

ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo WHO, trong vô sinh, nguyên nhân do nữ chiếm 40%, do nam chiếm 40% và do cả vợ và chồng là 20%. Các xét nghiệm (XN) di truyền giúp ta tìm hiểu được những nguyên nhân di truyền của vô sinh. Trong các nam giới vô sinh, có khoảng 10% - 15% trường hợp vô tinh (VT) và 5% thiếu tinh nạng (TTN) có bất thường về di truyền. Ở mức độ phân tử, XN phát hiện các mất đoạn nhỏ nhiễm sắc thể (NST) Y ở vùng AZFabcd là căn cứ quan trọng cho chẩn đoán và chọn hướng can thiệp cho những trường hợp vô sinh nam.

Mục tiêu nghiên cứu:

1. Xác định tỷ lệ, phân bố các dạng bất thường nhiễm sắc thể và mất đoạn nhỏ nhiễm sắc thể Y vùng AZFabcd ở nam giới vô tinh và thiếu tinh nạng.

2. Xác định mối liên quan giữa đặc điểm tinh dịch và bất thường di truyền ở nam giới vô tinh và thiếu tinh nạng.

Những đóng góp mới của luận án :

Xác định được tỷ lệ, phân bố các dạng bất thường nhiễm sắc thể và mất đoạn nhỏ NST Y vùng AZFabcd ở nam giới VT và TTN.

Đã hoàn thiện kỹ thuật Multiplex PCR cải tiến, xác định các cặp môi phù hợp để phát hiện mất đoạn AZFabcd trên NST Y đối với những nam giới vô sinh ở Việt Nam.

Xác định được mối liên quan giữa đặc điểm tinh dịch và bất thường di truyền ở nam giới VT và TTN.

Bố cục của luận án :

Luận án gồm 135 trang, 48 bảng, 5 biểu đồ, 6 đồ thị, 3 hình, 3 ảnh và 1 sơ đồ với 207 tài liệu tham khảo gồm 37 tiếng Việt và 170 tiếng Anh. Phần đặt vấn đề: 2 trang; tổng quan 36 trang; đối tượng và phương pháp nghiên cứu 15 trang; kết quả nghiên cứu 35 trang; bàn luận 44 trang; kết luận 2 trang và kiến nghị 1 trang; 3 phụ lục.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Tình hình nghiên cứu vô sinh, vô sinh nam trên thế giới và Việt Nam

1.1.1. Một số khái niệm về vô sinh và vô sinh nam giới

Theo WHO, vô sinh là tình trạng một cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh đẻ, có quan hệ tình dục, không dùng biện pháp tránh thai nhưng không thể có thai sau 12 tháng. Với vô sinh nam giới: VT là tình trạng không có tinh trùng trong tinh dịch. Thiếu tinh (TT) là tình trạng số

lượng tinh trùng $< 15 \times 10^6$ tinh trùng/ml tinh dịch. TTN là những bệnh nhân có số lượng tinh trùng $\leq 5 \times 10^6$ tinh trùng/ml tinh dịch.

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

Ở Hoa Kỳ, tỷ lệ vô sinh khoảng 10%. Ở Châu Âu, vô sinh nam là 20%. Ở Pháp, tỷ lệ vô sinh là 13,5%. Theo Stewart Irvine (2002), vô sinh chiếm 14%-17%. Krauz và cs cho rằng nguyên nhân gây vô sinh do nam khoảng 50%, trong đó, khoảng 40% - 50% có bất thường về số lượng và chất lượng tinh trùng.

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

Theo Nguyễn Khắc Liêu tỷ lệ vô sinh nữ 54,5%, vô sinh nam 35,6%, không rõ nguyên nhân (KRNN) là 10%. Theo Trần Thị Trung Chiến (2002) tỷ lệ vô sinh là 5%, trong đó vô sinh nam 40,8%. Theo Nguyễn Viêt Tiên, tỷ lệ vô sinh ở VN là 7,7%. Trong đó, do nam là 25 - 40%, do nữ 40 - 55%, còn lại do cả hai vợ chồng và KRNN.

1.2. Nguyên nhân vô sinh nam

1.2.1. Phân loại nguyên nhân vô sinh nam giới theo WHO

Các nguyên nhân vô sinh nam đều dẫn đến hậu quả là VT, TT mức độ nhẹ hoặc nặng, bất thường về hình thái tinh trùng... Các nhóm nguyên nhân vô sinh nam (Theo WHO, 1999) gồm: Rối loạn về tinh dục và phóng tinh; Miễn dịch; Bất thường tinh dịch; Bệnh lý toàn thân; Dị tật bẩm sinh; Tổn thương tinh hoàn; Giãn tĩnh mạch tinh (GTMT); Tinh trùng ít; VT do tác nghẽn; VT không rõ nguyên nhân; Nội tiết...

1.2.2. Nguyên nhân do rối loạn di truyền

1.2.2.1. Các bất thường NST thường gặp trong vô sinh nam

*** Bất thường số lượng NST giới tính**

Hội chứng Klinefelter: Theo Simpson, hội chứng Klinefelter thường là VT. Nghiên cứu của Krausz và Forti (2000) cho thấy một số ít bệnh nhân Klinefelter thể khảm vẫn có thể có tinh trùng nhưng TTN, muốn có con họ cần hỗ trợ sinh sản. Một số trường hợp có thể lấy tinh trùng từ tinh hoàn để làm kỹ thuật bơm tinh trùng vào bào tương (ICSI).

Nam có bộ NST 48,XXYY: Bệnh nhân có biểu hiện gần giống hội chứng Klinefelter, nhưng các triệu chứng về hành vi tâm thần thường nặng hơn người mắc hội chứng Klinefelter.

Nam có bộ NST 47,XYY: người bệnh thường cao, VT hoặc TTN. Theo Speed (1989), khả năng sinh sản của những người 47,XYY khác nhau đáng kể, từ số lượng tinh trùng bình thường đến VT.

*** Bất thường số lượng NST thường**

Bất thường số lượng NST thường hay gặp nhất là hội chứng Down, nam giới mắc Down thường VT hoặc TT.

*** Bất thường cấu trúc NST giới tính**

Bất thường cấu trúc NST giới gặp chủ yếu là chuyển đoạn. Chuyển đoạn sẽ có ảnh hưởng trực tiếp đến những gen biệt hóa tế bào mầm.

*** Bất thường cấu trúc NST thường**

Các bất thường về cấu trúc NST thường chiếm tỷ lệ 1 - 2% các trường hợp vô sinh nam. Chuyển đoạn, đảo đoạn tạo NST cấu trúc lại gây trở ngại cho sự bắt cặp NST trong quá trình giảm phân và ảnh hưởng đến quá trình sinh tinh là nguyên nhân gây vô sinh ở nam giới.

*** Các bất thường NST khác**

Nam có bộ NST 46,XX (Male 46,XX): Hầu hết bệnh nhân có cơ quan sinh dục ngoài giống nam bình thường, 10% - 15% có mơ hồ giới tính, tinh hoàn chưa xuống bìu, lỗ đái lệch thấp thường VT.

Nam 45,X hoặc 45,X/46,XY; 45,X/47,XYY: Hầu hết bệnh nhân có chuyển đoạn gen SRY với một NST thường hoặc NST X. Bệnh nhân có hình thái nam hoặc mơ hồ giới tính.

NST marker: sự xuất hiện NST bất thường cấu trúc này có thể dẫn tới giảm sinh sản ở nam giới do kìm hãm sự trưởng thành tinh trùng.

1.2.2.2. Các rối loạn di truyền ở mức độ phân tử trong vô sinh nam

Có khoảng 2000 gen liên quan đến sự sinh tinh, phần lớn chúng ở trên NST thường và khoảng 30 gen có mặt trên NST Y. Trong đó, mất đoạn nhỏ trên NST Y có liên quan nhiều đến sự sinh tinh.

*** Mất đoạn nhỏ trên NST Y:**

Mất đoạn AZFa, AZFb dẫn đến VT. Mất đoạn AZFc có thể gây VT hoặc TT. Mất đoạn AZFd có tỷ lệ cao hơn so với AZF khác, thường gây VT hoặc TTN và có bất thường hình thái tinh trùng.

