với vô sinh nam nguyên phát**

*GSTP1* là gen mã hóa enzym thuộc nhóm Glutathion S-transferase, xúc tác cho sự liên hợp của các chất kỵ nước và lực điện tử với glutathion, đóng vai trò quan trọng trong giải độc cũng như tham gia nhiều hoạt động trong quá trình chuyển hóa xenobiotics ở giai đoạn II. Kết quả tạo ra các sản phẩm trung hòa các chất độc hại, xenobiotics và các sản phẩm của stress oxy hóa và dễ dàng đào thải ra ngoài [110]. Các đa hình trên gen *GSTP1* gây ảnh hưởng tới chức năng liên hợp này, gây ra tích tụ các sản phẩm độc hại của quá trình chuyển hóa xenobiotics, ảnh hưởng tới chức năng của nhiều hệ cơ quan trong cơ thể cũng như chức năng sinh sản [112],[117],[147].

Chức năng chính của enzym *GSTP1* là gắn các glutathion với các chất chuyển hóa epoxy của hệ thống xenobiotics và các amin dị vòng được tạo ra từ quá trình kích hoạt hệ thống Cytochrom P<sub>450</sub>. Cơ chất của *GSTP1* là: Benzolpiren diol epoxide, Acrolein, Chlorambucil... [148]. Nhiều nghiên cứu

chỉ ra rằng, các alen I105V không chỉ liên quan đến hoạt tính của enzym mà còn liên quan đến tính đặc hiệu về cơ chất của enzym *GSTP1* dựa trên sự biến đổi các thành phần liên quan với phần đặc hiệu của cơ chất. Alen bình thường I105 kích hoạt chuyển hóa 3,4-Dichloro-1-nitrobenzene, trong khi đó alen Val105 làm tăng sự kích hoạt chuyển hóa lên gấp 7 lần.

Cũng theo nhiều tác giả, alen Val105 liên quan đến sự giảm khả năng chịu nhiệt và hoạt tính enzym trong chuyển hóa các nhóm xenobiotics khác nhau [149]. Ngoài ra, một số nghiên cứu khác chỉ ra rằng, alen V105 có liên quan đến nguy cơ cao gây ung thư tuyến tiền liệt, tinh hoàn và bàng quang. Như vậy, người mang alen Val105 gen *GSTP1* có thể có nguy cơ không chỉ vô sinh mà còn dễ mắc các bệnh ung thư ở các cơ quan sinh sản khác, đặc biệt ở các mô nơi các enzym này biểu hiện ở mức độ cao. Mặt khác, sự giảm hoạt tính enzym *GSTP1* liên quan đến sự có mặt của alen Val105, sẽ làm tăng sự tổng hợp các gốc tự do xenobiotics (trong đó có các hydrat carbon dạng vòng và các amin dị vòng), kích hoạt hệ thống cytochrom P<sub>450</sub> ở giai đoạn I của quá trình chuyển hóa xenobiotics. Kết quả sẽ gây nên stress oxy hóa và làm tổn thương không chỉ tế bào sinh tinh, mà còn các tế bào tham gia vào quá trình thuần thực và phân hóa của tinh trùng [150], [151].

Hemachanda và Raijmakers chỉ ra rằng, sự biểu hiện của *GSTP1* trong tinh dịch có vai trò quan trọng đối với việc bảo vệ tinh trùng khỏi sự tác động của các gốc tự do từ oxy trong quá trình stress oxy hóa, và glutation - cofactor của enzym Glutathione transferase sẽ ảnh hưởng đến sự di chuyển và hình thái của tinh trùng và có thể là nguyên nhân gây vô sinh nam.

Một trong những điểm nổi bật nhất của các nghiên cứu trên thế giới là đánh giá sự ảnh hưởng của các đa hình gen chuyển hóa xenobiotics đến quá trình sinh tinh thông qua các chỉ số tinh dịch đồ ở nam giới vô sinh với mục

đích tìm ra cơ chế ảnh hưởng trực tiếp của các gen thuộc hệ thống chuyển hóa xenobiotics đến vô sinh nam. Để điều khiển quá trình phát triển và thuần thực của tinh trùng từ các tế bào sinh dục chưa thuần thực cần phải có sự phối hợp của các yếu tố nội sinh (di truyền, tế bào, nội tiết tố) và các yếu tố ngoại sinh (dinh dưỡng, lối sống, điều kiện sinh thái). Chính sự biến đổi của các yếu tố này đã khiến tinh trùng giống như “con mồi” của các tác nhân xenobiotics xâm nhập từ bên ngoài vào cơ thể người và làm giảm khả năng sinh sản ở nam giới. Vì vậy, các yếu tố nội sinh (đa hình gen chuyển hóa xenobiotics) tạo nên đặc tính của từng cơ thể trong chuyển hóa các chất đặc biệt với các chất hóa học lạ.

Nghiên cứu của chúng tôi về đa hình gen *GSTP1* 313G>A (rs1695) trên 170 bệnh nhân vô sinh nam nguyên phát và 170 nam giới khỏe mạnh: Ở nhóm vô sinh có 35,9% mang bộ gen dị hợp tử (AG), 52,9% mang bộ gen bình thường (GG), 11,2% (19 trường hợp) mang gen đồng hợp tử đa hình (AA).

Ở nhóm chứng, 14,7% có kiểu gen dị hợp tử (AG), 87,3% có kiểu gen bình thường (GG) và không có trường hợp đồng hợp tử đa hình.

Kết quả cho thấy tỷ lệ phân bố genotypes đa hình ở nhóm vô sinh lớn hơn nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với kiểu gen dị hợp tử GA: OR = 3,25; 95%CI = 1,92-5,50; Kết hợp GA+AA: OR = 5,16; 95%CI = 3,06-8,68;  $p < 0,001$ . Như vậy kiểu gen dị hợp AG của gen *GSTP1* tại vị trí 313 làm tăng nguy cơ bị thiếu tinh nạng và vô tinh lên 3,25 lần, kiểu gen dị hợp và đồng hợp đa hình (GA và AA) làm tăng khả năng bị thiếu tinh nạng và vô tinh lên 5,16 lần. Tỷ lệ phân bố alen đa hình (A) ở nhóm vô sinh cũng lớn hơn nhóm chứng có ý nghĩa thống kê (OR = 5,18; 95%CI = 3,24-8,28;  $p < 0,001$ ). Như vậy người mang alen đa hình (A) nguy cơ bị thiếu tinh và vô tinh tăng lên 5,18 lần so với người mang alen bình thường (G).

Nghiên cứu về đa hình gen *GSTP1* 341C>T(rs1138272) thu được kết quả: Ở nhóm bệnh có 38,2% mang kiểu gen dị hợp tử (CT), 61,8% mang kiểu gen bình thường (CC), không có trường hợp nào mang gen đồng hợp tử đa hình (TT).

Ở nhóm chứng có 8,2% mang kiểu gen dị hợp tử (CT), 91,8% mang kiểu gen bình thường (CC) và không có trường hợp đồng hợp tử đa hình (TT).

Kết quả cho thấy tỷ lệ phân bố kiểu gen đa hình ở nhóm vô sinh lớn hơn nhóm chứng có ý nghĩa thống kê (OR = 6,90; 95%CI = 3,68-12,93;  $p < 0,001$ ). Như vậy kiểu gen dị hợp và đồng hợp đa hình (CT và TT) của gen *GSTP1* tại vị trí 341 làm tăng nguy cơ bị thiếu tinh nặng và vô tinh lên 6,9 lần. Tỷ lệ phân bố alen đa hình ở nhóm vô sinh cũng lớn hơn nhóm chứng có ý nghĩa thống kê (OR = 5,5; 95%CI = 3,02-10,02;  $p < 0,001$ ). Như vậy người mang alen đa hình (T) của gen *GSTP1* tại vị trí 341 nguy cơ bị thiếu tinh và vô tinh tăng lên 5,5 lần so với người mang alen bình thường (C).

Trong nghiên cứu của Feng Z. và cs (2015) về sự kết hợp của các đa hình gen *SPO11* và *GSTP1* đối với các trường hợp vô sinh I ở nam giới, kết quả so sánh trên 216 bệnh nhân và 198 người bình thường cho thấy tần suất đa hình đơn thuần 313G>A gen *GSTP1* (*GSTP1* Leu105Val) của 2 nhóm có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Tác giả kết luận có thể có sự kết hợp của đa hình gen *GSTP1* 313 G>A và vô sinh ở nam giới [119].

Nghiên cứu của Xiong D.K. và cs (2015) về các đa hình gen *GSTs* trong đó có đa hình 313 G>A gen *GSTP1*, kết quả cho thấy sự phân bố đa hình *GSTP1* 313G>A trong 479 bệnh nhân azoospermia, oligospermia và 234 người khỏe mạnh như sau [117]:



**Bảng 4.2. Phân bố đa hình 313G>A gen *GSTP1* trong nghiên cứu của Xiong D.K. (2015)**

Genotype		Nhóm chứng (n=234)	Azoospermia (n=361)	Oligospermia (n=118)	Tất cả bệnh nhân (n=479)
<b><i>GSTP1</i> 313G&gt;A</b>	<b>n</b> (%)	83 (35,5%)	162 (49,9%)	59 (50%)	221 (46,1%)
	<b>OR</b> (95%CI)		1,48 (1,06-2,08)	1,82 (1,16-2,85)	1,56 (1,13-2,15)
	<b>p</b>		0,023 (<0,05)	0,009 (<0,05)	0,007 (<0,05)

Dựa vào kết quả từ bảng 4.2 có thể thấy trong nghiên cứu của Xiong D.K. và cs (2015), tỷ lệ đa hình gen *GSTP1* 313G>A ở các nhóm bệnh nhân azoospermia, oligospermia đều lớn hơn nhóm chứng. Kết quả có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

Nghiên cứu đa hình gen *GSTP1* của Yarosh và cs (2014) trên 203 bệnh nhân nam vô sinh I và 227 người bình thường cho thấy đa hình gen *GSTP1* 313G>A (rs1695) và *GSTP1* 341C>T(rs1138272) làm tăng nguy cơ vô sinh ở nam giới (OR = 1,50, 95% CI 1,02-2,20,  $p = 0,04$ ) [118].

Nghiên cứu của Safarinejad MR (2010) về mối liên quan của sự đa hình gen glutathione - S - transferase (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) với vô sinh nam trên 166 bệnh nhân nhóm chứng và 166 bệnh nhân nhóm bệnh. Nghiên cứu đã chỉ ra sự tăng nguy cơ vô sinh ở bệnh nhân có đa hình gen *GSTM1* (OR = 2,18; 95CI = 1,64 - 3,32;  $p = 0,001$ ) hoặc đa hình gen *GSTT1* (OR = 1,88; 95CI = 1,12 - 2,52;  $p = 0,04$ ). Nếu bệnh nhân có đa hình gen *GSTM1* và gen *GSTP1* hoặc *GSTT1* thì nguy cơ vô sinh cao hơn (lần lượt có OR = 2,47;

95%CI = 1,46-4,17 và OR = 2,69; 95%CI = 1,39 - 5,32). Và ở bệnh nhân mang cả 3 đa hình gen *GSTM1*, *GSTT1* và *GSTP1* thì nguy cơ vô sinh cao lên nhiều hơn nữa (OR = 4,45; 95%CI = 1,59 - 12,24, p = 0,002) [152].

Một số tác giả khác khi nghiên cứu cũng cho thấy đa hình gen *GSTP1* ở một số vị trí làm tăng khả năng bị thiếu tinh và vô tinh [112], [115], [118], [143], [153].

Nghiên cứu của chúng tôi cũng thấy các đa hình trên gen *GSTP1* làm tăng khả năng bị thiếu tinh nặng và vô tinh giống như một số nghiên cứu khác. Điều này góp phần củng cố thêm giả thiết sự biến đổi gen *GSTP1* trong chuyển hóa xenobiotics có thể là nguyên nhân dẫn đến các trường hợp vô sinh nam, xét nghiệm xác định đa hình trên gen *GSTP1* là cần thiết để chẩn đoán vô tinh và thiếu tinh nặng, đặc biệt cần làm với những trường hợp vô sinh không rõ nguyên nhân.

#### **4.4. Mối tương quan giữa các biến đổi nucleotid thường gặp của các gen *CYP1A1*, *GSTP1* và *NAT2* với vô sinh nam nguyên phát**

##### **4.4.1. Mối tương quan giữa đa hình gen *CYP1A1*, *GSTP1* và *NAT2* với vô sinh nam nguyên phát**

Các gen *CYP1A1*, *GSTP1* và *NAT2* đều là những gen mã hóa cho các enzym tham gia lần lượt vào giai đoạn I và giai đoạn II của quá trình chuyển hóa xenobiotics trong cơ thể. Chúng cùng đóng vai trò quan trọng trong biến đổi và đào thải các amin thơm dị vòng.

Đa hình gen *CYP1A1* 2455A>G làm tăng hoạt tính của enzym [154], kết hợp với đa hình *NAT2* có kiểu hình acetylator chậm, dẫn đến làm tăng nhanh các sản phẩm chuyển hóa trung gian có tính oxy hóa cao ở giai đoạn I và tích tụ tại giai đoạn II của chuyển hóa gây ra các đa hình gây bệnh trong đó có làm giảm chất lượng tinh trùng [100].

Nghiên cứu của chúng tôi tiến hành phân tích kiểu gen đồng thời của cả hai đa hình *CYP1A1* (2455A>G) và *NAT2* (590G>A). Ở kiểu gen (590GA hoặc 590AA) và (2455AG hoặc 2455GG) thì nguy cơ vô sinh tăng 4,86 lần (OR = 4,86; 95%CI = 2,65 - 8,89; cao hơn hẳn ở các kiểu gen chỉ mang một trong hai loại đa hình 590GG và (2455AG hoặc 2455GG) và 2455AA và (590GA hoặc 590AA).

Nghiên cứu đồng thời hai đa hình *CYP1A1* (2455A>G) và *NAT2* (481C>T) cũng cho thấy: Ở kiểu gen mang cả hai loại đa hình (481CT hoặc 481TT) và (2455AG hoặc 2455GG) thì nguy cơ vô sinh tăng 6,37 lần (OR = 6,37; 95%CI = 3,19 - 12,73). Theo tìm hiểu của chúng tôi thì chưa có một tác giả nào trước đây có nghiên cứu tương tự về mối liên quan giữa sự kết hợp hai đa hình *CYP1A1* 2455A>G và *NAT2* (590G>A); (481C>T) với vô sinh nam. Nhưng với kết quả thu được chúng tôi có thể bước đầu khẳng định vai trò của gen *CYP1A1*, *NAT2* với vấn đề vô sinh ở nam giới. Tỷ lệ đa hình gen càng nhiều thì nguy cơ vô sinh càng cao.