*** Tình hình nghiên cứu mất đoạn nhỏ NST Y ở thế giới và Việt Nam:**

Năm 1996, Vogt và cs đã phát hiện 3 vùng mất đoạn ở vị trí Yq11 liên quan đến vô sinh nam giới được đặt tên là AZF gồm: AZFa, AZFb và AZFc. Những nghiên cứu gần đây cho thấy 10 - 15% nam giới VT và khoảng 5 - 10% TTN có đột biến mất đoạn Yq11.

Ở Việt Nam, Phan Thị Hoan, Nguyễn Đức Nhự, Đỗ Thị Minh Phương, Nguyễn Thị Thục Anh, Trần Văn Khoa cũng đã có các nghiên cứu mất đoạn nhỏ trên NST Y. Tuy nhiên, các nghiên cứu sử dụng ít cặp môi, với ít bệnh nhân và chưa nghiên cứu mất đoạn ở cả 4 vùng AZFabcd.

1.2.3. Các nguyên nhân không do di truyền gây vô sinh nam

- Một số bất thường cơ quan sinh dục ở bệnh nhân vô sinh nam

Các bất thường cơ quan sinh dục hay gặp ở nam là: GTMT, tinh hoàn không xuống bìu, lạc chỗ, tật không tinh hoàn, viêm, chấn thương,

ung thư tinh hoàn và các bất thường khác như: Lỗ đái thấp, hội chứng chỉ có tế bào Sertoli, vô sinh do rối loạn trương lực cơ, bất thường hormone sinh dục, vô sinh do tắc đường sinh dục và nguyên nhân miễn dịch.

- Các yếu tố ảnh hưởng tới chất lượng tinh dịch gây vô sinh nam

Các yếu tố ảnh hưởng tới tinh dịch hay gặp là: nhiệt độ cao ức chế sản xuất tinh trùng, tiếng ồn cường độ cao, tia xạ, đặc biệt sóng ngắn, các kim loại như chì, asen, cadmium, hoá chất như dibromochloropropan có thể làm giảm chất lượng tinh trùng.

Ngoài ra, tuổi cao, tình trạng sức khỏe và lối sống không tốt như: dùng nhiều thuốc lá, rượu, ma túy gây suy giảm hormone sinh dục và giảm chất lượng tinh trùng.

1.3. Thăm khám và xét nghiệm chẩn đoán đối với nam giới vô sinh

Để chẩn đoán đúng tình trạng vô sinh nam cần thực hiện:

- Khai thác tiền sử, khám thực thể để xác định các bất thường về tinh hoàn, dương vật, phát hiện viêm nhiễm cơ quan sinh dục, GTMT...

- XN tinh dịch để đánh giá một số chỉ số như: Độ di động của tinh trùng; Các loại tốc độ di chuyển của tinh trùng; Các dạng di chuyển của tinh trùng; Tính chất di chuyển của tinh trùng.

- Thực hiện các XN khác như hormone sinh dục, XN xác định các bệnh lý liên quan.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Những nam giới vô sinh đã XN tinh dịch đồ thấy VT hoặc TTN tại Bộ môn Y sinh học - Di truyền, Đại học Y Hà Nội, từ 1/2012 đến 6/2014.

- Nhóm nghiên cứu: các nam giới trong độ tuổi sinh sản có mật độ tinh trùng ≤ 5 triệu tinh trùng/ml tinh dịch.

- Nhóm chứng: các nam giới trong độ tuổi sinh sản, đã có con.

2.1.1. Số bệnh nhân và cỡ mẫu

Cỡ mẫu được xác định theo công thức:

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

Trong đó: n là cỡ mẫu cần NC. $Z_{1-\alpha/2}$ là độ tin cậy 95% với $\alpha=0,05$ thì $Z_{1-\alpha/2}=1,96$. p: Tỷ lệ bất thường NST và mất đoạn AZFabcd ở bệnh nhân vô sinh dựa trên các nghiên cứu trước (lấy $p = 0,12$). ε là khoảng cách sai lệch mong muốn được tính = 30% của $p = 0,3$. Thay các giá trị vào được $n = 313$.

Thực tế chúng tôi XN tinh dịch đồ cho **553** nam giới (101 ở nhóm chúng và 452 vô sinh); thăm khám lâm sàng cho **484** (91 ở nhóm chúng và 393 vô sinh). Có **469** nam giới vừa được XN tinh dịch đồ, XN NST và phân tích ADN. Trong đó có 354 người VT và 115 TTN.

2.1.2. Tiêu chuẩn chọn đối tượng nghiên cứu

Những nam giới VT hoặc TTN không thuộc nhóm tác nghẽn như (viêm nhiễm, thất ồng dẫn tinh, dị dạng ống dẫn tinh...).

2.1.3. Tiêu chuẩn loại trừ

Tinh trùng > 5 triệu/ml; Vô sinh thuộc nhóm tác nghẽn; Người đang có bệnh cấp tính, bị tâm thần...; Người không hợp tác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu dịch tễ học cắt ngang mô tả.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

- **Điều tra tiền sử liên quan đến vô sinh:** khai thác thông tin về tiền sử bệnh tật, tiếp xúc với tác nhân liên quan đến vô sinh.

- **Thăm khám lâm sàng:** Đo thể tích tinh hoàn bằng chuỗi hạt Prader, xác định mật độ của tinh hoàn, phát hiện các bất thường sinh dục ngoài.

- Xét nghiệm tinh dịch:

Nhóm chúng và nhóm TTN: Đo thể tích, pH, độ nhớt, độ di động, cách di động; Hình thái, tỷ lệ sống của tinh trùng.

Nhóm vô tinh: đo thể tích, pH, độ nhớt.

- **Phân tích NST cho các bệnh nhân VT và TTN:** Nuôi cấy bạch cầu lympho máu ngoại vi theo phương pháp của Hungerford, nhuộm băng G, phân tích NST và lập karyotyp theo tiêu chuẩn ISCN (2005).

- Phát hiện mất đoạn AZFabcd trên NST Y

Thực hiện 3 phản ứng multiplex PCR với 10 cặp mồi. Trong đó, 8 cặp mồi để xác định mất đoạn AZFabcd và 2 cặp mồi làm chứng nội tại là ZFY và SRY. Các cặp mồi đặc hiệu AZFa là: sY84-sY86; AZFb: sY127-sY134; AZFc: sY254-sY255; AZFd: sY152-BPY2.

2.3. Xử lý số liệu

Các số liệu thu thập sẽ được xử lý theo chương trình Excel 2013 và phần mềm SPSS 16.0.

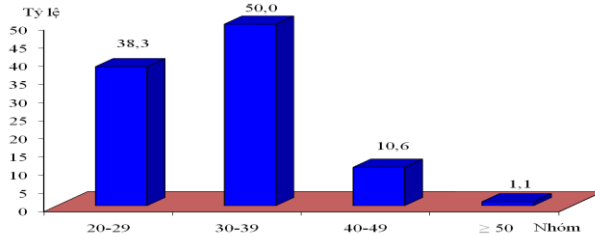
Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm về tuổi, tiền sử, lâm sàng, tinh dịch ở nam giới vô sinh

3.1.1. Phân bố tuổi ở nam giới vô sinh

452 nam giới vô sinh có tuổi thấp nhất là 20 và cao nhất là 55, tuổi trung bình là $31,98 \pm 5,71$. Phân bố theo từng nhóm tuổi như sau:



Biểu đồ 3.1. Phân bố đặc điểm tuổi ở người nam vô sinh

Ở nhóm tuổi 30- 39 chiếm tỷ lệ cao nhất là 50%. Nhóm tuổi từ 20-29 là 38,3%, nhóm tuổi trên 50 chiếm tỷ lệ ít nhất là 1,1%.

3.1.2. Tiền sử của nam giới vô sinh

Bảng 3.1. Tiền sử bản thân của nam giới vô sinh

Tiền sử	n	Tỷ lệ %
Viêm tinh hoàn, quai bị	21	3,76
GTMT	15	2,43
Bệnh lý khác	13	2,65
Tiếp xúc hóa chất	3	0,66
Không có tiền sử	501	90,49
Tổng	553	100

Tiền sử viêm tinh hoàn, quai bị chiếm tỷ lệ cao nhất (3,76%), bệnh lý khác (2,65%), GTMT (2,43%), tiếp xúc hóa chất chiếm tỷ lệ ít nhất (0,66%). Nam giới không tiền sử bệnh lý (90,49%).

3.1.3. Đặc điểm cơ quan sinh dục ngoài ở nam giới vô sinh

Bảng 3.2. Thể tích trung bình tinh hoàn ở nhóm chứng và nhóm nghiên cứu

Nhóm	V _{TB} tinh hoàn	Số lượng (n = 484)	$\bar{x} \pm SD$	P
Nhóm chứng		91	19,03 ± 3,83	> 0,05
Nhóm nghiên cứu (NC)		393	18,29 ± 5,48	

Thể tích trung bình tinh hoàn ở nhóm chứng là 19,03 ± 3,83 lớn hơn so với ở nhóm vô sinh là 18,29 ± 5,48. Sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với p > 0,05. Loại thể tích tinh hoàn ≤ 5 ml chỉ thấy ở nhóm NC mà không thấy ở nhóm chứng.

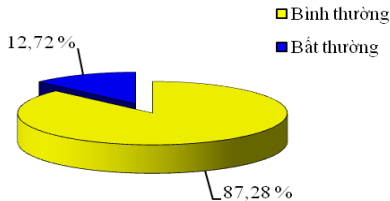
Bảng 3.3. Phân bố bệnh nhân theo mật độ tinh hoàn

Mật độ tinh hoàn	Nhóm chứng		Nhóm NC		Chung		p
	n	%	n	%	n	%	
Chắc	87	95,6	345	87,8	432	89,3	< 0,05
Mềm	4	4,4	48	12,2	52	10,7	
Tổng	91	100	393	100	484	100	

Mật độ tinh hoàn chắc ở nhóm chứng có tỷ lệ cao hơn ở nhóm vô sinh, ngược lại mật độ tinh hoàn mềm gặp nhiều hơn ở nhóm bệnh nhân VT và TTN, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, với $p < 0,05$.

Mật độ tinh hoàn theo nhóm tuổi:

- Ở nhóm chứng, mật độ tinh hoàn ở các độ tuổi khác nhau không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.
- Ở nhóm NC, tỷ lệ có mật độ chắc ở nhóm tuổi 20-29 và ≥ 50 thấp hơn ở các nhóm 30-39 và 40-49. Ngược lại, tỷ lệ tinh hoàn mềm ở nhóm tuổi 30-39 và 40-49 lại thấp hơn ở nhóm 20-29 và trên 50 tuổi. Tuy nhiên, sự khác nhau này chưa có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.



Biểu đồ 3.2. Tỷ lệ bất thường cơ quan sinh dục ngoài ở nam giới vô sinh

Trong số 393 nam giới ở nhóm vô sinh, không có bất thường cơ quan sinh dục ngoài chiếm tỷ lệ 87,28%. Có bất thường cơ quan sinh dục ngoài là 12,72%.

Bảng 3.4. Bất thường cơ quan sinh dục ngoài ở nam giới vô sinh

Biểu hiện lâm sàng cơ quan SD ngoài	Tổng (n=50)	Tỷ lệ %
Suy sinh dục (dương vật và tinh hoàn nhỏ)	12	24
Viêm, đau tức tinh hoàn	8	16
Thoát vị bẹn	5	10
Ẩn tinh hoàn, lạc chỗ	4	8,0
Lỗ đài lệch thấp	5	10
Giãn tĩnh mạch tinh	8	16
Teo tinh hoàn một hoặc 2 bên	4	8,0
Bất thường khác (Tinh hoàn 1 bên quá to)	4	8,0
Tổng số	50	100

Nam giới suy sinh dục có tỷ lệ cao nhất là 24%. GTMT và viêm tinh hoàn đều chiếm 16%. Thoát vị bẹn, lỗ đài lệch thấp đều chiếm 10%, teo tinh hoàn, tinh hoàn ẩn và bất thường khác đều là 8%.

3.1.4. Đặc điểm tinh dịch của nhóm nghiên cứu và nhóm chứng

Bảng 3.5. So sánh thể tích tinh dịch của nhóm NC và nhóm chứng

Nhóm \ Thể tích	$\geq 1,5$ ml		$< 1,5$ ml		OR (95% CI)	p
	n	%	n	%		
Nghiên cứu (n=452)	306	67,7	146	32,3	0,8 (0,5-1,29)	$> 0,05$
Chứng (n=101)	73	72,3	28	27,7		
Chung (n=553)	379	68,5	174	31,5		

Tinh dịch có thể tích $\geq 1,5$ ml chiếm tỷ lệ là 67,7%, thấp hơn ở nhóm nghiên cứu là 72,3%, tuy nhiên sự khác biệt, với $p > 0,05$.

Bảng 3.6. So sánh độ pH tinh dịch của nhóm NC và nhóm chứng

Nhóm \ pH	$\geq 7,5$		$< 7,5$		p
	n	%	n	%	
Nghiên cứu (n=452)	448	99,1	4	0,9	$> 0,05$
Chứng (n=101)	101	100	0	0	
Chung (n=553)	549	99,3	4	0,7	

pH tinh dịch $\geq 7,5$ ở nhóm nghiên cứu là 99,1% và nhóm chứng là 100%. Số mẫu có pH tinh dịch $< 7,5$ rất ít và chỉ có ở nhóm vô sinh.

Ở cả nhóm chứng và nhóm NC, độ nhớt tinh dịch không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3.8. Chất lượng tinh trùng của nhóm chứng và nhóm TT/TTN

Chất lượng tinh trùng \ Nhóm	TT/TTN (n=112)		Chứng (n=101)		p	
	n	%	n	%		
TT di động nhanh	$\geq 25\%$	6	7,4	75	92,6	$< 0,001$
	$< 25\%$	106	80,3	26	19,7	
Hình thái bình thường	$\geq 30\%$	1	3,1	31	96,9	$< 0,001$
	$< 30\%$	111	61,3	70	38,7	
Tinh trùng sống	$\geq 75\%$	44	32,1	93	67,9	$< 0,001$
	$< 75\%$	68	89,5	8	10,5	

Tinh trùng di động nhanh ($\geq 25\%$), hình thái tinh trùng bình thường ($\geq 30\%$) và tỷ lệ tinh trùng sống ($\geq 75\%$) ở nhóm TT/TTN đều thấp hơn so với nhóm chứng với $p < 0,001$.

Bảng 3.9. Tỷ lệ % các tốc độ di chuyển của tinh trùng ở nhóm chứng và nhóm TT/TTN

Nhóm \ $V_{\text{tinh trùng}}$	≤ 30 ($\mu\text{m/s}$)	$> 30-40$ ($\mu\text{m/s}$)	$> 40-50$ ($\mu\text{m/s}$)	> 50 ($\mu\text{m/s}$)	p
Chứng	13,86	37,63	31,68	16,83	
TT/TTN	77,68	16,96	3,57	1,79	
Tổng	47,42	26,76	16,9	8,92	

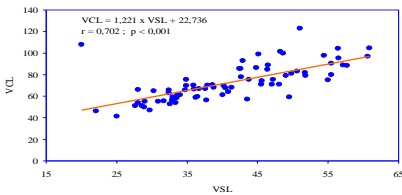
Kết quả ở bảng trên cho thấy: tốc độ di chuyển của tinh trùng ở nhóm chứng cao hơn rõ rệt so với nhóm TT/TTN, với $p < 0,001$.