Trường hợp nghiên cứu đồng thời hai đa hình *CYP1A1* (2455A>G) và *GSTP1*(313G>A); *GSTP1*(341C>T) cũng cho kết quả tương tự khi cả hai gen đều mang đa hình, tỷ lệ vô sinh tăng lần lượt là 4,02 lần (OR = 4,02; 95%CI = 1,97 - 8,19 với kiểu gen (313GA hoặc 313AA) và (2455AG hoặc 2455GG) và tăng 10,51 lần (OR = 10,51; 95%CI = 3,12- 35,37 với kiểu gen (341CT hoặc 341TT) và (2455AG hoặc 2455GG).

Theo Aydos S.E. (2009) cũng đã tiến hành nghiên cứu hai đa hình *CYP1A1*\*2C (2455A>G), *GSTM1* trên 110 nam giới vô sinh và 105 nam giới khỏe mạnh thu được kết quả tương tự. Các cá thể mang gen *CYP1A1* Val/Val (GG) hoặc *CYP1A1* Ile/Val (AG) và *GSTM1* null (dạng đa hình của gen *GSTM1*) có nguy cơ bị vô sinh cao hơn gấp 6,9 lần (OR = 6,90; 95% CI = 2,29-19,3; p <0,001) [132].

Nghiên cứu về tác động cộng gộp của các đa hình gen *NAT2* (590G>A); (481C>T) với *GSTP1* (313G>A); (341C>T) chúng tôi thu được: Ở kiểu gen mang cả hai loại đa hình (481CT hoặc 481TT) và (313GA hoặc 313AA) thì nguy cơ vô sinh tăng 9,18 lần (OR = 9,18; 95%CI = 3,51 - 24,01).

Kiểu gen mang cả hai loại đa hình (481CT hoặc 481TT) và (341CT hoặc 341TT) thì nguy cơ vô sinh tăng 4,28 lần (OR = 4,28; 95%CI = 1,69 - 10,79).

Kiểu gen mang cả hai loại đa hình (590GA hoặc 590AA) và (313GA hoặc 313AA) thì nguy cơ vô sinh tăng 7,64 lần (OR = 7,64; 95%CI = 3,32 - 17,57).

Kiểu gen mang cả hai loại đa hình (590GA hoặc 590AA) và (341CT hoặc 341TT) thì nguy cơ vô sinh tăng 8,56 lần (OR = 8,56; 95%CI = 3,26 - 22,44).

Safarinejad M.R. (2010) nghiên cứu đa hình nhóm gen *GST* (mã hóa các enzym thuộc pha 2 của quá trình chuyển hóa xenobiotics) ở 166 nam giới vô sinh các gen đa hình phối hợp với nhau sẽ làm tăng cao nguy cơ gây vô sinh [152].

Từ các phân tích trên, có thể thấy rằng có sự tác động cộng gộp giữa hai đa hình gen *CYP1A1*, *NAT2*, *GSTP1* làm tăng cao nguy cơ vô sinh ở nam giới.

Tuy nhiên các kết quả phối hợp giữa một gen bình thường và một gen đồng hợp hoặc dị hợp cũng chỉ ra rằng chỉ cần một đa hình ở một trong các gen đang nghiên cứu cũng có nguy cơ gây vô sinh ở nam giới.

Như chúng ta đã biết hiện nay, stress oxy hóa (OS) được cho là quan trọng và nguyên nhân chính của vô sinh nam nguyên phát. Stress oxy hóa (Oxidative stress, viết tắt là OS) là hậu quả của sự mất cân bằng giữa sự hình thành các gốc tự do có oxy (Reactive Oxygen Species, viết tắt là ROS) và cơ chế kháng oxy hóa của cơ thể. OS được xem là có mối liên quan đến nguyên nhân của nhiều bệnh lí của người như xơ vữa động mạch, ung thư, tiểu đường, tổn thương gan, thấp khớp, đục thủy tinh thể, rối loạn thần kinh trung ương, thần kinh vận động, Parkinson, hiếm muộn, bệnh lí phụ khoa, bệnh lí trong thai kì...

Trong quá trình chuyển hóa các chất xenobiotics, tạo ra các dạng ROS như  $O_2^{\cdot -}$ ,  $^1O_2$ ... có độc tính cao và gây ra tình trạng stress oxy hóa. Các chất chống oxy hóa trong cơ thể như SOD, catalase, protein có nhóm -SH, ceruloplasmin trong hồng cầu và gan rất nhạy cảm với các xenobiotics. Do vậy, khi có các xenobiotics xâm nhập vào cơ thể, các chất chống oxy hóa này sẽ thay đổi theo hướng chống lại các tác nhân đó. Như vậy, ở một cơ thể khỏe mạnh luôn có sự cân bằng giữa hệ thống sản xuất các gốc tự do và hệ thống các chất chống oxy hóa cơ thể.

Jones và cs đã phát hiện ra rằng peroxidation do ROS gây ra phá hủy màng tế bào, phá hủy màng nhân, đứt gãy ADN của tinh trùng điều này sẽ làm gián đoạn sự hợp nhất của tinh trùng và trứng [155]. Tinh trùng đã được chứng minh là nhờ có hệ thống gen *GST* sản xuất ra nhiều enzym có vai trò quan trọng góp phần vào sự suy yếu độc tính ROS đối với tinh trùng [156]. Ngoài hệ thống GST, hệ thống enzym do gen *NAT2* sản xuất cũng được biết đến trong việc tham gia vào quá trình chuyển hóa các loại thuốc có ảnh hưởng đến hệ thống sinh sản nam và gây bất thường về vấn đề sinh tinh. Nhiều các loại thuốc như cafein, isoniazid và nitrazepam được acetyl hóa, có thể dẫn đến tăng mức độ stress oxy hóa [157]. Chúng tôi nhận thấy rằng tần số của *GSTP1*, *NAT2* đồng hợp tử hoặc dị hợp tử cao hơn đáng kể ở những bệnh nhân vô sinh so với ở người khỏe mạnh. Điều này chỉ ra rằng bệnh nhân vô sinh đã bị tăng đáng kể mức độ stress oxy hóa do chức năng của enzym này bị thay đổi. Mặt khác, khả năng hoạt động của enzym này có thể dẫn đến thiếu ROS là chất cần thiết cho phản ứng acrosomal và kích hoạt sự hợp nhất của tinh trùng và trứng [152],[158]. Khi có sự biến đổi gen *NAT2* có thể làm chậm quá trình acetyl hóa, giảm khả năng chuyển hóa xenobiotics của cơ thể dẫn tới tích tụ các xenobiotics và các chất chuyển hóa khác gây ảnh hưởng tới cơ thể từ đó dẫn tới vô sinh ở nam giới. Điều đó có nghĩa là những nam giới bị biến

đôi gen các gen này bị giảm khả năng chuyển hóa các loại thuốc nêu trên, các amin thơm và dị vòng do vậy làm tăng mức độ stress oxy hóa của tinh trùng. Các gốc tự do có thể làm tổn thương ADN tinh trùng một cách trực tiếp bằng cách tương tác với purine và pyrimidin nucleotide và deoxyribose. Do vậy stress oxy hóa được cho là có tham gia vào cơ chế gây vô sinh nguyên phát mà *NAT2* và các đa hình *GSTP1* có thể là các ứng cử viên tiềm năng cho tính nhạy cảm của bệnh.

Nghiên cứu của Yarosh và cs đã chứng minh vai trò của enzym *NAT2* trong tương tác gen-môi trường. Nghiên cứu này cho thấy đa hình gen *NAT2* không liên quan đến nguy cơ vô sinh nam theo phân tích ban đầu, nhưng phân tích tiếp theo cho tương tác gen-môi trường cho thấy kiểu gen *NAT2* 590 G>A có liên quan đến vô sinh nam trên những đối tượng lạm dụng rượu, người hút thuốc hoặc có chế độ ăn trái cây, rau củ quả ít [130]. Những phát hiện này cho thấy rằng phơi nhiễm môi trường (xenobiotics) đặc trưng bởi các hiệu ứng ngược pro-oxidant và chất chống oxy hóa tiếp xúc có thể thay đổi mối quan hệ giữa kiểu gen *NAT2* và nguy cơ vô sinh nam. Có một nghiên cứu khác cho thấy mức độ N-acetyl hóa cho dược chất như sulfamethazine, benzidine, 4-aminobiphenyl, cũng như mức O-acetyl hóa cho N-hydroxy-2-amino-1-methyl- 6-phenylimidazo (4,5-b) pyridin (PhIP) cao hơn đáng kể ở thỏ sở hữu gen *NAT2* so với thỏ không có gen này [159].

Các vai trò của các đa hình *NAT1* và / hoặc *NAT2* trong một số loại ung thư cũng đã được nghiên cứu trong các nghiên cứu dịch tễ học khác nhau của con người. Khói thuốc lá chứa các amin thơm dị vòng như 4 aminobiphenyl / Phip [145], các amin dị vòng được hình thành trong quá trình nhiệt phân protein trong thịt chiên, các amin thơm tạo ra từ các sản phẩm công nghiệp, thuốc, sản phẩm đốt, thuốc trừ sâu hoặc thuốc nhuộm là các chất gây ung thư kết hợp với sự biến đổi của gen này có thể là yếu tố kích hoạt chuyển hóa gây

biến đổi ADN khác và khởi phát ung thư. Sau khi N-oxy hóa, N-hydroxy-thơm và N-hydroxy-dị vòng được kích hoạt thêm (thông qua O-acetylation) bởi gen *NAT* đa hình sẽ tạo ra các chất trung gian độc hại, các chất này sẽ phản ứng tự nhiên với ADN tạo nên những đa hình mới [160],[161]. Thực tế này chứng minh rằng có mối quan hệ giữa *NAT1* và / hoặc các đa hình *NAT2* và sự phát triển ung thư do phơi nhiễm với các amin thơm hoặc dị vòng, cũng như các đa hình ADN của tinh trùng dẫn đến vô sinh.

Bên cạnh đa hình gen *NAT2*, *GSTP1* nhiều nghiên cứu cho thấy *CYP1A1* có thể đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển vô sinh nam. Đối với các hóa chất môi trường như polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) và khả năng sinh sản độc tính của chúng thông qua các hoạt động chuyển hóa, sự biến đổi di truyền của các enzym giai đoạn I tại gan là những thành phần quan trọng để xác định độ nhạy đối với vô sinh ở nam giới, đáng chú ý là sự biến đổi của gen *CYP1A1*. Tùy thuộc vào kiểu gen *CYP1A1*, sự chuyển hóa trong và ngoài gan cũng như sự chuyển hóa của các chất nền nội sinh (như testosterone) và các hormon khác... có thể gây trở ngại đến chức năng của tinh hoàn. Hoạt động *CYP1A1* cao có thể tham gia vào sự hình thành các gốc tự do tại chỗ và gây ra sự giảm chức năng tinh trùng [162].

Trên một nghiên cứu ở 1060 ca bệnh và 1225 ca đối chứng cũng xác nhận mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa kiểu gen *CYP1A1* 2455G>A và nguy cơ vô sinh nam, đặc biệt là ở trường hợp đồng hợp tử bị bệnh với OR = 2,18, CI 95%: 1,15-4,12) [97].

Yarosh và cs [142] cho thấy mối liên hệ đáng kể giữa *CYP1A1* \* 2C và nguy cơ vô sinh nam vô căn ở những người hút thuốc. Điều này cho thấy *CYP1A1* có thể gây vô sinh nam do sự mất cân bằng oxy hóa trong tế bào thông qua sự tác động lên thụ thể Aryl hydrocarbon (AHR) - từ đó tạo ra nhiều gốc tự do có oxy (ROS). ROS sẽ tác động gây tổn thương màng tinh

trùng, do đó làm giảm khả năng di động và khả năng thụ tinh của tinh trùng. Mặt khác gây tổn thương ADN của tinh trùng dẫn đến giảm khả năng thụ tinh và ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi sau thụ tinh. Do đó, gốc tự do có thể làm giảm khả năng sinh sản của nam giới, ảnh hưởng xấu đến sự phát triển của phôi và thai nhi sau này [163].

Tuy nhiên cũng có những nghiên cứu không phù hợp về sự kết hợp của *GSTP1* đa hình và vô sinh nam nguyên phát. Ví dụ, nghiên cứu được tiến hành bởi nhóm của Lakpour trên 96 bệnh nhân nam vô sinh và 26 nam giới khỏe mạnh đã tiết lộ rằng tất cả các bệnh nhân oligospermia và nam giới bình thường có cùng kiểu gen *GSTP1* (Ile / Ile). Điều này cho thấy sự liên quan không đáng kể giữa *GSTP1* với các chỉ số của tinh trùng [164].

Theo nghiên cứu của Ali-Osman và cs (1997), các đa hình thường gặp của *GSTP1* xảy ra tại hai vị trí là G313A trên exon 5 (đa hình thay đổi acid amin Ile thành Val) và C341T trên exon 6 (đa hình thay đổi acid amin Ala thành Val). Và theo nhóm đa hình như vậy sẽ có 3 type tương ứng: type A - đa hình tại vị trí C341T; type B - đa hình tại vị trí G313A; và type C - đa hình tại cả hai vị trí G313A và C341T [165].

Một phân tích gộp 11 nghiên cứu (7 nghiên cứu liên quan đến người Á châu và 4 nghiên cứu trên đối tượng người da trắng), bao gồm 1323 bệnh và 1054 chứng, cho thấy GSTM1 (OR = 2,75, 95%; CI: 1,72-3,84, p = 0,003) và GSTT1 null (OR = 1,54, 95%; kiểu gen CI: 1,43-3,47, p = 0,02) cho thấy mối liên hệ đáng kể với khả năng sinh sản của nam với sự biến đổi của các gen này. Tuy nhiên nghiên cứu này lại cho thấy *GSTP1* Ile / Val genotype đã được chứng minh là làm trung gian tác dụng bảo vệ trên hệ thống sinh sản nam (OR = 0,48, 95%; CI: 0,27-0,77) [117], [152], [164]. Những phát hiện này mâu thuẫn với kết quả của phân tích mà chúng ta đã thảo luận ở trên. Tuy nhiên có



thể giải thích bởi sự khác nhau về những yếu tố nguồn gốc dân tộc, dân số nghiên cứu, phương pháp thu thập mẫu cũng như cỡ mẫu nghiên cứu.