Bảng 3.10. Các dạng tốc độ di chuyển của tinh trùng ở nhóm chứng và nhóm TT/TTN

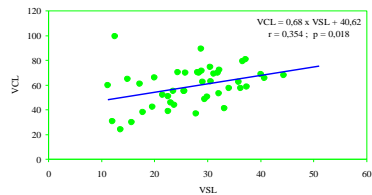
Dạng	Nhóm	Chứng (n=101)	TT/TTN (n=112)	p
		$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
VSL		40,36 ± 9,50	26,10 ± 8,71	< 0,001
VCL		72,73 ± 16,90	58,95 ± 15,76	< 0,001
VAP		50,19 ± 11,26	38,61 ± 12,63	< 0,001

Kết quả ở bảng 3.10 cho thấy: Tốc độ tuyến tính (VSL), tốc độ đường cong (VCL), tốc độ theo con đường trung vị (VAP) của nhóm chứng đều cao hơn rõ rệt so với nhóm TT/TTN, $p < 0,001$.

3.1.5. Tương quan tuyến tính giữa các dạng tốc độ di chuyển của tinh trùng

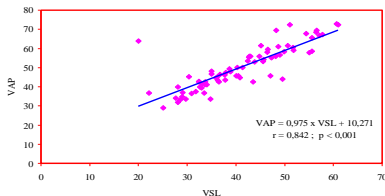


Đồ thị 3.1. Tương quan tuyến tính giữa VSL và VCL nhóm chứng

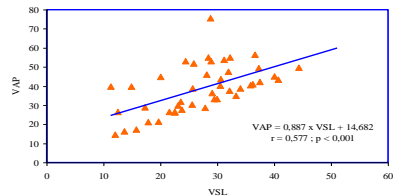


Đồ thị 3.2. Tương quan tuyến tính giữa VSL và VCL nhóm TT/TTN

Kết quả ở đồ thị 3.1 và 3.2 cho thấy: VSL và VCL có tương quan tuyến tính thuận và rất chặt, có ý nghĩa với nhóm chứng $r = 0,702$ và $p < 0,001$, nhóm TT/TTN có $r = 0,68$ và $p < 0,001$.

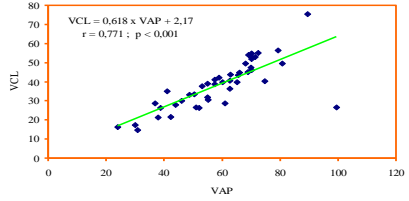
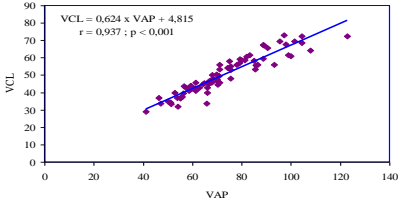


Đồ thị 3.3. Tương quan tuyến tính giữa VSL và VAP nhóm chứng



Đồ thị 3.4. Tương quan tuyến tính giữa VSL và VAP nhóm TT/TTN

Kết quả ở đồ thị 3.3 và 3.4 cho thấy: VSL và VAP có tương quan tuyến tính thuận và rất chặt, có ý nghĩa với nhóm chứng $r = 0,842$ và $p < 0,001$, nhóm TT/TTN có $r = 0,577$ và $p < 0,001$.



Đồ thị 3.5. Tương quan tuyến tính VCL và VAP nhóm chứng

Đồ thị 3.6. Tương quan tuyến tính giữa VCL và VAP nhóm TT/TTN

Kết quả ở đồ thị 3.5 và 3.6 cho thấy: VCL và VAP có tương quan tuyến tính thuận và rất chặt, có ý nghĩa với nhóm chứng $r = 0,937$ và $p < 0,001$, nhóm TT/TTN có $r = 0,771$ và $p < 0,001$.

Bảng 3.11. Tính chất di chuyển của tinh trùng ở nhóm chứng và nhóm TT/TTN

Tính chất \ Nhóm	Chứng (n=101)	TT/TTN (n=112)	p
LIN $\bar{x} \pm SD$ (%)	57,70 \pm 5,97	56,93 \pm 11,23	> 0,05
STR $\bar{x} \pm SD$ (%)	81,07 \pm 4,68	83,80 \pm 7,93	> 0,05
WOB $\bar{x} \pm SD$ (%)	69,28 \pm 5,23	65,43 \pm 10,97	> 0,05

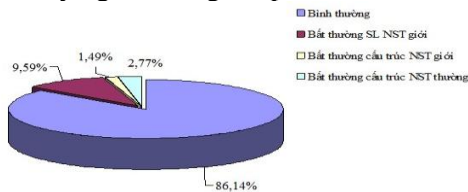
Tính tuyến tính (LIN), tính tiến thẳng (STR), tính dao động (WOB) ở nhóm chứng và ở nhóm TT/TTN chưa có sự khác biệt, với $p > 0,05$.

3.2. Phân tích NST ở bệnh nhân VT và TTN

Bảng 3.12. Tỷ lệ karyotyp của những bệnh nhân VT và TTN

Karyotyp	Nhóm VT		Nhóm TTN		p
	n	%	n	%	
Bình thường	295	83,3	109	94,8	< 0,01
Bất thường	59	16,7	6	5,2	
Tổng	354	75,5	115	24,5	

Trong số 469 nam giới, có 13,9% người VT, TTN có bất thường NST. Bất thường NST ở nhóm VT là 16,7% cao hơn ở nhóm TTN là 5,2%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p < 0,01$.



Biểu đồ 3.3. Phân bố karyotyp ở bệnh nhân nam vô sinh

Bất thường về số lượng NST giới tính chiếm tỷ lệ 9,59%, bất thường cấu trúc NST thường 2,77%, bất thường về cấu trúc NST giới 1,49%, không có bất thường số lượng NST thường.

Bảng 3.13. Phân bố karyotyp bất thường ở bệnh nhân VT và TTN

Kiểu bất thường		Karyotyp	Số lượng		
			VT	TTN	Tổng
Bất thường số lượng NST	NST giới tính	47,XXY	39	0	39
		47,XY,+i(Xq)	1	0	1
		47,XXX	1	1	2
		46,XX	2	0	2
		45,X	1	0	1
	NST thường		0	0	0
Bất thường cấu trúc NST	NST thường	46,XY,1qh+(q11q12)	1	1	2
		46,XY,inv(9)(p13;q13)	1	0	1
		46,XY,inv(9)(p11;q13)	1	1	2
		46,XY,inv(9)(p21;q21)	1	0	1
		46,XY,inv(9)	2	0	2
		46,XY(99%)/46,XY,inv(7)(p12;q32)(1%)	0	1	1
		46,XY,t(13q14q)	0	1	1
		46,XY,t(12q13q)	1	0	1
		46,XY,t(20p22p)	0	1	1
		46,XY,ins(2;3)(p11;q11.2q27)	1	0	1
	NST giới tính	46,XY,delY(80%)/45,X(20%)	1	0	1
		46,Y,t(X;2)(p22.3p13)	1	0	1
		46,X,del(Yq)	5	0	5
	Tổng số			59	6

Với bất thường số lượng NST giới tính, hội chứng Klinefelter tất cả đều là thể thuần và đều VT có tỷ lệ cao nhất (60%). Bất thường cấu trúc NST gặp: chuyển đoạn, lặp đoạn, đảo đoạn và mất đoạn. Chuyển đoạn NST chủ yếu là NST số 9 (9,23%) có ở cả nam VT và TTN. Mất đoạn nhánh dài NST Y chiếm tỷ lệ 7,7%. Chuyển đoạn NST có ở cả VT và TTN.

3.3. Kết quả phát hiện mất đoạn AZFabcd trên NST Y

Bảng 3.14. Độ biến mất đoạn nhỏ NST Y ở nhóm nghiên cứu

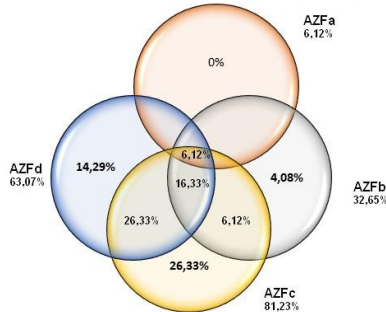
Đặc điểm	Nhóm VT		Nhóm TTN		p
	n	%	n	%	
Bình thường	322	91,0	98	85,2	> 0,05
Mất đoạn	32	9,0	17	14,8	
Tổng	354	75,5	115	24,5	

Ở nam giới VT, TTN tỷ lệ mất đoạn gen NST Y là 10,4%. Trong đó: Mất đoạn xảy ra ở nhóm VT là 9%, ở nhóm TTN là 14,8%. Sự khác biệt giữa nhóm TTN và nhóm VT chưa có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$.