Một số tài liệu cho rằng đa hình gen *GSTs* có liên quan tới sự hình thành methylenetetrahydrofolate reductase là một enzym tham gia vào quá trình tổng hợp ADN và methyl hóa. Khi hệ thống gen *GSTs* bị đa hình sẽ kích hoạt hoạt động quá mức của enzym này làm nguy cơ vô sinh tăng lên đáng kể [166], [167].

Trong những năm gần đây, nhờ có sự phát triển về lý thuyết thống kê nên ngày càng có nhiều tác giả tập trung nghiên cứu về tương tác giữa các gen [168], [169]. MDR đã được chứng minh là một công cụ thống kê hữu ích để phát hiện tương tác gen-gen ngay cả cỡ mẫu không lớn [170], phần mềm này có thể xác định tương tác của nhiều gen mà phương pháp thống kê truyền thống không thể xác định được [133],[134],[135]. Ritchie (2003) đã chỉ ra sức mạnh của phương pháp MDR trong việc xác định mối tương tác gen-gen đặc biệt là sự xác định các tương tác gen-gen do lỗi kiểu gen, thiếu dữ liệu, sự không đồng nhất về gen hoặc locus [133]. Moore JH (2004) đã chỉ ra vai trò to lớn trong việc phân tích các tương tác gen-gen bằng cách sử dụng phương pháp MDR [134].

Phương pháp MDR đã được áp dụng thành công để phát hiện tương tác giữa các gen và gen với môi trường trên nhiều loại bệnh thông thường ở người và đưa ra các giá trị chẩn đoán trên lâm sàng [171], ví dụ ứng dụng trong chẩn đoán ung thư bàng quang [172], [173], [174], [175], hội chứng xơ cứng teo cơ một bên (ALS) [176] và eczema [177]. Alison A Motsinger (2006) cho thấy MDR là một công cụ thống kê mới, là một cách tiếp cận không tham số và được chứng minh là có sức mạnh to lớn trong việc phát hiện các tương tác gen-gen trong các bệnh như ung thư vú, đa xơ cứng và tăng huyết áp [171].

Hiện nay, nhiều nghiên cứu về dược lý di truyền và sinh học độc tính đã sử dụng phương pháp MDR để xác định các yếu tố có giá trị chẩn đoán [176]. Yang và cộng sự (2018) đã áp dụng phương pháp MDR để phát hiện sự tương tác gen-gen và đã báo cáo kết quả tuyệt vời trên dữ liệu mô phỏng, đồng thời áp dụng thuật toán này mô tả chi tiết SNP có tương tác cao đối với bệnh động mạch vành GWAS [178].

Để đánh giá sự tương tác giữa một số lượng lớn locus, chúng tôi đã sử dụng phương pháp MDR (nghiên cứu đa chiều) để xác định tương tác gen-gen có giá trị chẩn đoán nhất, tức là có nguy cơ cao nhất gây bệnh [179]. Tất cả các tương tác SNP có thể đã được kiểm tra bằng cách sử dụng phép thử chéo 10 lần trong một phân tích tổng thể tất cả các kiểu tổ hợp gen từ 2, 3, 4 và 5 kiểu gen bao gồm tất cả kiểu gen có nguy cơ cao và kiểu gen có nguy cơ thấp [180].

Tóm lại, trong một phân tích tương tác n-chiều, không gian n chiều được hình thành bởi tất cả các tổ hợp có thể có của các các kiểu gen trên n biến nhất định (trong trường hợp này là SNP). Kích thước cỡ mẫu sẽ được giảm xuống khi sử dụng phần mềm MDR do cách phân lớp các kiểu gen có nguy cơ cao và nguy cơ thấp bằng phân tích toàn diện.

Tổ hợp các alen của các gen khác nhau thuộc hệ thống chuyển hóa xenobiotics đảm bảo tính duy nhất của mỗi người, phản ánh các phản ứng đặc biệt mang tính cá thể của mỗi cơ thể lên tác động của các yếu tố hóa học. Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam phân tích tương tác từng tổ hợp gen cho phép xác định không chỉ các tương tác đặc hiệu, quy định khả năng thải độc ở nam giới vô sinh mà còn đánh giá khả năng vô sinh nam do rối loạn chuyển hóa xenobiotics.

Từ tất cả khả năng tương tác gen, tổ hợp có giá trị nhất là kiểu tổ hợp *GSTP1*(341C>T) và *CYP1A1*(2455A>G) và *NAT2*(590G>A); với độ tái lập

100%, lỗi dự đoán 30,8% (theo Monte-Carlo,  $p < 0,01$ , lỗi dự đoán cho phép là  $< 46,4\%$ ) và kiểu tổ hợp *GSTP1*(341C>T) và *CYP1A1*(2455A>G) và *NAT2*(590G>A) và *NAT2*(481C>T) với độ tái lập 100% và lỗi dự đoán là 22,3% (lỗi dự đoán cho phép  $< 52,5\%$ ).

Trên cơ sở của mô hình xây dựng bằng phần mềm MDR chúng tôi tiến hành phân tích gom nhóm (clustering) các tổ hợp gen và xây dựng bản đồ cây (Dendrogram). Mô hình cho thấy tổ hợp giữa các đa hình gen *GSTP1*(341C>T) và *CYP1A1*(2455A>G) và *NAT2*(590G>A); hoặc *GSTP1*(341C>T) và *CYP1A1*(2455A>G) và *NAT2*(481C>T) biểu hiện tương tác cộng gộp, trong đó *CYP1A1*(2455A>G) và *NAT2*(590G>A) hoặc *CYP1A1*(2455A>G) và *NAT2*(481C>T) là tương tác hỗ trợ. Do vậy những cá thể mang phối hợp những kiểu gen đa hình trên thì nguy cơ vô sinh nam tăng lên đáng kể.

Nghiên cứu của chúng tôi cũng đã chỉ ra sức mạnh tổng hợp của các đa hình gen *GSTP1*, đa hình gen *NAT2* và đa hình gen *CYP1A1* có thể làm nguy cơ vô sinh tăng cao một cách rõ rệt. Điều này có thể được giải thích bằng sự hình thành stress oxy hóa do hoạt động quá mức của ROS khi xảy ra biến đổi ở các gen *GSTP* và *CYP1A1* và sự tổn thương không phục hồi ADN của tinh trùng do chuyển hóa bất thường của xenobiotics khi biến đổi gen *NAT2*.

Chúng tôi cũng thừa nhận một số hạn chế trong nghiên cứu này: Thứ nhất, cỡ mẫu nghiên cứu chưa thực sự đủ lớn giữa hai nhóm vô sinh và nhóm chứng. Thứ hai, những giá trị về tiền sử bệnh nhân chưa được khai thác kỹ và triệt để nhất là tiền sử vô sinh trong gia đình của họ. Thứ ba, nghiên cứu không loại trừ được những trường hợp tương tác gen và môi trường. Đó cũng là những yếu tố mà những nghiên cứu của các tác giả trên thế giới cũng chưa thể khắc phục được.

Tuy vậy tại thời điểm này nghiên cứu của chúng tôi đã bước đầu đưa ra được kết luận về mối liên quan giữa đa hình gen chuyển hóa xenobiotics với vấn đề vô sinh nam nguyên phát. Đây là một trong những giá trị giúp cho các nhà lâm sàng có những bước tiến mới hơn trong chẩn đoán cũng như điều trị bệnh nhân nam vô sinh, từ đó tăng hiệu quả điều trị, góp phần nâng cao chất lượng cuộc sống một cách tốt nhất.

#### ***4.4.2. Mối liên quan giữa mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch ở bệnh nhân nam có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics***

Trong quá trình hoạt động, tế bào sinh ra các gốc tự do, các gốc tự do gây oxy hóa các phân tử, tham gia vào một số khâu chuyển hóa chất, tuy nhiên khi gốc tự do được sản sinh quá nhiều sẽ gây lão hóa phân tử, gây độc cho tế bào và gây đa hình. Việc gây lão hóa phân tử, gây độc tế bào cũng có tác dụng diệt các tác nhân sinh vật học có hại khác tác động vào tế bào như vi khuẩn, virus. Gốc tự do sinh ra nhiều trong quá trình chuyển hóa các chất dị sinh (xenobiotics). Bình thường, các gốc tự do sinh ra trong quá trình chuyển hóa chất trong tế bào được các enzym chống oxy hóa khử tác dụng. Quá trình chuyển hóa xenobiotics được các enzym chuyển hóa xenobiotics chuyển chúng thành các chất dễ tan, dễ đào thải và chuyển từ dạng độc sang dạng ít độc hại. Nếu các gen chuyển hóa xenobiotics bị đa hình thì việc chuyển hóa xenobiotics sẽ làm tăng gốc tự do gây độc cho tế bào và gây các bệnh lý mãn tính, gây ung thư và gây đa hình [112],[113],[123],[181].

Stress oxy hóa (Oxidative stress - OS) là hiện tượng xuất hiện trong cơ thể sinh vật khi có sự mất cân bằng giữa việc sản xuất các gốc tự do có oxy (Reactive Oxygen Species - ROS) và hoạt động của các chất chống oxy hóa trong cơ thể. Hiện tượng này là nguyên nhân của rất nhiều bệnh nguy hiểm, trong đó có ung thư, các bệnh tim mạch, các bệnh suy giảm hệ thần kinh

(Alzheimer, Parkinson), lão hóa sớm, hiếm muộn, bệnh lí phụ khoa, bệnh lí trong thai kì [112],[114],[182]...

Các gốc oxy hóa có thể được khử bằng hệ thống enzym chống oxy hóa (do các gen chuyển hóa xenobiotics quy định). Nếu đa hình các gen này cũng làm cho quá trình chuyển hóa xenobiotics không tốt, gây tăng gốc tự do và tăng stress oxy hóa. Vì vậy nghiên cứu mối liên quan giữa các gen chuyển hóa xenobiotics với stress oxy hóa là cần thiết đặc biệt có ý nghĩa để có biện pháp điều trị thích hợp.

Trong các nguyên nhân vô sinh nam, OS được xem là một trong những tác nhân quan trọng và được nghiên cứu rất nhiều trong những năm gần đây. Giống như nhiều loại tế bào sống hiếu khí khác, tinh trùng liên tục tiếp xúc với môi trường cân bằng liên quan đến oxy hóa. Oxy rất cần thiết để tế bào tồn tại và ROS ở nồng độ sinh lý là cần thiết để duy trì chức năng bình thường của tế bào. Ngược lại, nếu các sản phẩm phụ của oxy như ROS tăng cao lại là nguy cơ gây ảnh hưởng đến chức năng và sự tồn tại của tế bào. Mặc dù ROS với hàm lượng đủ cao được chứng minh là độc cho tinh trùng, ROS nồng độ thấp cần thiết để tinh trùng có khả năng thụ tinh. ROS có vai trò trong nhiều hiện tượng quan trọng để giúp tinh trùng có khả năng thụ tinh với noãn như: phản ứng cực đầu, tăng hoạt động của tinh trùng, tăng di động, tăng khả năng tương tác giữa tinh trùng và noãn.

Tuy nhiên, trong các điều kiện bệnh lý, đặc biệt là khi có sự biến đổi các gen mã hóa enzym chuyển hóa xenobiotics dẫn đến việc sản xuất ra ROS một cách mất kiểm soát phá vỡ sự cân bằng phức tạp và dẫn tới stress oxy hóa (OS). ROS thường tồn tại dưới các dạng gốc tự do như: ion hydroxyl, superoxide, hydrogen peroxide, peroxy radical và hypochlorite ion.

Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy rằng OS làm suy yếu chức năng của tinh trùng và đóng một vai trò quan trọng trong bệnh học về sự khiếm khuyết của tinh trùng. Điều này có thể dẫn tới việc vô sinh nguyên phát ở nam giới thông qua cơ chế liên quan đến việc gây ra tổn thương màng tế bào [183].

Khi dựa vào kết quả trên kit Oxisperm, mức độ OS được xác định làm 4 mức độ từ 1 đến 4 và chia thành 2 nhóm HOS (gồm mức độ OS 3 và 4) và nhóm LOS (gồm mức độ OS 1 và 2). Nhóm bệnh là những bệnh nhân có tinh trùng trong tinh dịch và có ít nhất một đa hình gen chuyển hóa xenobiotics. Nhóm chứng là những đối tượng nghiên cứu không có bất kỳ một đa hình gen nào đã kể trên. Từ đó chúng tôi thu được 71 bệnh nhân ở nhóm bệnh và 72 bệnh nhân ở nhóm chứng trong nghiên cứu này. Kết quả về sự phân bố các mức độ OS trên nhóm bệnh và nhóm chứng như sau: Ở nhóm bệnh, tỷ lệ bệnh nhân có mức OS cao (HOS) là 78,9% và tỷ lệ bệnh nhân có mức OS thấp (LOS) là 21,1%. Ngược lại, ở nhóm chứng, tỷ lệ người có mức OS cao (HOS) chỉ chiếm 11,1%, trong khi đó tỷ lệ người có mức OS thấp là 88,9%. Điều này cho thấy những nam giới vô sinh có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics, có nguy cơ tăng mức độ stress oxy hóa hơn những người bình thường 29,87 lần (OR = 29,87, 95% CI = 11,78 - 75,7). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ .

Nghiên cứu của Valeria M.I. và cs (2015) ở trên 56 bệnh nhân nam giới vô sinh, mức độ OS xác định dựa trên kit Oxisperm cũng được chia làm 2 nhóm, nhóm LOS và nhóm HOS. Kết quả nhóm HOS có 29 bệnh nhân chiếm 51,8% và nhóm LOS có 27 bệnh nhân chiếm 48,2% [184].

Theo nghiên cứu của Aida Pujol và cs (2016) thì sự phân bố mức OS trên 132 nam giới vô sinh là: mức OS 1 chiếm 25%, mức OS 2 chiếm 30,3%, mức OS 3 chiếm 43,2% và mức OS 4 chiếm 1,5% [185].

Theo nghiên cứu của Goslvez và cs (2017) nghiên cứu trên 707 nam giới vô sinh ở 7 phòng thí nghiệm khác nhau trên thế giới, nếu chia mức độ OS 1 và 2 là mức thấp (L1), mức độ OS 3 là trung bình (L2) và mức độ OS 4 là mức cao (L3) thì L1 chiếm 20%, L2 chiếm 76% và L3 chiếm 4% [186].

Như vậy có thể thấy rằng kết quả nghiên cứu của chúng tôi với một số tác giả khác trên thế giới đều cho thấy mức độ OS hoặc ROS ở nhóm bệnh cao hơn nhóm chứng có ý nghĩa thống kê.

Khi nghiên cứu đa hình gen chuyển hóa xenobiotics trên nhóm bệnh theo các mức stress oxy hóa là HOS và LOS (bảng 3.19) chúng tôi thu nhận được kết quả như sau: Nhóm HOS (mức OS cao) có 49 bệnh nhân có từ 2 đa hình gen chuyển hóa xenobiotics trở lên và chiếm 87,5%, chỉ có 7 bệnh nhân có tối đa 1 đa hình gen chuyển hóa xenobiotics chiếm 12,5%. Còn nhóm LOS chỉ có 11 bệnh nhân có từ 2 đa hình gen trở lên. Mặc dù sự sai khác giữa 2 nhóm chưa có ý nghĩa thống kê (có thể do số mẫu thiếu tinh chưa nhiều, chênh lệch giữa hai nhóm HOS và LOS trong nhóm bệnh là tương đối cao), nhưng bước đầu đã góp phần khẳng định thêm rằng, khi đa hình gen chuyển hóa xenobiotics càng nhiều, càng có nguy cơ tăng mức độ stress oxy hóa, đó cũng là nguyên nhân chính dẫn tới tổn thương chất lượng, số lượng tinh trùng và dẫn tới vô sinh ở nam giới.

Kumar R (2009) đã nghiên cứu về OS và đa hình ADN ty thể tinh trùng ở nam giới vô sinh có ít tinh trùng trong tinh dịch trên 33 bệnh nhân nhóm bệnh và 30 nam giới nhóm chứng. Mức độ OS được đo thông qua nồng độ của malondialdehyd (MDA) máu và ROS tinh trùng. Kết quả nghiên cứu cho thấy mức độ ROS tinh trùng và MDA của nhóm bệnh cao hơn nhóm chứng có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,0001$ ) [187].

Một nghiên cứu khác về mối liên quan giữa stress oxy hóa với vô sinh ở nam giới của Agarwal A (2015) trên 258 bệnh nhân nam vô sinh và 92 bệnh

nhân nhóm chứng đã chỉ ra nồng độ ROS nhóm bệnh cao hơn nhóm chứng có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ) [188].

Nghiên cứu của Lakpour trên 96 bệnh nhân nam vô sinh và 26 nam giới khỏe mạnh đã cho thấy khi xuất hiện nhiều hơn các đa hình gen *GSTM1* null và *GSTP1* C / T + T / T phối hợp với nhau sẽ làm tình trạng nhạy cảm, dễ bị oxy hóa, do mức độ OS tăng cao làm phá hủy màng tế bào, phá hủy màng nhân, đứt gãy ADN của tinh trùng và dẫn tới vô sinh [164].

Theo Xinyang Wang và cs (2013) nghiên cứu trên 65 nam giới vô sinh và 30 nam giới khỏe mạnh cũng cho thấy kiểu gen *GST* (*GSTM1*, *GSTT1* null và *GSTP1*) có thể ảnh hưởng đến tình trạng dễ tăng tổn thương oxy hóa trong vô sinh [189].

Một nghiên cứu khác cũng trong năm 2014 của L. Yarosh ở Ukraine đã chỉ ra rằng sự đa hình gen *NAT2* đóng vai trò quan trọng trong sinh bệnh học ở nam giới vô sinh. Đáng chú ý, mối liên quan giữa *NAT2* và vô sinh nam tăng lên bởi các yếu tố như hút thuốc lá (OR 1,72,  $p = 0,042$ ), nghiện rượu (OR 2,14,  $p = 0,029$ ) và chế độ ăn ít rau/ hoa quả (OR 1,68,  $p = 0,04$ ) và khi có đa hình gen này cũng làm tăng mức độ OS, ảnh hưởng tới khả năng sinh sản ở nam giới [130].

Như vậy cũng đã có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của đa hình gen chuyển hóa xenobiotics tới mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch và đưa ra kết luận về sự ảnh hưởng sâu sắc của những đa hình này làm tăng mức độ stress oxy hóa từ đó dẫn tới vô sinh [145],[161],[163].

Nghiên cứu của chúng tôi góp phần củng cố thêm giả thiết về sự biến đổi gen chuyển hóa xenobiotics là nguyên nhân làm sản sinh ra các gốc tự do và chính các gốc tự do này là nguyên nhân dẫn tới tình trạng stress oxy hóa, làm đứt gãy ADN của tinh trùng và dẫn đến các trường hợp vô sinh nam [98], [122],[145],[190].



Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy chỉ cần một bệnh nhân có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics cũng có nguy cơ làm tăng mức độ OS và các nghiên cứu của các tác giả khác cũng góp phần khẳng định rằng, ở những bệnh nhân mang nhiều đa hình thì nguy cơ vô sinh sẽ cao hơn so với các bệnh nhân chỉ mang 1 đa hình. Do vậy về mặt điều trị lâm sàng, những bệnh nhân có mức OS thấp (mức OS 1 và 2) chưa cần phải điều trị nhưng nếu có ít nhất 1 đa hình gen chuyển hóa xenobiotics và OS ở mức 2 trở lên thì cần phải tiến hành điều trị ngay trên những bệnh nhân này.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy rằng ở những nam giới bình thường (trong nhóm chứng) cũng có thể có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics nhưng chủ yếu là 1 đa hình gen và lại ở mức độ OS 1 nên thực tế trên lâm sàng họ vẫn có con mà không cần phải điều trị.

Nghiên cứu của Jaime Gosálvez và cs (2017) đã bước đầu cho thấy rằng với mức độ OS cao (mức 3 và mức 4) thì việc thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) hoặc bơm tinh trùng vào tử cung (ICSI) gần như là không có kết quả, tuy nhiên với những bệnh nhân có mức độ OS thấp (mức 1 và 2) sẽ có kết quả tốt hơn [181].

Do nghiên cứu về mối liên quan giữa đa hình gen chuyển hóa xenobiotics và mức độ OS trong tinh trùng còn mới mẻ ở trên thế giới và ở Việt Nam còn chưa có nghiên cứu nào nên việc so sánh các kết quả với các nghiên cứu khác còn khó khăn. Vì vậy mong rằng trong tương lai, sẽ có thêm những nghiên cứu khác với cỡ mẫu lớn hơn, quy củ hơn về sự ảnh hưởng của đa hình gen chuyển hóa xenobiotics đối với những trường hợp vô sinh nam nguyên phát. Từ đó, có thể đánh giá một cách toàn diện hơn và tìm ra những phương pháp điều trị hiệu quả cao cho bệnh nhân.

## KẾT LUẬN

### 1. Biến đổi nucleotid của các gen *CYP1A1*, *NAT2*, *GSTP1*

- Với gen *CYP1A1*, đa hình 2455 A>G ở nhóm vô sinh có tỷ lệ kiểu gen AG là 52,4% là GG và 1,8% cao hơn so với nhóm chứng.

- Với gen *NAT2* đa hình 481C>T có tỷ lệ kiểu gen CT ở nhóm vô sinh là 50,6% cao hơn so với nhóm chứng là 20%; đa hình gen 590 G>A, ở nhóm vô sinh tỷ lệ kiểu gen GA là 53,5% và AA là 4,7% cao hơn so với nhóm chứng tương ứng là 25,9% và 0%.

- Với gen *GSTP1* đa hình 313G>A ở nhóm vô sinh có tỷ lệ kiểu gen GA là 35,9% và AA là 11,2% cao hơn so với nhóm chứng tương ứng là 14,7% và 0%; đa hình gen 341C>T ở nhóm vô sinh có tỷ lệ kiểu gen CT là 38,2% cao hơn so với nhóm chứng là 8,2%.

### 2. Liên quan giữa đa hình gen *GSTP1*, *NAT2*, *CYP1A1* với vô sinh nam

- Đa hình *CYP1A1* 2455A>G, alen A bị thay bằng alen G làm tăng nguy cơ vô sinh nam so với alen A lên 3,27 lần.

- Đa hình *NAT2* 481C>T(rs1799929), alen C bị thay bằng alen T làm tăng nguy cơ vô sinh so với alen C lên 3,05 lần.

- Đa hình *NAT2* 590 G>A (rs1799930), alen G bị thay bằng alen A làm tăng nguy cơ vô sinh nam so với alen G 3,09 lần.

- Đa hình *GSTP1* 313G>A: alen G bị thay bằng alen A làm tăng nguy cơ vô sinh nam so với alen G 5,18 lần.

- Đa hình *GSTP1* 341C>T(rs1138272): alen C bị thay bằng alen T làm tăng nguy cơ vô sinh nam so với alen C 5,5 lần.

#### ***Khi kết hợp 2 đa hình:***

- Khi kết hợp 2 đa hình *GSTP1* và *NAT2* nguy cơ vô sinh cao hơn khi chỉ có 1 loại đa hình.

- Khi kết hợp 2 đa hình *CYP1A1* và *NAT2* nguy cơ vô sinh cao hơn khi chỉ có 1 loại đa hình.

- Khi kết hợp 2 đa hình *GSTP1* và *CYP1A1* nguy cơ vô sinh cao hơn khi chỉ có 1 loại đa hình.

***Khi kết hợp các đa hình của NAT2, GSTP1 và CYP1A1:***

Kiểu tổ hợp *GSTP1*(341C>T); *NAT2*(590G>A); *CYP1A1*(2455A>G) với độ tái lập 100% và lỗi dự đoán 30,8%. Kiểu tổ hợp *GSTP1*(341C>T); *NAT2*(590G>A); *CYP1A1*(2455A>G); *NAT2*(481C>T) với độ tái lập 100% và lỗi dự đoán là 22,3%.

Tổ hợp các đa hình *GSTP1*(341C>T); *NAT2*(590G>A); *CYP1A1*(2455A>G) hoặc *GSTP1*(341C>T); *CYP1A1*(2455A>G); *NAT2*(481C>T) biểu hiện tương tác cộng gộp; Tổ hợp *NAT2*(590G>A); *CYP1A1*(2455A>G) hoặc *CYP1A1*(2455A>G); *NAT2*(481C>T) là tương tác bổ trợ.

***- Về stress oxy hóa trong tinh dịch và đa hình gen chuyển hóa xenobiotics***

Có mối liên quan giữa mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch ở nam giới vô sinh có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics. Những nam giới vô sinh có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics, có nguy cơ tăng mức độ stress oxy hóa hơn những người bình thường 29,87 lần.

## KIẾN NGHỊ

Qua nghiên cứu này, chúng tôi xin có một số kiến nghị như sau:

1. Cần áp dụng rộng rãi xét nghiệm xác định đa hình gen chuyển hóa xenobiotics để xác định nguy cơ vô sinh cho các trường hợp nam vô sinh chưa rõ nguyên nhân, qua đó có biện pháp phòng, hạn chế tình trạng vô sinh.
2. Cần thực hiện thêm nghiên cứu về tương tác gen - môi trường liên quan tới các đa hình gen *CYP1A1*, *NAT2* và *GSTP* và sự cảm nhiễm khối thuốc lá, lạm dụng rượu... gây vô sinh nam.

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyễn Thị Trang, Vũ Thị Huyền (2018). Polymorphism of xenobiotic detoxification genes and male infertility. In: *Male infertility*. Intech Open, United Kingdom, pp.1-19.
2. Nguyễn Thị Trang, Vũ Thị Huyền, Nguyễn Thanh Tuấn, Trần Đức Phấn (2018). Association of N-acetyltransferase-2 and glutathione S-transferase polymorphisms with idiopathic male infertility in Vietnam male subjects. *Chemico-Biological interactions*. 286(2018):11-16.
3. Vũ Thị Huyền, Nguyễn Thị Trang, Uông Ngọc Nguyên, Trần Đức Phấn (2017). Khảo sát sự biến đổi gen NAT2 và GSTP1 mã hóa enzyme chuyển hóa xenobiotic ở nam giới vô sinh bằng phương pháp ARMS-PCR. *Y Dược học Quân Sự*. 42(9):297-302.
4. Vũ Thị Huyền, Nguyễn Thị Trang, Trần Đức Phấn (2018). Mối liên quan giữa các đột biến gen NAT2 và GSTP1 với vô sinh nam nguyên phát và stress oxy hóa. *Y học Việt Nam*. Số 1 (tập 463): 70-73.
5. Vũ Thị Huyền, Trần Đức Phấn, Nguyễn Thị Trang (2018). Mức độ stress oxy hóa và đứt gãy DNA của tinh trùng ở nam giới vô sinh. *Tạp chí Nghiên cứu Y Học*. Số 110 (1): 25-31.
6. Bùi Thị Nga, Vũ Thị Huyền, Nguyễn Thị Trang, Lương Thị Lan Anh, Trần Đức Phấn (2018). Tính đa hình gen CYP1A1 và nguy cơ vô sinh nam. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 8(469):391-396.
7. Vũ Thị Huyền, Nguyễn Thị Trang, Trần Đức Phấn (2018). Cải tiến quy trình kỹ thuật xác định mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch ở bệnh nhân vô sinh nam có đứt gãy DNA tinh trùng. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 8(469):391-396.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO (2000). *WHO manual for the standardized investigation, diagnosis, and management of the infertile male*, Cambridge University Press, 32-35.
2. Nebert D.W., Zhang G., Vesell E.S. (2013). Genetic risk prediction: individualized variability in susceptibility to toxicants. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 355-375.
3. Aydos S.E., Taspinar M., Sunguroglu A., Aydos K. (2009). Association of *CYP1A1* and glutathione S-transferase polymorphisms with male factor infertility. *Fertil. Steril.* 92, 541- 547.
4. WHO (2010). *Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5<sup>th</sup> ed*, Cambridge University Press.
5. American Urological Association (2001). *Infertility, Report on optimal evaluation of the infertile male*. ISBN 0 - 9649702 - 7 - 9.
6. Kildea S., Bowden F.J. (2000). Reproductive health, infertility and sexual transmitted infections in indigenous women in a remote community in the Northern Territory. *Aust. N. Z. J. Public Health*, 24.
7. Wysahk G. (2001). Infertility in American college alumnae. *Int. J., Gynaecology Obstet*, 73 (3).
8. Chandra A., Copen E.C., Stephen E.H. (2013). *Infertility and Impaired Fecundity in the United States*, National Survey of Family Growth, 67.
9. Thonneau P., Marchand S., Tallec A. et al (1991). Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988 - 1989). *Hum. Reprod.*, 6, 811-816.
10. Irvine D.S. (2002). Male infertility: Causes and management. *Medical progress*.