Bảng 3.15. Vị trí mất đoạn gen trên NST Y ở nam giới VT và TTN

Vị trí mất đoạn	Nhóm VT	Nhóm TTN	Tổng	
			n	%
AZFb	2	0	2	4,08
AZFc	5	8	13	26,33
AZFd	2	5	7	14,29
AZFb+c	3	0	3	6,12
AZFc+d	9	4	13	26,33
AZFb+c+d	8	0	8	16,33
AZFa+b+c+d	3	0	3	6,12
Tổng	32	17	49	100

Trong số 49 người bị mất đoạn gen AZFabcd trên NST Y, ở nhóm VT là 65,3%, nhóm TTN (34,7%). Trong đó: mất đoạn AZFc và AZFc+d chiếm tỷ lệ cao nhất: đều là 26,33%, mất AZFb+c+d là 16,33%, AZFd: 14,29%, AZFa+b+c+d và AZFb+c: 6,12%, AZFb: 4,08%.



Biểu đồ 3.4. Sự phân bố các vùng AZFabcd bị mất đoạn

Với mất đoạn đơn thuần: mất AZFc là 26,33%, mất AZFd là 14,29%, mất AZFb là 4,08%. Không thấy mất đoạn AZFa đơn thuần.

Đối với mất đoạn kết hợp: mất đoạn AZFc+d là 26,33%, mất đoạn AZFb+c (6,12%); AZFb+c+d (16,33%); AZFa+b+c+d (6,12%).

Bảng 3.16. Phân bố theo locus gen bị mất ở nam giới mất đoạn AZF

AZF	Vị trí	Số lần gen bị mất (n=49)	Tỷ lệ (%)
AZFa	sY84	4/49	8,16
	sY86	3/49	6,12
AZFb	sY127	15/49	30,61
	sY134	16/49	32,65
AZFc	sY254	41/49	83,67
	sY255	40/49	81,63
AZFd	sY152	32/49	65,31
	BPY2	21/49	42,86

Trong các vị trí gen bị mất, mất gen sY254 và sY255 vùng AZFc chiếm tỷ lệ nhiều nhất là 83,67% và 81,63%; tiếp theo là các gen vùng AZFd: sY152 (65,31%) và BPY2(42,86%); các gen vùng AZFb: sY127 (30,61%), sY134 (32,65%), các gen vùng AZFa chiếm tỷ lệ thấp nhất: sY84 (8,16%) và sY86 (6,12%).

3.4. Liên quan giữa bất thường NST và mất đoạn AZF ở nam giới VT và TTN

Bảng 3.17. Độ biến NST và độ biến gen ở nam giới VT và TTN

Nhóm VT, TTN	VT	TTN	p
Kiểu NST, ADN			
Không đột biến NST, không đột biến gen	271	92	< 0,05
Đột biến NST, không đột biến gen	51	6	
Đột biến NST và đột biến gen	8	0	
Không đột biến NST, đột biến gen	24	17	
Tổng	354	115	

Số lượng nam giới VT nhiều hơn TTN ở tất cả các nhóm đột biến NST, đột biến gen hoặc vừa đột biến NST vừa đột biến gen, với $p < 0,05$. Nhóm vừa đột biến NST và đột biến gen chỉ có ở nhóm VT, không thấy ở nhóm TTN.

Bảng 3.18. Liên quan giữa mất đoạn AZF và bất thường NST

TT	Loại vô sinh	Bất thường NST	Gen trên NST Y
1	VT	46,XX	AZFabcd (-); TDF (+)
2	VT	46,X,del(Yq)	Mất AZFb+c+d
3	VT	46,X,del(Yq)	AZFbcd (-); sY84 (-), sY86(+)
4	VT	46,X,del(Yq)	Mất AZFb+c+d
5	VT	46,X,del(Yq)	Mất AZFa+b+c+d
6	VT	46,XY,delY(80%),45,X(20%)	Mất AZFb+c+d
7	VT	46,X,del(Yq)	Mất AZFb+c
8	VT	45,X	AZFbcd (-); AZFa(+), TDF(+)

Có 8 trường hợp vừa có bất thường NST và mất đoạn AZF. Tất cả đều VT và các bất thường ở đây đều là bất thường ở NST giới tính.

3.5. Mối liên quan giữa đặc điểm tinh dịch và bất thường di truyền

Bảng 3.19. Thử tích tinh dịch của nhóm bất thường di truyền và nhóm chứng

Nhóm	Thử tích		≥ 1,5 ml		< 1,5 ml		OR (95% CI)	p
	n	%	n	%	n	%		
Bất thường di truyền (n=95)	64	67,37	31	32,63	0,79 (0,41-1,53)	> 0,05		
Chứng (n=101)	73	72,3	28	27,7				

Tỷ lệ mẫu tinh dịch thử tích $\geq 1,5$ ml ở nhóm nghiên cứu là 67,37% thấp hơn nhóm chứng là 72,3% nhưng chưa có khác biệt $p > 0,05$.

Bảng 3.20. pH tinh dịch của nhóm bất thường di truyền và nhóm chứng

Nhóm	pH		$\geq 7,5$		< 7,5		p
	n	%	n	%	n	%	
Bất thường di truyền (n=95)	92	96,84	3	3,16	> 0,05		
Chứng (n=101)	101	100	0	0			

pH tinh dịch $\geq 7,5$ ở nhóm nghiên cứu là 96,84% và nhóm chứng là 100%. Số mẫu có pH tinh dịch $< 7,5$ rất ít và chỉ có ở nhóm nghiên cứu (3,16%), không gặp ở nhóm chứng.

Bảng 3.21. Độ nhớt tinh dịch của nhóm bất thường di truyền và nhóm chứng

Nhóm	Độ nhớt		Bình thường		Cao		Giảm		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Bất thường di truyền (n=95)	60	63,16	10	10,52	25	26,32	> 0,05		
Chứng (n=101)	74	73,3	7	6,9	20	19,8			
OR (95% CI)	1,76 (0,56 – 5,78)		1		1,14 (0,32-4,22)				

Ở cả nhóm chứng và nhóm nghiên cứu, độ nhớt tinh dịch ở cả 3 loại bình thường, cao và giảm đều không có sự khác biệt, $p > 0,05$.

Bảng 3.22. So sánh chất lượng tinh trùng của nhóm bất thường di truyền và nhóm chứng

Chất lượng tinh trùng \ Nhóm		Bất thường di truyền (n=95)		Chứng (n=101)		p
		n	%	n	%	
TT di động nhanh	$\geq 25\%$	5	8,3	75	92,6	< 0,001
	$< 25\%$	55	91,7	26	19,7	
Hình thái bình thường	$\geq 30\%$	1	1,7	31	96,9	< 0,001
	$< 30\%$	59	98,3	70	38,7	
Tinh trùng sống	$\geq 75\%$	34	56,7	93	67,9	< 0,001
	$< 75\%$	26	43,3	8	10,5	

Tinh trùng di động nhanh ($\geq 25\%$), hình thái tinh trùng bình thường ($\geq 30\%$) và tỷ lệ tinh trùng sống ($\geq 75\%$) ở nhóm TTN đều thấp hơn so với nhóm chứng với $p < 0,001$.