11. Mittal R.D. (2004). Y - chromosome microdeletion in idiopathic infertility from Northern India. *Ann Genet*, 47, 331-337.
12. Ali H. (2006). Y - chromosome microdeletion in infertile men with idiopathic oligo-azoos, *Journal of Experimental & Clinical Assisted reproduction*, 3, 1043-1050.
13. Dohle G. R. (2005). EAU guidelines on male infertility. *European Association of Urology*, 703 - 711.
14. Ceylan G.G., Ceylan C. and Elyas H. (2009). Genetic anomalies in patients with severe oligozoospermia and azoospermia in eastern Turkey: A prospective study. *Genetics and Molecular Research*, 8, 915-922.
15. Maya N. Mascarenhas, Seth R. Flaxman et al (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLOS Medicine*. 9(12): e1001356. Published online.
16. Jungwirth A. (2013). Guidelines on male infertility. *European Association of Urology*, 6 - 7
17. Tracey Bushnik, Jocelynn L. Cook et al (2013). Estimating the prevalence of infertility in Canada. *Human Reproduction*. 27(3): 738-746.
18. Ashok Agarwal, Aditi Mulgund, Alaa Hamada et al (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015; 13: 37 - 45
19. Nguyễn Khắc Liêu (2003). *Chẩn đoán và điều trị vô sinh*, Nhà xuất bản Y học.
20. Phan Văn Quyền (2000). *Khám và làm bệnh án một cặp vợ chồng vô sinh*, lớp vô sinh và hỗ trợ sinh sản khóa 4, 1 - 13.

21. Trần Thị Phương Mai (2001). *Tình hình điều trị vô sinh bằng kỹ thuật cao*. Báo cáo tại Hội thảo “Tình hình điều trị vô sinh và thụ tinh trong ống nghiệm”, Bộ Y tế và UNFPA, Đà Nẵng, 11/2001.
22. Trần Thị Trung Chiến, Trần Văn Hanh, Phạm Gia Khánh và cs (2002). *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.
23. Nguyễn Viết Tiến, Ngô Văn Toàn và cs (2009). *Nghiên cứu thực trạng vô sinh ở Việt Nam theo các vùng sinh thái*. Đề tài nhánh cấp Nhà nước, Bệnh viện Phụ sản Trung ương, Đại học Y Hà Nội.
24. Trần Quán Anh, Nguyễn Bửu Triều (2009). *Bệnh học giới tính nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 88 - 95.
25. Nông Minh Hoàng (2010). *Nghiên cứu tình hình vô sinh 4 tỉnh Miền núi phía Bắc Việt Nam*. Luận văn thạc sỹ Y học - Đại học Y Hà Nội.
26. Nguyễn Viết Tiến (2013). Cập nhật về hỗ trợ sinh sản. *Báo cáo tại Hội thảo quốc tế*, Hà Nội, 11/2013.
27. Nguyễn Đức Nhựt (2015). *Nghiên cứu bất thường NST và phát hiện mất đoạn AZFabcd ở những nam giới vô tinh và thiếu tinh nạng*. Luận án Tiến Sĩ Y học, Trường đại học Y Hà nội.
28. Trần Cúc Ánh (2012). *Nghiên cứu bộ NST ở những cặp vợ chồng vô sinh nguyên phát*, Nhà xuất bản Đại học khoa học tự nhiên.
29. Sarah K.G., Anna M., Peter N.S. (1997). Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Human Reproduction*, 12 (8), 1635 - 1641.
30. Nguyễn Thị Việt Hà (2012). *Nghiên cứu đứt đoạn nhỏ nhiễm sắc thể Y ở người bệnh vô sinh do không có tinh trùng hoặc ít tinh trùng*, Nhà xuất bản Đại học Khoa học tự nhiên.
31. Yong E.L., Loy C.J. and Sim K.S. (2003). Androgen receptor gene and male infertility. *Human Reproduction Update*, 9 (1), 1 - 7.



32. Amparo M., Chris K.S., Holly B.T. et al (2001). Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility. *Fertility and Sterility*, 75 (2), 275-281.
33. Chen H., Ruan Y.C., Xu W.M. et al (2012). Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility. *Human Reproduction Update*, 703 -713.
34. Safinejad K., Darbouy M., Kalantar S.M. et al (2011). The prevalence of common CFTR mutations in Iranian infertile men with non-CAVD obstructive azoospermia by using ARMS PCR techniques. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28(11): 1087-1090.
35. Sheena E., Lewis M., John A.R. (2013). The impact of sperm ADN damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reproductive Biomedicine Online*, 27 (4), 325 - 337.
36. Utsuno H., Oka K., Yamamoto A. (2013). Evaluation of sperm head shape at high magnification revealed correlation of sperm ADN fragmentation with aberrant head ellipticity and angularity. *Fertility and sterility*, 99 (6), 1573 - 80.
37. Pierzchlewsk M.M. (2017). Induction of puberty with human chorionic gonadotropin (hCG) followed by reversal of hypogonadotropic hypogonadism in Kallmann syndrome. *Endokrynol Pol*, 10.
38. Liu K., Zhao R. (2015). Role of genetic mutations in folate-related enzym genes on Male Infertility. *Sci Rep*, 5:15548
39. Soligo S.G., Barini R. (2017). Prevalence of the MTHFR C677T mutation in Fertile and Infertile Women. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 39(12).
40. Amuller G., Riva A. (1992). *Morphology and function of the human seminal vesicle*, *Andrologia*, 24: 183 - 196.
41. Winters B.R., Walsh T.J. (2014). The epidemiology of male infertility. *Urol. Clin. North Am.* 41, 195-204.

42. Yassa D.A., Idriss W.K., Atassi M.E. et al (2001). The diagnostic value of seminal  $\alpha$  - glucosidase enzyme index for sperm motility and fertilizing capacity. *Saudi Medical Journal*, 22 (11), 987 - 991.
43. Patel A., Dixit S.H., Patel M.A. et al (2013). Study of semen acid and alkaline phosphatase in relation to sperm count and motility. *The Southeast Asian Journal of Case Report and Review*, 2 (1), 112 - 121.
44. Prendergast F.G., Veneziale C.M. (1975). Control of fructose and citrate synthesis in guinea pig seminal vesicle epithelium. *J. Biol. Chem*, 250, 1282 - 1289.
45. Lund L. and Larsen S.B (1998). A follow-up study of semen quality and fertility in men with varicocele testis and in control subjects. *British Journal of Urology*, 82, 682 - 686.
46. Sharon A.K., Brenda E., Wyrobek J.A. (2001). Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertility and Sterility*, 75 (2), 237 - 248.
47. Ferlin A., Vinanzi C., Garolla A. et al (2006). Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clin. Endocrinol.* 65:606-610.
48. Sallmen M., Lindbohm M.L., Nurminen M. (2000). Paternal exposure by lead and infertility. *Epidemiology*, 11, 148-152.)
49. Braunstein G.D., Dahlgren J., Loriaux D.O. (1978). "Hypogonadism in chronically lead poisoned men", *Infertility*, 1: 33-51.
50. Bonde J. P., Ernst E. (1992). Sex hormones and semen quality in welders exposed to hexavalent chromium. *Hum. Exp. Toxicol*, 11: 259-263.
51. Schrader S.M., Turner T.W., Ratcliffe J.M. (1988). The effects of ethylene dibromide on semen quality: a comparison of short term and chronic exposure. *Reprod Toxicol*, 2: 191-198

52. Jequier A.M. (2002). Male infertility a guide for the clinician. *Oxford: Blackwell Science*.
53. Arabi M., Shareghi B. (2005). Anti-fertility effect of nicotine. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 11(5): 323-30.
54. Vilorio T., Marcos M. et al (2008). Cigarette smoking affects specific sperm oxidative defense but does not cause oxidative DNA damage in infertile men. *Fertility and Sterility*. Received, 11.
55. Courts S.M., Fulton N. and Anderson R.A. (2007). Environmental toxicant-induced germ cell apoptosis in the human fetal testis. *Human Reproduction*, 22(11): 2912-2918;
56. Suresh C. Sikka, Run Wang. (2008). Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J. Androl.* 10 (1): 134-145.
57. Pasqualotto F.F., Sobreiro B.P., Hallak J. et al. (2006). Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men. *BJU Int.* 97. 324-326.
58. De Jong A.M., Menkveld, R., Lens, J.W. (2014). Effect of alcohol intake and cigarette smoking on sperm parameters and pregnancy. *Andrologia*. 46, 112-117.
59. Muthusami K.R., Chinnaswamy P. (2005). Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertil Steril*, 84(4): 919-24.
60. Purohit V. (2000). Can alcohol promote aromatization of androgens to estrogens? *A review Alcohol*; 22(3): 123 - 127.
61. I. Figa Talamanca, Traina M.E., and Urbani E. (2000). Occupational exposures to metals, solvents and pesticides: recent evidence on male reproductive effects and biological markers. *Occup Med (Lond)*, 51(3):174-88.
62. Ichihara G., Asaed et al (1997). Testicular and hematopoietic toxicity of 2-bromopropane, a substitute for ozone layer-depleting chlorofluorocarbons. *J. Occup. Health*, 39. 57-63.

63. Vanhoorne M., Comhaire F., De Bacquer D. (1994). Epidemiological study of the effects of carbone disulfide on male sexuality and reproduction. *Arch. Environ. Health*, 49: 273-278.
64. Liu H.X., Qin W.H., Wang G.R. et al (1995). Some altered concentration of elements in semen workers exposed trinitrotoluene. *Occup. Environ. Med*, 52: 842-845.
65. Toppari J. (1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect*, 104: 741-803.
66. Guillette Jr. L. J., Crain D. A. (2000). Environmental endocrine disrupters: an evolutionary perspective. New York: Taylor & Francis.
67. Waissmann W. (2003). Endocrinopatologia associada ao trabalho. In: Mendes R, organizador. Patologia do trabalho. Sao Paulo: Editora Atheneu; 1093-1138.
68. Assuncao J.V., Pesquero C.R. (1999). Dioxinas e furanos: origens e riscos. *Rev Saude Publica*, 33: 523-530.
69. Tomezak S., Baumann K., Lehnert G. (1981). Occupational exposure to hexachlorocyclohexane. *Arch Occup Environ Health*, 48: 283-287.
70. Bush B, Lambert G., Tarbell A. (1996). Poly chlorinated biphenyl (PCB) and dichlorodiphenyl dichloroethylene (DDE) exposure among Native American men from contaminated Great Lakes fish and wildlife. *Toxicol Ind Health*, 12: 361-368.
71. Brouwer A., Longnecker M.P., Birnbaum L.S. et al (1999). Characterization of potential endocrine-related health effects at low-dose levels of exposure to PCBs. *Environ Health Perspect*, 107:639-49.
72. Li L.A., Wang P.W., Chang L.W. (2004). Polychlorinated biphenyl 126 stimulates basal and inducible aldosterone biosynthesis of human adrenocortical H295R cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 195:92-102.

73. Agletdinov E.F., Kamilov F.Kh. et al (2008). Gonadotoxic effects of polychlorinated biphenyls in experiments on male rats. *J. Antibiot. Khimioter*, 53(7-8): 15-18.
74. Metzler M. (2002). *The handbook of environmental chemistry*. Berlin: Springer-Verlag.
75. Benoff S., Jacob A., Hurley I. (2000). Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum Reprod Update*, 6:107-21.
76. Sherins R.J., DeVita V.T. Jr. (1973). Effect of drug treatment for lymphoma on male reproductive capacity. *Ann Intern Med*, 216- 220.
77. King K., Chan P.J., Patton W.C., King A. (1997). Antibiotics: effects on cryopreserved-thawed human sperm motility in vitro. *Fertil Steril*, 67(6): 1146-51.
78. Jens P. B., Aleksander G. (2014). Environmental xenobiotics and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*. 16, 3-4.
79. Bùi Thanh Tùng, Lê Thị Thu Hường và cộng sự (2014). Dược di truyền học: Tính đa hình họ enzym cytochrome P450 và các phản ứng có hại của thuốc. *Tạp chí Dược học*. 9.
80. Comhaire F.H., Mahmoud A.M.A., Schoonjans F. (2007). Sperm quality, birth rates and the environment in Flanders (Belgium). *Reprod Toxicol*, 23, 133 -137.
81. Padberg S., Bühner C., Menzel J. et al (2018). Xenobiotics and pathogens in breast milk: A risk for the child? *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 22. doi: 10.1007/s00103-018-2764-5.
82. Nebert D.W. (1997). Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: What is their clinical relevance and why do they exist. *Am. J. Hum. Genet*. 60. 265-271.

83. Polonikov A.V., Ivanov V.P., Solodilova M.A. (2009). Genetic variation of genes for xenobiotics-metabolizing enzymes and risk of bronchial asthma: the importance of gene-gene and gene-environment interactions for disease susceptibility. *J. Hum. Genet.* 54, 440-449.
84. Comhaire F.H., Mahmoud A.M.A., Schoonjans F. (2007). Sperm quality, birth rates and the environment in Flanders (Belgium). *Reprod Toxicol.* 23:133-137.
85. Guengerich P.F. (2000). Pharmacogenomics of cytochrome P450 and other enzymes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Drug Dev. Res.* 49, 4-16.
86. Winters B.R., Walsh T.J. (2014). The epidemiology of male infertility. *Urol. Clin. North Am.* 41, 195-204
87. Singh K., Jaiswal D. (2011). Human male infertility: a complex multifactorial phenotype. *Reprod. Sci.* 18, 418-425.
88. Schuppe H.C., Wieneke P., Donat S. et al (2000). Xenobiotics metabolism, genetic polymorphisms and male infertility. *Andrologia* 32, 255-262.
89. Mena Ulecia K., MacLeod Carey D. (2018). Interactions of 2-phenyl-benzotriazole xenobiotics compounds with human Cytochrome P450-*CYP1A1* by means of docking, molecular dynamics simulations and MM-GBSA calculations. *Comput. Biol. Chem.* 74:253-262.
90. *CYP1A1* cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1 [Homo sapiens (human)] (2017). Gene ID: 1543, updated on 8-Oct-2017.
91. Sadler N.C., Webb Robertson B.M. et al (2018). High-Fat Diets Alter the Modulatory Effects of Xenobiotics on Cytochrome P450 Activities. *Chem. Res. Toxicol.* 21; 31(5):308-318.

92. Zhang Y.Z., Zuo Y.Z., Du Z.H. et al (2018). Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced hepatotoxicity in quails (*Coturnix japonica*) via triggering nuclear xenobiotics receptors and modulating cytochrome P450 systems. *Food. Chem. Toxicol.* 11;120:287-293.
93. Lin J., Zhao H.S., Qin L., Li X.N., Zhang C. (2018). Atrazine Triggers Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Quail (*Coturnix C. coturnix*) Cerebrum via Activating Xenobiotics-Sensing Nuclear Receptors and Modulating Cytochrome P450 Systems. *J. Agric. Food Chem.* 27;66(25):6402-6413.
94. Androutsopoulos V.P., Tsatsakis A.M., Spandidos D.A. (2009). Cytochrome P450 *CYP1A1*: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*, 9, 187.
95. Liu D., Qin S., Ray B. et al (2018). Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Distant from Xenobiotics Response Elements Can Modulate Aryl Hydrocarbon Receptor Function: SNP- Dependent *CYP1A1* Induction. *Drug. Metab. Dispos.* 6. pii: dmd.118.082164. doi: 10.1124/dmd.118.082164.
96. Gao K., Wang Z.Q., Liu X.C., Dong Z.L., Shan W.S. (2017). Genetic genes associated with oligospermia, asthenospermia and teratospermia: Advances in studies. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 23(4): 367-371.
97. Luo H., Li H., Yao N., Hu L. et al (2014). Association between 3801T>C polymorphism of *CYP1A1* and idiopathic male infertility risk: a systematic review and meta-analysis, *PLoS One*, 9(1).
98. Ramgir S.S., Sekar N., Jindam D. V.G.A. (2017). Association of *CYP1A1\*2A* Polymorphism with Idiopathic Non- Obstructive Azoospermia in A South Indian Cohort. *Int. J. Fertil. Steril.* 11(3):142-147.
99. Ramgir S.S., Sekar N., Jindam D. et al (2017). Association of *CYP1A1\*2A* Polymorphism with Idiopathic Non-Obstructive Azoospermia in A South Indian Cohort. *Int J Fertil Steril*, 11(3):142-147.

100. Fritsche E., Schuppe H.C., Dohr O. et al (1998). Increased frequencies of cytochrome P4501A1 polymorphisms in infertile men, *Andrologia*, 30, pp.125-128.
101. Lu N., Wu B., Xia Y., Wang W. et al (2008). Polymorphisms in *CYP1A1* gene are associated with male infertility in a Chinese population, *International Journal of Andrology*, (5), pp.527-533.
102. Ociepa Zawal M., Rubiś B., Filas V. et al (2009). Studies on CYP1A1, CYP1B1 and CYP3A4 gene polymorphisms in breast cancer patients. *Ginekol. Pol.* 80(11):819-23.
103. Van Erp N.P., Eechoute K., van der Veldt A.A. et al (2009) Pharmacogenetic pathway analysis for determination of sunitinib-induced toxicity. *J Clin Oncol.* 10;27(26):4406-4412.
104. Chen Y.Z., Li J., Zhao Y.X. et al (2014). Genetic polymorphisms in the CYP1A1 and CYP1B1 genes and susceptibility to bladder cancer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 41(8):4929-4940.
105. Wang Y., Kong C.Z., Zhang Z., Yang C.M., Li J. (2014). Relationships between CYP1A1 genetic polymorphisms and bladder cancer risk: a meta-analysis. *DNA Cell Biol.* 33(3):171-181.
106. C. M. Wright, J. E. Larsen, M. L. Colosimo et al (2010). Genetic association study of *CYP1A1* polymorphisms identifies risk haplotypes in nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Journal.* 35: 152-159.
107. Chang B.L., Zheng S.L., Isaacs S.D. et al (2003). Polymorphisms in the CYP1A1 gene are associated with prostate cancer risk. *Int. J. Cancer.* 106(3):375-378.
108. Li H., Xiao D., Hu L., He T. (2012). Association of CYP1A1 polymorphisms with prostate cancer risk: an updated meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 39(12):10273-84.



109. Vineis P., Alavanja M., Buffler P. et al (2004). Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 96, 99 - 106.
110. Topic A., Nagorni Obradovic L. (2016). Oxidative Stress and Polymorphism of Xenobiotics-Metabolizing Enzymes in Two Patients with Severe Alpha-1-Antitrypsin Deficiency. *Biochem Genet*, 54(5).
111. Ishii T., Matsuse T., Teramoto S. et al (1999) Glutathione S-transferase P1 (*GSTP1*) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 54: 693 - 696.
112. Jaiswal D., Sah R., Agrawal N.K. (2012). Combined effect of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms on human male infertility in north Indian population. *Reprod. Sci.* 19, 312-316.
113. Hirvonen A. (1999). Polymorphisms of xenobiotics-metabolising enzymes and susceptibility to cancer. *Environ Health Perspect* 107(1) 37-47.
114. Li C., Ding X.P., Fu L., Chen L. (2013). Association between glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) and idiopathic azoospermia. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 30(1):102-105.
115. Chen Z.H., Xian J.F., Luo L.P. (2017). Association between GSTM1, GSTT1, and *GSTP1* polymorphisms and gastric cancer risk, and their interactions with environmental factors. *Genet Moi Res*, 16(1).
116. Afrand M., Bashardoost N., Sheikhha MH. (2015). Association between Glutathione S-Transferase GSTM1-T1 and P1 Polymorphisms with Metabolic Syndrome in Zoroastrians in Yazd, Iran. *Iran J Public Health.* 44(5), 673 - 82.
117. Xiong D.K., Chen H.H., Ding X.P. (2015). Association of polymorphisms in glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, *GSTP1*) with idiopathic azoospermia or oligospermia in Sichuan, China. *Asian J Androl*, 17(3), 481 - 6.

118. Yarosh S.L., Kokhtenko E.V., Churnosov M.I., (2015). Joint effect of glutathione S-transferase genotypes and cigarette smoking on idiopathic male infertility. *Adrologia*, 47(9), 980 - 6.
119. Feng Z., Jing Z., Liu H., Liao S. (2015). Association of SPO11 and GST gene polymorphisms with idiopathic male infertility in ethnic Han Chinese. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 32(6), 866 - 70.
120. Ruiz J.D., Agúndez J.A.G., Martínez C. (2009). *NAT2* (N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase)).
121. Sim E., Pinter K. (2003). Arylamine N-acetyltransferases: A pharmacogenomic approach to drug metabolism and endogenous function. *Biochem Soc Trans*. 31, 615 - 9.
122. de Souza Anselmo C., Sardela V.F., de Sousa V.P. (2018). Zebrafish (*Danio rerio*): A valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans? *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol Pharmacol*. 212: 34-46.
123. Hein D.W., Doll M.A., Fretland A.J. et al (2000). Molecular genetics and epidemiology of the *NAT1* and *NAT2* acetylation polymorphisms. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 9, 29 - 42.
124. Magalon H., Patin E., Austerlitz F. (2008). Population genetic diversity of the *NAT2* gene supports a role of acetylation in human adaptation to farming in Central Asia. *European Journal Human Genetic*, 16(2), 243 - 251
125. Etienne Patin, Luis B. Barreiro (2006). Deciphering the Ancient and Complex Evolutionary History of Human Arylamine N-Acetyltransferase Genes. *The American Journal of Human Genetics*, 78, 423 - 436.
126. Vatsis K.P., Weber W.W., Bell D.A. et al (1995). Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics*, 5, 1 - 17.

127. Sergey L. Y., Elena V. K. (2014). Synergism between the *N*-acetyltransferase 2 gene and oxidant exposure increases the risk of idiopathic maleinfertility. *Reproductive BioMedicine Online*.
128. Hein et al (2000). Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev*, 9, 29 - 42.
129. Hein et al (2002). Association of prostate cancer with rapid *N*-acetyltransferase 1 (NAT1\*10) in combination with slow *N*-acetyltransferase 2 acetylator genotypes in a pilot case-control study. *Environ. Mol. Mutagen.* 40, 161 - 167.
130. Yarosh S.L., Kokhtenko E.V., Churnosov M.I. (2014). Synergism between the *N*-acetyltransferase 2 gene and oxidant exposure increases the risk of idiopathic male infertility. *Reprod Biomed Online*, 29(3), 362-369.
131. Newton C. R., Graham A., Heptinstall L. E. et al (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS), *Nucleic Acids Research*, 17(7), pp.2503-2516
132. Nejati M. and Karimian M. (2016). The rs4646903 gene transition and idiopathic male infertility: A systematic literature review and meta-analysis. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 9(4), 718-724.
133. Ritchie MD, Hahn LW, Moore JH (2003). Power of multifactor dimensionality reduction for detecting gene-gene interactions in the presence of genotyping error, missing data, phenocopy, and genetic heterogeneity. *Genet. Epidemiol.* 24:150–157.
134. Moore JH (2004). Computational analysis of gene - gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Expert Rev Mol Diagn.* 4:795–803.

135. Moore JH, Gilbert JC, Tsai C-T (2006). A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *J. Theoretical Biol.* 241:252–261.
136. Yufeng Qin (2013). Interactions between Urinary 4-tert-Octylphenol Levels and Metabolism Enzym Gene Variants on Idiopathic Male Infertility. *Plos one*, Volume 8 (3).
137. Brahem S., Mehdi M., Elghezai H. et al (2011). The effects of male aging on semen quality, sperm ADN fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *Journals of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(5), 425-432.
138. M. Dorostghoal, S. R. Kazeminejad, N. Shahbazian et al (2017). "Oxidative stress status and sperm ADN fragmentation in fertile and infertile men", *Andrologia*, 49(10).
139. A. Kasperczyk, M. Dobrakowski, Z. P. Czuba (2015). "Environmental exposure to lead induces oxidative stress and modulates the function of the antioxidant defense system and the immune system in the semen of males with normal semen profile", *Toxicol Appl Pharmacol*, 284(3), tr. 339-44.
140. Trần Đức Phần, Phan Thị Hoan, Lê Đình Trung (2009). Tình hình thiếu năng sinh sản ở 18 phường xã của Thái Bình. *Y học thực hành*, 6(664). 45-48.
141. Nejati M., Karimian M. (2016). The rs4646903 gene transition and idiopathic male infertility: A systematic literature review and meta-analysis. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 9(4), 718-724.
142. Yarosh S.L., Kokhtenko E.V., Starodubova N.I. et al (2013). Smoking status modifies the relation between *CYP1A1\*2C* gene polymorphism and idiopathic male infertility: the importance of gene-environment interaction analysis for genetic studies of the disease. *Reprod Sci*, 20(11), 1302- 1307.

143. Crofts F., Cosma G.N., Currie D. (1993). A novel *CYP1A1* gene polymorphism in african-Americans. *Carcinogenesis*. 14(9):1729-31.
144. Gaikovitch E.A., Cascorbi I., Mrozikiewicz P.M. et al (2003). Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, *CYP1A1*, *NAT2* ADN of P-glycoprotein in a Russian population, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 59(4), pp.303-312.
145. Szczepańska N., Kudlak B., Namieśnik J. (2018). Recent advances in assessing xenobiotics migrating from packaging material - A review. *Anal. Chim. Acta*. 6;1023:1-21.
146. Đinh Đoàn Long, Phạm Thị Hồng Nhung, Trần Thị Thùy Anh (2010). Nghiên cứu tần số của đa hình đơn nucleotit gen N-acetyltransferase 2 (*NAT2*) ở người Việt Nam. *VNU Journal of Science*, 27 (2011), 245-250.
147. Sang H., Hulvey J.P., Green R (2018). A Xenobiotics Detoxification Pathway through Transcriptional Regulation in Filamentous Fungi. *MBio*. 17;9(4). pii: e00457-18.
148. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 45:51-88.
149. Ali Osman F., O. Akande, G. Antoun J. X. (1997). Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cADNs of three human glutathione S-transferase pi gene variants. *J. Biol. Chem*. 272: 10004-10012
150. Hemachanda T., Shaha C. (2003). Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. *FEBS letters*, 538: 14-18.
151. Raijmakers M.T.M, M.Sc.a, Hennie MJ Roelofs (2009). Glutathione and glutathione S-transferases Al-1 and Pl-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. *Fertility and Sterility*, Volume 79, Issue 1, Pages 169-172.

152. Safarinejad M. R., Dadkhah F., Asgari M.A. (2012). Glutathione S-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTT1, *GSTP1*) and male factor infertility risk: a pooled analysis of studies. *Urol J.* 9: 541-548.
153. Fan Y., Yu G., Yu J. (2018). Research Trends and Hotspots Analysis Related to the Effects of Xenobiotics on Glucose Metabolism in Male Testes. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15(8), 1590.
154. Song N., Tan W., Xing D., Lin D. (2001). *CYP1A1* polymorphism and risk of lung cancer in relation to tobacco smoking: a case-control study in China. *Carcinogenesis*, **22**, 11-6.
155. R. Jones, T. Mann, R. Sherins (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma, *Fert Steril* 31, 531-537.
156. S.H. Kao, H.T. Chao, H.W. Chen, T.I. Hwang, T.L. Liao, Y.H. Wei (2007). Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility, *Fertil. Steril.* 89 (5) 1183-1190.
157. G. Eslamian, N. Amirjannati, B. Rashidkhani (2012). Hekmatdoost, Intake of food groups and idiopathic asthenozoospermia: a case-control study, *Hum.Reprod* 27. 3328-3336.
158. E. de Lamirande, C. Tsai, A. Harakat, C. Gagnon (1998). Involvement of reactive oxygen species in human sperm arcosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates, *J. Androl.* 19, 585-594.
159. D.W. Hein, M.A. Doll (2017). Rabbit N-acetyltransferase 2 genotyping method to investigate role of acetylation polymorphism on N- and O-acetylation of aromatic and heterocyclic amine carcinogens, *Arch. Toxicol.* 91, 3185.

160. Tsirka T., Konstantopoulou M., Sabbagh A. (2018). Comparative analysis of xenobiotics metabolising N-acetyltransferases from ten non-human primates as in vitro models of human homologues. *Scientific Reports*. 27;8(1):9759. doi: 10.1038/s41598-018-28094-6.
161. J. M. Dupret et al (2011). Pesticide-derived Aromatic Amines and Their Biotransformation, Publisher: InTech, 601 - 605.
162. M. Taspinar, S. E. Aydos, O. Comez et al (2008). "CYP1A1, GST gene polymorphisms and risk of chronic myeloid leukemia", *Swiss Med Wkly*, 138(1-2), tr. 12-7.
163. Gharagozloo P., Aitken R.J. (2011). The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy, *Hum. Reprod.* 26: 1628-1640.
164. N. Lakpour, A. Mirfeizollahi et al (2013). The association of seminal plasma antioxidant levels and sperm chromatin status with genetic variants of GSTM1 and GSTP1 (Ile105Val and Ala114Val) in infertile men with oligoasthenoteratozoospermia, *Dis. Markers* 34, 205-210.
165. Ali-Osman F., Akande O., Antoun G. et al (1997). Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cADNs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins, *Biochemistry*, 272(15), pp.10004-10012.
166. V. Paracchini, S. Garte, E. Taioli (2006). MTHFR C677T polymorphism, GSTM1 deletion and male infertility: a possible suggestion of a gene-gene interaction? *Biomarkers* 11, 53-60.
167. F.F. Pasqualotto, R.K. Sharma, D.R. Nelson, A.J. Thomas, A. (2000). Agarwal, Relationship between oxidative stress, semen characteristics and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation, *Fertil. Steril.* 73, 459-464.