Bảng 3.23. Tốc độ di chuyển của tinh trùng của nhóm chứng và nhóm bất thường di truyền

Nhóm \ Tốc độ di chuyển ($\mu\text{m/s}$)	≤ 30 (%)	$> 30-40$ (%)	$> 40-50$ (%)	> 50 (%)	p
	Bất thường di truyền (n=95)	78,95	15,79	3,16	
Chứng (n=101)	13,86	37,63	31,68	16,83	

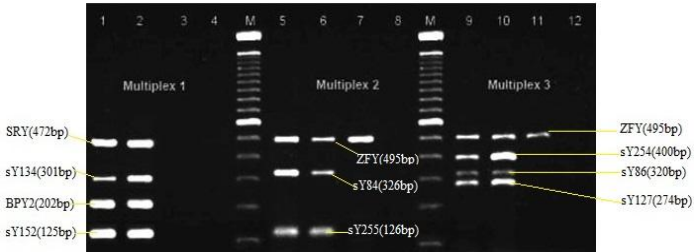
Ở nhóm chứng: Tốc độ di chuyển của tinh trùng từ 30-40 $\mu\text{m/s}$ và 40-45 $\mu\text{m/s}$ chiếm tỷ lệ cao nhất nhanh hơn ở nhóm bất thường di truyền (tốc độ di chuyển của tinh trùng $\leq 30 \mu\text{m/s}$ là 78,95%). Sự khác biệt giữa 2 nhóm này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Bảng 3.24. Liên quan giữa mật độ tinh trùng với bất thường NST và mất đoạn gen

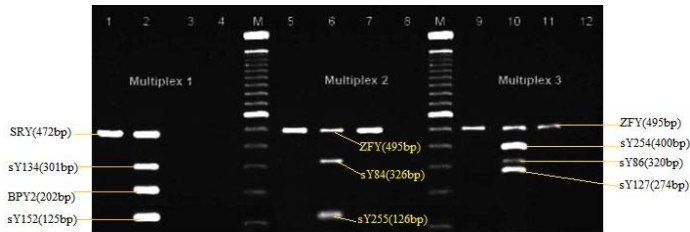
NST, ADN \ Tinh trùng	NST		ADN	
	Bất thường	Bình thường	Bất thường	Bình thường
Vô tinh	59	295	32	322
Thiếu tinh nặng	6	109	17	98
Tổng số	65	404	49	420
OR (95% CI)	3,63 (1,51 - 10,57)		0,57 (0,29 - 1,15)	

Nam giới VT bất thường NST cao gấp 3,63 lần và nguy cơ bất thường ADN bằng 0,57 lần so với người TTN.

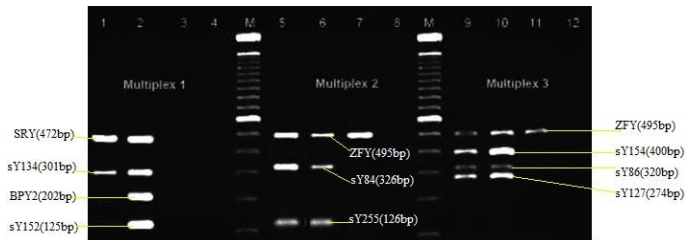
MỘT SỐ HÌNH ẢNH ĐIỆN DI SẢN PHẨM PCR PHÁT HIỆN MẤT ĐOẠN GEN TRÊN NST Y



Ảnh 3.1. Điện di sản phẩm multiplex PCR của người nam bình thường
Ghi chú: M: marker; giếng 1, 5, 9: bệnh nhân; giếng 2, 6, 10: chứng nam; giếng 3, 7, 11: chứng nữ; giếng 4, 8, 12: chứng âm.



Ảnh 3.2. Điện di sản phẩm multiplex PCR của người nam mất đoạn AZFabc
Ghi chú: M: marker; giếng 1, 5, 9: bệnh nhân mất đoạn AZFabc; giếng 2, 6, 10: chứng nam; giếng 3, 7, 11: chứng nữ; giếng 4, 8, 12: chứng âm.



Ảnh 3.3. Điện di sản phẩm multiplex PCR của người nam mất đoạn AZFd
Ghi chú: M: marker; giếng 1, 5, 9: bệnh nhân (mất đoạn AZFd ở vị trí BPY2 và sY152); giếng 2, 6, 10: chứng nam; giếng 3, 7, 11: chứng nữ; giếng 4, 8, 12: chứng âm.

Chương 4: BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm tuổi, tiền sử, lâm sàng, tinh dịch ở nam giới vô sinh

4.1.1. Đặc điểm tuổi ở các đối tượng nghiên cứu

Độ tuổi trung bình của BN vô sinh là $31,98 \pm 5,71$. Độ tuổi này tương tự như nghiên cứu của Comhair (31,1) nhưng thấp hơn của Trần Thị Trung Chiên ($35,74 \pm 6,7$), chúng tôi ngày nay người dân đã chú ý đi khám và chữa bệnh sớm hơn.

4.1.2. Tiền sử bản thân của nam giới vô sinh

Nam giới vô sinh có tiền sử viêm tinh hoàn (chủ yếu là do quai bị) chiếm tỷ lệ cao nhất (3,76%), tiếp theo là GTMT (2,43%), tiếp xúc hóa chất (0,66%). Kết quả này cho thấy, ngày nay việc phòng ngừa bị quai bị, phòng chống hậu quả của quai bị vẫn còn rất cần được chú ý.

4.1.3. Đặc điểm lâm sàng cơ quan sinh dục ngoài ở những nam giới vô sinh

- Về thể tích tinh hoàn

Thể tích trung bình tinh hoàn ở nhóm chúng là $19,03 \pm 3,83$ ml, lớn hơn so với ở nhóm vô sinh nam là $18,29 \pm 5,48$ ml (Bảng 3.2). Tuy sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự của Trần Đức Phần cho thấy thể tích trung bình của tinh hoàn ở nhóm VT và TTN thấp hơn ở nhóm chúng. Thể tích tinh hoàn trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự của Aribarg.

- Về mật độ tinh hoàn

Mật độ tinh hoàn chắc ở nhóm chúng có tỷ lệ cao hơn ở nhóm vô sinh nam, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Kết quả này là phù hợp vì khi tinh hoàn sản xuất tinh trùng nhiều thì mật độ tế bào trong tinh hoàn cao làm cho tinh hoàn chắc. Ngược lại nếu tinh hoàn ít sản xuất tinh trùng, mật độ tế bào trong tinh hoàn ít nên tinh hoàn mềm.

- Biểu hiện lâm sàng cơ quan sinh dục ngoài ở nam giới vô sinh

Kết quả nghiên cứu cho thấy 12,72% nam giới vô sinh có bất thường cơ quan sinh dục ngoài. Ở những người có bất thường cơ quan sinh dục: Người có dương vật và tinh hoàn nhỏ chiếm tỷ lệ cao nhất 24%, tiếp theo là GTMT, viêm tinh hoàn đều có tỷ lệ 16 %, còn lại là các bất thường khác. Các trường hợp biểu hiện suy sinh dục chủ yếu nằm ở nhóm nam giới mắc hội chứng Klinefelter.

4.1.4. Đặc điểm tinh dịch của nam giới VT và TTN

Mặc dù tỷ lệ pH $< 7,5$ rất ít nhưng chúng tôi không gặp trường hợp nào ở nhóm chúng, tất cả những trường hợp pH giảm đều ở nhóm bệnh

và hầu hết là VT. Hiện tượng pH giảm chỉ gặp ở nhóm vô sinh mà hầu hết là ở những người VT cũng đã được Trần Đức Phần đề cập.

Tỷ lệ tinh trùng di động nhanh ($\geq 25\%$), hình thái tinh trùng bình thường ($\geq 30\%$) và tỷ lệ tinh trùng sống ($\geq 75\%$) ở nhóm TTN đều thấp hơn so với nhóm chứng, với $p < 0,001$.

Về tốc độ di chuyển của tinh trùng: kết quả nghiên cứu cho thấy, tốc độ di chuyển của tinh trùng ở nhóm TTN thấp hơn ở chứng, sự khác biệt với $p < 0,001$.

Tốc độ tuyến tính (VSL) của nhóm chứng là $40,36 \pm 9,50 \mu/s$, cao hơn của nhóm vô sinh $21,88 \pm 7,72 \mu/s$ ($p < 0,001$). Với kết quả nghiên cứu của chúng tôi thì tinh trùng được coi là khỏe khi tốc độ di chuyển của tinh trùng phải là $40 \mu/s$ chứ không chỉ là $25 \mu/s$.

Về tương quan tuyến tính giữa các loại tốc độ:

VSL và VCL ở cả nhóm chứng và nhóm vô sinh có tương quan tuyến tính thuận, rất chặt một cách có ý nghĩa. Từ kết quả thu được, xây dựng phương trình của nhóm chứng là $VCL = 1,221 \times VSL + 22,736$ và của nhóm vô sinh là $VCL = 0,68 \times VSL + 40,62$.