168. Moore J.H., Williams S.M. (2009). Epistasis and its implications for personal genetics. *American Journal of Human Genetics* 85:309-320.
169. Jiang X., Barmada M.M., Visweswaran S. (2010). Identifying genetic interactions in genome-wide data using Bayesian networks. *Genetic Epidemiology* 34:575-581.
170. Ritchie M.D., Hahn L.W., Roodi N. (2001). Multifactor dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *American Journal of Human Genetics* 69:138-147.
171. Alison A Motsinger, Marylin D Ritchie (2006). Multifactor dimensionality reduction: An analysis strategy for modelling and detecting gene - gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies. *Hum Genomics*. 2(5): 318–328.
172. Andrew A.S., Nelson H.H., Kelsey K.T. (2006). Concordance of multiple analytical approaches demonstrates a complex relationship between ADN repair gene SNPs, smoking, and bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 27: 1030-1037
173. Andrew A.S., Karagas M.R., Nelson H.H. (2008). ADN repair polymorphisms modify bladder cancer risk: A multifactor analytic strategy. *Hum Hered.* ;65:105-118
174. Chen M., Kamat A.M., Huang M., Grossman H.B. (2007). High-order interactions among genetic polymorphisms in nucleotide excision repair pathway genes and smoking in modulating bladder cancer risk. *Carcinogenesis*. 28:2160-2165
175. Huang M., Dinney C.P., Lin X., Lin J., Grossman H.B., Wu X. (2007). High-order interactions among genetic variants in ADN base excision repair pathway genes and smoking in bladder cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16: 84-91.



176. Greene C.S., Sinnott Armstrong N.A. (2010). Multifactor dimensionality reduction for graphics processing units enables genome-wide testing of epistasis in sporadic ALS. *Bioinformatics*. 26:694-695.
177. Mahachie J.M., Baurecht H., Rodríguez E. (2010). Analysis of the high affinity IgE receptor genes reveals epistatic effects of FCER1A variants on eczema risk. *Allergy*. 2010. 65:875-882.
178. Yang et al (2018). Multi-Criteria Decision Analysis-Based MDR for Gene-Gene Interaction Detection. Kexin Leave a Comment.
179. Zhou J.B., Liu C., Niu W.Y. (2012). Contributions of renin-angiotensin system-related gene interactions to obesity in a Chinese population. *PLoS ONE* 7(8):e42881.
180. Dong C., Wang S., Li W.D., Li D., Zhao H., Price R.A. (2003). Interacting genetic loci on chromosomes 20 and 10 influence extreme human obesity. *American Journal of Human Genetics* 72:115-124
181. J. Gosalvez, L. Coppola, J. L. Fernandez et al (2017). "Multi-centre assessment of nitroblue tetrazolium reactivity in human semen as a potential marker of oxidative stress", *Reprod Biomed Online*, 34 (5), tr. 513-521.
182. Correia Branco A., Keating E., Martel F. (2018). Placentation related processes in a human first-trimester extravillous trophoblast cell line (HTR-8/SVneo cells) are affected by several xenobiotics. *Drug. Chem. Toxicol.* 3:1-5.
183. R. J. Aitken, M. A. Baker (2004). "Oxidative stress and male reproductive biology", *Reprod Fertil Dev*, 16(5), tr. 581-8.
184. Elena Albani Valeria Maria Iommiello, Alessandra Di Rosa (2015). "Ejaculate Oxidative Stress Is Related with Sperm ADN Fragmentation and Round Cells", *International journal of Endocrinology*, tr. 1-6.
185. A. Pujol, A. Obradors, E. Esteo et al (2016). "Oxidative stress level in fresh ejaculate is not related to semen parameters or to pregnancy rates in cycles with donor oocytes", *J Assist Reprod Genet*, 33(4), tr. 529-34.

186. J. Gosalvez, L. Coppola, J. L. Fernandez et al (2017). "Multi-centre assessment of nitroblue tetrazolium reactivity in human semen as a potential marker of oxidative stress", *Reprod Biomed Online*, 34(5), 513-521.
187. R. Kumar, S. Venkatesh, M. Kumar et al (2009). "Oxidative stress and sperm mitochondrial ADN mutation in idiopathic oligoasthenozoospermic men", *Indian J Biochem Biophys*, 46(2), 172-7.
188. A. Agarwal, G. Ahmad and R. Sharma (2015). "Reference values of reactive oxygen species in seminal ejaculates using chemiluminescence assay", *J Assist Reprod Genet*, 32(12), 1721-9.
189. Xin Yang, Man-Tang-Qui, Jing-Wen-Hu (2013). GSTT1 Null Genotype Contributes to Lung Cancer Risk in Asian Populations: A Meta-Analysis of 23 Studies. *PLoS One*. 2013; 8(4): e62181
190. Fan Y., Yu G., Wang C. (2018). Research Trends and Hotspots Analysis Related to the Effects of Xenobiotics on Glucose Metabolism in Male Testes. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15(8), 1590.
191. Strange R. C., Spiteri M.A. et al (2001). "Glutathion -S-transferase genetics family of enzymes", *Mutation Research*, 482, 21-26.
192. Sena Erdogan Aydos et al (2009). Association of *CYP1A1* and glutathione S-transferase polymorphisms with male factor infertility, *Fertility and Sterility*® Vol. 92, No. 2.
193. Wilke R.A., Reif D.M., Moore J.H. (2005). Combinatorial pharmacogenetics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 911-918.

**PHỤ LỤC I**  
**DANH SÁCH ĐỐI TƯỢNG THAM GIA NGHIÊN CỨU**

**Danh sách bệnh nhân nhóm bệnh**

<b>STT</b>	<b>Mã BC</b>	<b>Mã bệnh nhân</b>	<b>Họ và tên</b>	<b>Tuổi</b>
1.	1.0	H1601	Nguyen Thanh D.	31
2.	1.0	H1602	Bui Van D.	27
3.	1.0	A1658	Duong Van T.	33
4.	1.0	A1659	Vu Xuan T.	36
5.	1.0	A1661	Vu Dinh Tr.	40
6.	1.0	A1662	Hoang Van C.	32
7.	1.0	A1663	Hoang Dinh M.	25
8.	1.0	A1646	Doan Viet H.	42
9.	1.0	A1647	Lê Thành Nh.	29
10.	1.0	A1666	Le Van Tr.	31
11.	1.0	A1668	Le Thai Th.	32
12.	1.0	A1669	Pham Van H.	29
13.	1.0	A1673	Vu Phuong T.	24
14.	1.0	A1675	Hoang Van H.	34
15.	1.0	A1677	Nguyen Duc H.	28
16.	1.0	A1678	Nguyen Quang H.	25
17.	1.0	A1683	Hoang Van H.	28
18.	1.0	A1684	Le Xuan C.	31
19.	1.0	A1686	Pham Van Th.	24
20.	1.0	A1687	Bui Dinh Ch.	31
21.	1.0	A1691	Nguyen Manh Th.	36
22.	1.0	A1692	Tran Duc Ngh.	30
23.	1.0	A1679	Vu Duy M.	45
24.	1.0	A1693	Tran Ngoc T.	32
25.	1.0	A1695	Vu Tien D.	31
26.	1.0	A1699	Vo Van Ph.	33
27.	1.0	A16100	Le Hong H.	18

28.	1.0	A16113	Nguyen Dinh D.	32
29.	1.0	A16114	Chu Van C.	33
30.	1.0	A16116	Le Van Ph.	32
31.	1.0	A16106	Dinh Quoc H.	29
32.	1.0	A16110	Lam Van Tr.	35
33.	1.0	A16120	Nguyen Trung K.	27
34.	1.0	A16127	Nguyen Huu C.	37
35.	1.0	A16121	Nguyen Cong H.	33
36.	1.0	A16134	Vo Thanh K.	30
37.	1.0	A16138	Le Ngoc D.	41
38.	1.0	A16123	Nguyen Ba S.	29
39.	1.0	B1601	Bui Duc Ph.	25
40.	1.0	B1602	Nguyen Xuan H.	47
41.	1.0	B1603	Nguyen Minh H.	38
42.	1.0	B1604	Trinh Huu Th.	30
43.	1.0	B1605	Nguyen Van T.	52
44.	1.0	A16132	Nguyen Thanh Tr.	25
45.	1.0	A16133	Tran Van T.	22
46.	1.0	A16146	Dinh Van Ng.	33
47.	1.0	A16147	Nguyen Van S.	29
48.	1.0	A16148	Nguyen Duc V.	42
49.	1.0	A16149	Thân Quang T.	31
50.	1.0	A16150	Vu Tuan Tr.	32
51.	1.0	A16151	Hoàng Anh Q.	28
52.	1.0	H1603	Chu Dinh M.	40
53.	1.0	H1604	Nguyen Anh Th.	26
54.	1.0	A1780	Nguyen Van C.	41
55.	1.0	A1781	Nguyen Trung K.	39
56.	1.0	A1782	Mai Van X.	34
57.	1.0	A1783	Nguyen Hoang H.	27
58.	1.0	A1784	Vu Manh Th.	40
59.	1.0	A1785	Duong Van S.	25

60.	1.0	A1786	Nguyen Cong T.	29
61.	1.0	A1794	Pham Ba Ph.	28
62.	1.0	A1797	Pham Van Th.	30
63.	1.0	A1798	Nguyen Xuan Th.	28
64.	1.0	A1799	Nguyen Van Ng.	33
65.	1.0	A17100	Truong Cong B.	28
66.	1.0	A17140	Le Van S.	29
67.	1.0	A17143	Ta Van K.	28
68.	1.0	A17152	Nguyen Trung K.	38
69.	1.0	A17153	Pham Tuan A.	23
70.	1.0	A17161	Nguyen Cao D.	30
71.	1.0	A17163	Pham Ngoc T.	32
72.	1.0	A17164	Dinh Van U.	27
73.	1.0	A17168	Do Hoang L.	24
74.	1.0	A17169	Nguyen Tat T.	31
75.	1.0	A17170	Nguyen Van Th.	33
76.	1.0	A17171	Duong Huu H.	33
77.	1.0	A17175	Vu Van T.	33
78.	1.0	A17176	Nguyen Manh Th.	34
79.	1.0	A17182	Le Xuan H.	34
80.	1.0	A17189	Nguyen Duc Nh.	29
81.	1.0	A17191	Nguyen Van S.	31
82.	1.0	A17193	Nguyen Quoc D.	38
83.	1.0	A17194	Tran Duy Ch.	35
84.	1.0	A17195	Do Duc H.	30
85.	1.0	X1860	Nguyen Van M.	26
86.	1.0	X1840	Luu Xuan H	30
87.	1.0	X1836	Quach Van Gi.	33
88.	1.0	X1814	Doan Thien T.	42
89.	3.0	O.17115	Nguyen Manh H.	26
90.	3.0	O.17132	Cao The A.	35
91.	3.0	O.17135	Dang Ngoc H.	31

92.	3.0	O.17160	Tran Thanh Th.	33
93.	3.0	O.1705	Doan Dinh H.	28
94.	3.0	O.17001	Nguyen Duy Th.	29
95.	3.0	O.17002	Nguyen Minh H.	32
96.	3.0	O.17003	Le Van Tr.	29
97.	3.0	O.17004	Nguyen Tien C.	44
98.	3.0	O.17005	Nguyen Phuc Th.	32
99.	3.0	O.17006	Nguyen Van T.	30
100.	3.0	O.17007	Nguyen Huy H.	23
101.	3.0	O.17008	Phan Dinh Th.	29
102.	3.0	O.17009	Ho The Th.	32
103.	3.0	O.17010	Dam Dinh H.	25
104.	3.0	O.17011	Nguyen Quang H.	33
105.	3.0	O.17012	Lò Anh M.	24
106.	3.0	O.17013	Ta Tuan V.	29
107.	3.0	O.17014	Tran Huu H.	28
108.	3.0	O.17015	Nguyen Xuan C.	21
109.	3.0	O.17016	Duong Minh L.	30
110.	3.0	O.17017	Nguyen Ba Th.	30
111.	3.0	O.17018	Nguyen Van C.	31
112.	3.0	O.17019	Hoang Tho D.	30
113.	3.0	O.17020	Nguyen Hai H.	41
114.	3.0	O.17021	Nguyen Huu H.	28
115.	3.0	O.17022	Nguyen Duy H.	42
116.	3.0	O.17023	Nguyen Ngoc D.	40
117.	3.0	O.17024	Dang Ngoc H.	31
118.	3.0	O.17025	Tran Thanh Th.	32
119.	3.0	O.17026	Nguyen Manh H.	26
120.	3.0	O.17027	Cao The A.	35
121.	3.0	O.17028	Doan Dinh H.	27
122.	3.0	O.17029	Tran Van C.	32
123.	3.0	O.1730	Nguyen Duc Th.	46

124.	3.0	AO1792	Nguyen Van H.	36
125.	3.0	AO17142	Dang Minh Th.	29
126.	3.0	AO17150	Pra Chan Ch.	32
127.	3.0	AO17157	Hoang Tho D.	31
128.	3.0	AO17179	Luu Van T.	25
129.	3.0	AO17202	Nguuyen Ngoc H.	28
130.	3.0	AO17203	Vuong Chi Th.	26
131.	3.0	AO17207	Ha Van A.	30
132.	3.0	AO17219	Duong Minh L.	30
133.	3.0	AO17250	Nguyen Minh H.	33
134.	3.0	AO17251	Nguyen Duy Th.	28
135.	3.0	AO17253	Le Van Tr.	28
136.	3.0	O.17031	Vu Van H.	32
137.	3.0	O.17032	Pham Van T.	33
138.	3.0	O.17033	Le Dinh H.	45
139.	3.0	O.17034	Cao Thien V.	30
140.	3.0	O.17035	Nguyen Dinh N.	23
141.	3.0	O.17036	Nguyen Van T.	30
142.	3.0	O.17037	Dang Doan Th.	26
143.	3.0	O.17038	Doan Thien T.	42
144.	3.0	O.17039	Vu Van H.	27
145.	3.0	O.17040	Duong Van N.	34
146.	3.0	O.17041	Nguyen Huu Th.	26
147.	3.0	O.17042	Nguyen Kien Tr.	28
148.	3.0	O.17043	Luu Dinh T.	27
149.	3.0	O.17044	Bui Van D.	31
150.	3.0	O.17045	Dao Huy D.	30
151.	3.0	O.17046	Tran Dinh D.	27
152.	3.0	O.17047	Ngo Dinh C.	32
153.	3.0	O.17048	Bui Huy B.	43
154.	3.0	O.17049	Le Van C.	34
155.	3.0	X1865	Mai Anh H.	29