VSL và VAP có tương quan tuyến tính thuận rất chặt. Từ kết quả thu được xây dựng phương trình nhóm chứng có $VAP = 0,975 \times VSL + 10,271$ và nhóm TN/TTN có $VAP = 0,887 \times VSL + 14,682$.

VCL và VAP có tương quan tuyến tính thuận và rất chặt. Từ kết quả thu được xây dựng phương trình nhóm chứng có $VCL = 0,624 \times VAP + 4,815$ và nhóm TN/TTN có $VCL = 0,618 \times VAP + 2,17$.

4.2. Về bất thường NST ở nam giới VT và TTN

4.2.1. Về tỷ lệ karyotyp ở nam giới VT và TTN

Kết quả phân tích karyotyp của 469 nam giới VT và TTN chúng tôi thấy bất thường NST, chiếm tỷ lệ 13,9% (Bảng 3.12), trong đó bất thường NST ở nhóm VT là 16,7% và ở nhóm TTN là 5,2%. Kết quả nghiên cứu tương tự như kết quả của Mohamed ở Ấn Độ (13,96%), thấp hơn của Azimi (20,86%), Rima Dada (23,3%) nhưng cao hơn nhiều so với kết quả của Dul (3,1%), Pinar (4,3%), Fernanda (6,2%)...

4.2.2. Các kiểu karyotyp ở nam giới vô sinh

4.2.2.1. Bất thường NST giới tính

Cũng giống như các tác giả khác, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy bất thường NST giới tính gây vô sinh nam nhiều hơn bất thường NST thường với tỷ lệ 11,08% (bất thường NST thường là 2,77%).

Trong số những người có bất thường số lượng NST giới tính, hội chứng Klinefelter chiếm tỷ lệ nhiều nhất (86,67%). Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả 39 nam giới mắc hội chứng Klinefelter thuần 47,XXY đều

nằm ở nhóm VT. Các bệnh nhân mắc hội chứng Klinefelter đều VT cũng là kết quả của rất nhiều tác giả khác (Rima Dada; Cyrus Azimi; Fadlalla Elfateh...). Tuy nhiên nghiên cứu của Trieu Huynh và cs thì karyotyp 47,XXY có tỷ lệ 11% ở nhóm VT và 0,7% ở nhóm TTN.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ thấy những người hội chứng Klinefelter thuần 47,XXY và 1 trường hợp 47,XY,+i(Xq) mà không thấy Klinefelter thể khảm.

Với các bất thường NST giới khác: chúng tôi phát hiện 0,43% nam giới vô sinh có karyotyp 47,XYY. Dingyang Li (2012), Saeedeh Ghazaey (2013) cũng phát hiện karyotyp 47,XYY với tỷ lệ tương ứng là 0,11% và 0,65%. Chúng tôi phát hiện 2 nam giới có karyotyp là 46,XX, chiếm tỷ lệ 0,43%. Một số tác giả khác cũng phát hiện karyotyp này ở nam giới vô sinh với tỷ lệ từ 0,5% đến 0,8%. Chúng tôi phát hiện 5 nam giới VT có karyotyp 46,X,del(Yq), chiếm tỷ lệ 1,06%. Azimi (2012) cũng đã báo cáo 6 trường hợp karyotyp 46,X,del(Yq) và 2 trường hợp khảm del(Yq), chiếm tỷ lệ 0,96%.

Chúng tôi phát hiện 1 nam giới có karyotyp 45,X. Xét nghiệm ADN cho thấy bệnh nhân không có AZFbcd nhưng AZFa (+) và SRY (+). Kết quả này cho thấy đây là một trường hợp có chuyển đoạn gen SRY và gen AZFa của NST Y với một NST khác. Bệnh nhân có gen SRY nên kiểu hình vẫn là nam nhưng không thể có tinh trùng. Do vậy, bệnh nhân không thể được hỗ trợ sinh sản bằng kỹ thuật TESE.

Tỷ lệ bất thường NST giới trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với kết quả của một số tác giả trước, có thể do ngày nay các phương tiện phân tích ngày càng tốt hơn, nên khả năng phát hiện những trường hợp khó cũng tốt hơn. Một số tác giả gần đây cũng thấy, càng ngày càng phát hiện được nhiều trường hợp bất thường cấu trúc NST đặc biệt.

4.2.2.2. Bất thường NST thường

Tỷ lệ bất thường về cấu trúc NST thường là 2,77%, trong đó, phần lớn là đảo đoạn (7/13), còn lại là chuyển đoạn (3/13), lặp đoạn (2/13) và chèn đoạn (1/13). Bất thường cấu trúc NST thường hay gặp nhất là đảo đoạn NST số 9. Nhận xét này cũng đã được Capkova (2004), Phan Thị Hoan (2012) đề cập trong báo cáo của mình.

4.3. Về mất đoạn nhỏ NST Y ở nam giới VT và TTN

4.3.1. Về hoàn chỉnh kỹ thuật multiplex PCR để phát hiện mất đoạn AZF

Chúng tôi sử dụng 10 cặp mồi. Trong đó có 8 cặp mồi như hướng dẫn của Học Viện Nam học Châu Âu và Mạng lưới kiểm tra chất lượng di truyền phân tử Châu Âu (EAA/EMQN), bổ sung thêm 2 cặp mồi

sY152 và BPY2 để xác định thêm locus gen trên NST Y thuộc vùng AZFd.

Thực hiện 3 phản ứng M-PCR thay vì 2 phản ứng multiplex PCR. Mỗi phản ứng multiplex PCR có 3 hoặc 4 cặp mồi để phát hiện mất đoạn AZFabcd và được phân bố đều ở mỗi vùng khác nhau. Tuy số lượng multiplex PCR và số cặp mồi sử dụng có nhiều hơn nhưng lượng hóa chất không tốn kém hơn vì tổng lượng trong một tuýp phản ứng multiplex PCR là 12,5 μ l trong khi hướng dẫn của EAA/EMQN là 50 μ l.

Thời gian điện di 70 phút với hiệu điện thế 100 V thay vì điện di qua đêm với hiệu điện thế 25 V. Sự thay đổi này đã được tiến hành thí nghiệm nhiều lần, cho thấy ổn định và không ảnh hưởng tới kết quả điện di. Điều này phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm tránh phải theo dõi dài qua đêm.

4.3.2. Về mất đoạn nhỏ NST Y

Tỷ lệ phát hiện mất đoạn nhỏ ở vùng AZFabcd trên NST Y ở nam giới vô sinh là 10,4%. Kết quả này tương tự nghiên cứu của Lifu (2012) là 10,8% và cao hơn của Phan Thị Hoan là 6,9%. Tỷ lệ phát hiện mất đoạn AZF của chúng tôi tương đối cao có thể là do chúng tôi đã bổ sung thêm 2 cặp mồi, qua đó đã xác định cả mất đoạn AZFd mà các nghiên cứu trước chưa làm. Kết quả xác định tỷ lệ mất đoạn AZF của một số tác giả được trình bày ở bảng sau:

Bảng 4.1. Tỷ lệ mất đoạn nhỏ vùng AZF trên NST Y trong một số NC

Tác giả (năm)	Nơi NC	Vùng AZF	Số cặp mồi	Tỷ lệ mất đoạn AZF
Tse J.Y.M (2000)	Hồng Kông	AZFabc	6	9%
Martínez (2000)	Tây Ban Nha	AZFabc	9	7%
Akbari A. F. (2003)	Iran	AZFabc	11	5%
Min Jee Kim (2012)	Hàn Quốc	AZFabc	5	8,9%
Ramaswamy S. (2013)	Ấn Độ	AZFabc	15	36%
Omar F Khabour (2014)	Jordan	AZFabc	16	8,3%
Fadlalla Elfateh (2014)	Trung Quốc	AZFabc	10	12,95%
Reza M. (2010)	Ấn Độ	AZFabcd	13	12%
Walid A. (2013)	Syres	AZFabcd	28	28,4%
Phan T. Hoan (2013)	Việt Nam	AZFabc	6	6,9%
Trần V. Khoa (2013)	Việt Nam	AZFabc	6	5,77%
Nghiên cứu này (2014)	Việt Nam	AZFabcd	8	10,4%

Qua bảng trên chúng ta thấy nếu sử dụng càng nhiều cặp mồi thì khả năng phát hiện mất đoạn AZF cũng có vẻ càng tốt.