156.	3.0	X1809	Duong Van N.	34
157.	3.0	X1855	Nguyen Tuan D.	30
158.	3.0	X1846	Hoang Khuong D	34
159.	3.0	X1845	Vu Khanh Tr.	30
160.	3.0	X1841	Nguyen Van H	30
161.	3.0	X1838	Nguyen Viet C.	34
162.	3.0	X1835	Vu Van D.	26
163.	3.0	X1834	Nguyen Van Tuan A.	22
164.	3.0	X1826	Bui Van T.	35
165.	3.0	X1812	Vuong Duy C.	25
166.	3.0	X1804	Do Hai L.	31
167.	3.0	X1801	Dao Huy D.	30
168.	3.0	X1706	Tran Dinh D.	27
169.	3.0	X1704	Ngo Dinh C.	32
170.	3.0	X1703	Bui Huy B.	44



## Danh sách bệnh nhân nhóm đối chứng

STT	Mã BC	Mã bệnh nhân	Họ và tên	Tuổi
1.	2.0	C1601	Le Ngoc H.	24
2.	2.0	C1602	Nguyen Ba S.	25
3.	2.0	C1603	Pham The V.	25
4.	2.0	C1604	Nguyen Minh T.	24
5.	2.0	C1605	Dinh The H.	25
6.	2.0	C1606	La Dinh Tr.	39
7.	2.0	C1607	Le Viet A.	40
8.	2.0	C1608	Ngo Thanh B.	28
9.	2.0	C1609	Nguyen Xuan D.	39
10.	2.0	C1610	Pham Tien D.	34
11.	2.0	C1611	Hoàng Anh Q.	28
12.	2.0	C1612	Ngo Van D.	36
13.	2.0	C1613	Hoàng Phúc Tr.	34
14.	2.0	C1614	Chu Huy L.	28
15.	2.0	C1615	Nguyen Van Kh.	34
16.	2.0	C1616	Dinh Ngoc L.	31
17.	2.0	C1617	Pham Van D.	38
18.	2.0	C1618	Tran Duc Q.	24
19.	2.0	C1619	Nguyen Van L.	22
20.	2.0	C1620	Nguyen Van H.	23
21.	2.0	C1621	Tran Quang M.	35
22.	2.0	C1622	Duong Huy Th.	34
23.	2.0	C1623	Kieu Xuan Q.	46
24.	2.0	C1624	Hoang Cong Ngh.	34
25.	2.0	C1625	Kieu Trung K.	35
26.	2.0	C1626	Nguyen Anh Th.	35
27.	2.0	C1627	Vu Xuan C.	34
28.	2.0	C1628	Vu Quang T.	33
29.	2.0	C1629	Pham Xuan N.	24
30.	2.0	C1630	Doan Huy H.	24

31.	2.0	C.1631	Kieu Xuan C.	32
32.	2.0	C1632	Nguyen Bao Kh.	30
33.	2.0	C.1701	Nguyen Duc Th.	34
34.	2.0	C.1702	Nguyen Thanh T.	42
35.	2.0	C.1703	Truong Quoc V.	31
36.	2.0	C.1704	Phan Chi Th.	32
37.	2.0	C.1705	Dang Hong Th.	34
38.	2.0	C.1706	Nguyen Bui Ch.	27
39.	2.0	C.1707	Nguyen Van Th.	36
40.	2.0	C.1708	Nguyen Tien C.	34
41.	2.0	C.1709	Ngo Van H.	33
42.	2.0	C.1710	Nguyen Van Th.	32
43.	2.0	C.1711	Pham Van T.	36
44.	2.0	C.1712	Phung Van Th.	42
45.	2.0	C.1713	Hoang Van H.	31
46.	2.0	C.1714	Bui Tuan A.	30
47.	2.0	C.1715	Trinh T.	48
48.	2.0	C.1716	Bui Xuan Nh.	32
49.	2.0	C.1717	Bui Quang H.	33
50.	2.0	C.1718	Phung Quang Th.	33
51.	2.0	C.1719	Nguyen Hong S.	45
52.	2.0	C.1720	Lam Phuc C.	27
53.	2.0	C.1721	Vu Van S.	39
54.	2.0	C.1722	Nguyen Van M?Nh.	36
55.	2.0	C.1723	Chu Huy N.	32
56.	2.0	C.1724	Kieu Van S.	26
57.	2.0	C1726	Vu Cong B.	32
58.	2.0	C1727	Dao Van Th.	45
59.	2.0	C1736	Nguyen Duy H.	37
60.	2.0	C1737	Tran H.	29
61.	2.0	C1738	Nguyen Van Ph.	30
62.	2.0	C1739	Phung Tuan D.	33

63.	2.0	C1740	Le Van M.	28
64.	2.0	C1741	Nguyen Cong H.	34
65.	2.0	C1742	Dang Van H.	23
66.	2.0	C1743	Dao Trong T.	33
67.	2.0	C1744	Vi Van Th.	31
68.	2.0	C1745	Doan Hong M.	27
69.	2.0	C1746	Tran Viet H.	41
70.	2.0	C1747	Nguyen Thanh T.	32
71.	2.0	C1748	Than Duc C.	36
72.	2.0	C1749	Hoang Dinh Th.	31
73.	2.0	C1750	Truong Ngoc H.	29
74.	2.0	C1751	Ha Van T.	24
75.	2.0	C1752	Nguyen Van H.	31
76.	2.0	C1753	Pham Van Kh.	34
77.	2.0	C1754	Nguyen Trung K.	33
78.	2.0	C1755	Do Van B.	30
79.	2.0	C1756	Le Huu D.	52
80.	2.0	C1757	Truong Van H.	30
81.	2.0	C1758	Ha Doan Th.	27
82.	2.0	C1759	Do The H.	28
83.	2.0	C1760	Nguyen Duc T.	33
84.	2.0	C1761	Pham Van K.	31
85.	2.0	C1762	Tran Ngoc H.	31
86.	2.0	C1763	Vu Trong C.	30
87.	2.0	C1764	Vu Trung Tr.	35
88.	2.0	C1765	Bui Van C.	31
89.	2.0	C1766	Nguyen Van Q.	37
90.	2.0	C1767	Le Van M.	35
91.	2.0	C1768	Pham Van T.	26
92.	2.0	C1769	Nguyen Huy Ch.	36
93.	2.0	C1770	Dang Dinh C.	31
94.	2.0	C1771	Ha Anh D.	30

95.	2.0	C1772	Nguyen Van H.	25
96.	2.0	C1773	Nguyen Trong M.	35
97.	2.0	C1774	Duong Toan Th.	28
98.	2.0	C1775	Nguyen Huu T.	30
99.	2.0	C1776	Nguyen Xuan D.	30
100.	2.0	C1777	Ngo Thanh T.	33
101.	2.0	C1778	Do Hong K.	29
102.	2.0	C1779	Tran Van Th.	33
103.	2.0	C1780	Tran Dinh H.	33
104.	2.0	C1781	Nguyen Van T.	25
105.	2.0	C1782	Nguyen Hong D.	36
106.	2.0	C1783	Pham Van L.	32
107.	2.0	C1784	Nguyen Dinh N.	30
108.	2.0	C1785	Nguyen Duc Th.	27
109.	2.0	C1786	Hoang Minh Th.	30
110.	2.0	C1787	Le Tien D.	38
111.	2.0	C1788	Dao Cong Th.	37
112.	2.0	C1789	Nguyen Van Th.	31
113.	2.0	C1790	Nguyen Van N.	26
114.	2.0	C1791	Bui Thai H.	32
115.	2.0	C1792	Trinh The D.	38
116.	2.0	C1793	Nguyen Van S.	31
117.	2.0	C1794	Vu Tien Th.	28
118.	2.0	C1795	Pham Tien B.	28
119.	2.0	C1796	Truong Van M.	25
120.	2.0	C1797	Vu Van H.	33
121.	2.0	C1798	Cao Ba Q.	30
122.	2.0	C1799	Nguyen Van C.	39
123.	2.0	C1800	Nguyen Van L.	31
124.	2.0	C1801	Nguyen Huu T.	43
125.	2.0	C1802	Cao Tien H.	34
126.	2.0	C1803	Vo Minh C.	31

127.	2.0	C1804	Pham Van T.	27
128.	2.0	C1805	Le The A.	36
129.	2.0	C1806	Pham Nang Ch.	34
130.	2.0	C1807	Nguyen Van H.	41
131.	2.0	C1808	Duong Danh H.	28
132.	2.0	C1809	Duong Cong Q.	31
133.	2.0	C1810	Than Van M.	34
134.	2.0	C1811	Dinh Dinh Th.	35
135.	2.0	C1812	Tran Van Th.	33
136.	2.0	C1813	Doan Manh Tr.	28
137.	2.0	C1814	Ho Anh T.	33
138.	2.0	C1815	Nguyen Viet Th.	25
139.	2.0	C1816	Vu Van L.	29
140.	2.0	C1817	Truong Ngoc H.	29
141.	2.0	C1818	Nguyen Van L.	29
142.	2.0	C1819	Nguyen Tuan A.	32
143.	2.0	C1820	Nguyen Van H.	26
144.	2.0	C1821	Nguyen Ba Th.	28
145.	2.0	C1822	Nguyen Duy D.	42
146.	2.0	C1823	Do Van H.	33
147.	2.0	C1824	Trinh Tien H.	30
148.	2.0	C1825	Tran Quyet Th.	35
149.	2.0	C1826	Le Hong Q.	35
150.	2.0	C1827	Nguyen Xuan D.	29
151.	2.0	O1802	Bui Van D	31
152.	2.0	X1812	Nguyen Van Kh.	30
153.	2.0	X1810	Phan Kim B.	33
154.	2.0	X1821	Ngo Van H.	38
155.	2.0	X1822	Nguyen Ngoc T.	33
156.	2.0	X1827	Nguyen Dinh Ng.	30
157.	2.0	X1828	Nguyen Van Th.	27
158.	2.0	X1830	Phan Thanh S.	26

159.	2.0	X1837	Vu Quang H.	33
160.	2.0	X1844	Nguyen Duc Ch.	30
161.	2.0	X1849	Mai Van H.	31
162.	2.0	X1850	Vu Xuan H.	25
163.	2.0	X1856	Nguyen Ba S.	33
164.	2.0	X1857	Ha Son B.	33
165.	2.0	X1858	Nguyen Duc T.	35
166.	2.0	X1863	Nguyen Manh Ng.	29
167.	2.0	X1868	Nguyen Quang B.	29
168.	2.0	X1869	Luong Thanh T.	29
169.	2.0	X1854	Nguyen Ngoc H.	28
170.	2.0	X1871	Trinh Dinh H.	25

*(Mã bệnh chứng (BC): 1- bệnh nhân azoospermia; 2- nam giới nhóm chứng;  
3- bệnh nhân oligospermia)*

**Xác nhận của thầy hướng dẫn    Xác nhận Trung tâm Tư vấn Di truyền**

BỆNH VIỆN ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI  
TRUNG TÂM TƯ VẤN DI TRUYỀN

**BỆNH ÁN**

Ngày tháng năm 2018

**1. Chồng:** Họ tên: Địa chỉ:  
 Tuổi: N. nghiệp: Năm kết hôn: ĐT:  
 Bị thương ở bộ phận sinh dục: Bị bệnh:  
 Thuốc lá: điều/ngày: Thuốc lào: điều/ngày:  
 Bia: cốc/lần: lần/tuần: Rượu: chén/lần: lần/tuần:  
 Máy ngày gần đây có sốt không: Số lần mộng, di tinh /tháng:  
 Lần xuất tinh gần nhất cách mấy ngày: Số lần ăn đậu phụ /tuần:

**2. Vợ:** Họ tên: Tuổi: N. nghiệp:  
 Số lần có thai: Số lần đẻ: Tình trạng con: Sảy:  
 Nạo, hút: Thai lưu: Khác:  
 Chu kỳ kinh bao nhiêu ngày: có đều không: Bị bệnh:

**3. Tiền sử**

Đã từng hỗ trợ sinh sản: Không  Có  Nếu có thì sử dụng phương pháp:  
 Bơm tinh trùng (IUI)  số lần:.....  
 Thành công Không  Có   
 Thụ tinh trong ống nghiệm (IVF)  Số lần .....  
 Thành công Không  Có

	Số anh chị em	Số đã có gia đình	Số bị vô sinh	Tiếp xúc P. xạ, hoá chất (loại gỗ):
Bên chồng				
Bên vợ				

**4. Kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ của chồng:**

Thể tích	pH	Mật độ	Tổng	% sống	Di động %				Vận tốc TT µm/s
					a	b	c	d	

**Hình thái tinh trùng**

BT	Đầu	Cổ	Đuôi	B. tương	TB khác	H.lông	Màu	Nhót	N.tiểu

**5. Kết quả xét nghiệm di truyền khác:**

NST	
mPCR	
CFCR	
Halosperm	

**6. Phả hệ**

Lưu ý: Các xét nghiệm vật chất di truyền bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào hoặc phân tích phân tử có thể không đạt do các tế bào không phát triển trong quá trình nuôi cấy hoặc phân tích, có thể phải thu mẫu lại để xét nghiệm.  
 Bệnh nhân đồng ý (Ký tên và ghi rõ họ tên.....)



BỆNH VIỆN ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI  
TRUNG TÂM TƯ VẤN DI TRUYỀN

## XÉT NGHIỆM TINH DỊCH (Bằng máy CASA)

Bệnh nhân

Năm sinh/Tuổi

Mã bệnh phẩm

Ngày xét nghiệm

Chẩn đoán

### KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM

Thể tích ( $\geq 1,5$ ml)	pH (7,2-8)	Mật độ tinh trùng ( $\geq 15$ triệu/ml)	Tổng số tinh trùng (triệu)	Tỉ lệ sống ( $\geq 58\%$ )	Độ di động của tinh trùng (%)				Tốc độ di động trung bình của tinh trùng ( $\mu\text{m}/\text{giây}$ )
					Tiến tới ( $\geq 32\%$ )		Không tiến tới	Không đi động	
					Tiến tới Nhanh	Tiến tới Chậm			

<i>Hình thái tinh trùng</i>					Tế bào khác ( $\leq 1$ triệu/ml)	Hóa lông	Màu sắc	Độ nhớt
<i>Bình thường</i>	<i>Không bình thường (%)</i>							
( $\geq 15\%$ )	Đầu	Cổ	Đuôi	B.tương				

**Đánh giá khác:**

**Bác sỹ chỉ định**

**Người đọc kết quả**

**Bác sỹ trả lời kết quả**