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, đột biến mất đoạn nhỏ NST Y ở nhóm VT là 9%, nhóm TTN là 14,8%. Một số nghiên cứu khác thấy mất đoạn AZF ở nhóm VT từ 10 - 15%, nhóm TT là 5 - 10%. Sự khác nhau này có thể do chúng tôi dùng thêm các cặp mồi để phát hiện mất đoạn AZFd, mà mất đoạn AZFd lại xảy ra chủ yếu ở những nam giới TTN. Do vậy, tỷ lệ mất đoạn AZF ở nhóm TTN lại cao hơn ở nhóm VT.

4.3.3. Tỷ lệ mất đoạn ở từng vùng AZF và kết hợp

* **Mất đoạn AZFa:** Theo nhiều nghiên cứu, trong các vùng AZF thì tỷ lệ mất đoạn thấp nhất là AZFa và có thể xảy ra mất đoạn AZFa đơn thuần hoặc phối hợp. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi ở trên nam giới VT/TTN khi phân tích với 2 marker sY84 và sY86, không phát hiện thấy trường hợp nào có mất đoạn AZFa đơn thuần. Kết quả này cũng tương tự kết quả nghiên cứu của Phan Thị Hoan không phát hiện mất đoạn AZFa đơn thuần.

* **Mất đoạn AZFb:** Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phát hiện thấy 2 trường hợp mất đoạn AZFb đơn thuần chiếm tỷ lệ 4,08%, 2 bệnh nhân này đều VT. Nghiên cứu của Akbari Asbagh cũng cho thấy bệnh nhân mất đoạn AZFb đơn thuần đều bị VT. Nghiên cứu của Phan Thị Hoan và Trần Văn Khoa đều cho thấy mất đoạn AZFb đơn thuần đều bị VT.

* **Mất đoạn AZFc:** Chúng tôi phát hiện mất đoạn AZFc chiếm tỷ lệ cao nhất là 26,33%, trong đó ở nhóm VT là 10,2%, nhóm TT là 16,33%. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả khác (Zhu; Ramaswamy Suganthi; Ambulkar; Phan Thị Hoan) cho thấy mất đoạn AZFc thường cao nhất và ở nhóm TT cao hơn ở nhóm VT.

* **Mất đoạn AZFd:** Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi thì mất đoạn AZFd đơn thuần chiếm 14,29% các trường hợp bị mất đoạn, trong đó ở nhóm TTN cao hơn ở nhóm VT. Kết quả này cũng giống như của một số tác giả khác như: Kent-First nghiên cứu ở Mỹ, Muslumanoglu nghiên cứu ở Thổ Nhĩ Kỳ, Yao nghiên cứu ở Trung Quốc.

Liên quan đến mất đoạn AZFd, các tác giả đều thấy gặp nhiều ở nam giới TT. Mức độ vô sinh ở những người nam giới mất đoạn AZFd là nhẹ nhất trong 4 loại mất đoạn nhỏ AZF trên NST Y. Tuy nhiên các tác giả đều cho rằng mất đoạn AZFd cần được hỗ trợ sinh sản. Trong nghiên cứu của chúng tôi, người mất đoạn AZFd đơn thuần có số lượng tinh trùng nhiều nhất là 5 triệu/ml tinh dịch. Như vậy, mất đoạn AZFd có mức độ vô sinh nhẹ hơn, phần lớn người mất AZFd là TT và số lượng tinh trùng cũng nhiều hơn ở người mất AZFc.

* **Mất đoạn kết hợp:** Kết quả cho thấy trong mất đoạn AZF thì 16/49 trường hợp ở nhóm TTN (32,65%) và 7/12 trường hợp ở nhóm VT

(58,33%) có liên quan đến AZFb (AZFb, AZFb+c, AZFb+c+d, AZFa+b+c+d) đều là những nam giới VT. Kết quả này phù hợp với Li Fu thấy mất đoạn kết hợp các vùng AZFa+b+c hoặc AZFa+b hoặc mất đoạn không hoàn toàn AZFb chỉ ở nam giới VT. Kết quả còn cho thấy mất đoạn AZFd có liên quan đến mất đoạn ở tất cả các vùng AZFabc. Trong đó: Mất đoạn AZFd kèm theo mất đoạn AZFa+b+c là 6,12%; kèm mất đoạn AZFb+c là 16,33%; kèm mất đoạn AZFc là 26,33%. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Mostafa (2013) thấy mất đoạn AZFd thường đi kèm với mất đoạn AZFc, AZFb hoặc kết hợp cả hai.

Chúng tôi phát hiện mất đoạn AZFc và AZFd đơn thuần có ở xảy ra ở nhóm TTN lại cao hơn nhóm VT. Trong khi mất đoạn AZFc hoặc AZFd kết hợp với mất đoạn vùng AZF khác xảy ra ở chủ yếu ở nhóm nam giới VT. Kết quả này hoàn toàn phù hợp bởi vì mất đoạn liên quan đến AZFa và AZFb thường dẫn đến VT. Mặt khác, mất đoạn càng lớn, ở nhiều vị trí hơn liên quan đến suy giảm sinh tinh trùng càng nặng hơn.

4.3.4. Tỷ lệ các vị trí STS bị mất phát hiện được

Chúng tôi thấy mất đoạn ở vị trí sY254 và sY255 vùng AZFc chiếm tỷ lệ nhiều nhất là 83,67% và 81,63%; tiếp theo lần lượt là các gen vùng AZFd: sY152 là 65,31% và BPY2 là 42,86%; các gen vùng AZFb: sY127 là 30,61%, sY134 là 32,65%, các gen vùng AZFa chiếm tỷ lệ thấp nhất: sY84 là 8,16% và sY86 là 6,12%.

Với kết quả nêu trên và đối chiếu với nghiên cứu của nhiều tác giả, chúng tôi thấy các marker sY254, sY255, sY127, sY134, sY84, sY86, sY152 và BPY2 dễ phát hiện mất đoạn nhỏ NST Y vùng AZFabcd là thích hợp để triển khai và áp dụng đối với bệnh nhân vô sinh nam ở Việt Nam. Đặc biệt, việc bổ sung hai marker sY152 và BPY2 để phát hiện thêm mất đoạn vùng AZFd là cần thiết để phát hiện thêm những vị trí mất đoạn mà nếu chỉ sử dụng các marker theo khuyến cáo của EAA sẽ bỏ sót nhiều trường hợp bị mất đoạn.

4.4. Liên quan giữa bất thường NST và mất đoạn AZF

Kết quả của chúng tôi cho thấy trong bất thường NST thì Hội chứng Klinefelter chiếm 60%. Những người này 100% là ở nhóm VT. Các bất thường NST khác như: 46,XX; 45,X; 46,del(Yq), nam giới cũng bị VT. Chỉ có một số ít các trường hợp đảo đoạn và chuyển đoạn thì có thể VT hoặc TTN.

Về liên quan giữa bất thường NST và mất đoạn gen ở những nam giới vô sinh do VT và TTN: Kết quả nghiên cứu cho thấy: Số lượng nam giới VT đều nhiều hơn nam giới TTN ở tất cả các nhóm đột biến NST, đột biến gen hoặc vừa đột biến NST vừa đột biến gen, với $p < 0,05$.

Với những người hội chứng Klinefelter, trước đây người ta cho rằng Klinefelter thuần không có cơ hội có tinh trùng nên khi XN phát hiện thấy bệnh nhân là Klinefelter thuần thì sẽ không chỉ định làm các XN multiplex PCR để tìm đột biến mất đoạn AZFabcd vì xét nghiệm này là vô nghĩa vì chắc chắn bệnh nhân vẫn không có tinh trùng và không có cơ hội có con. Tuy nhiên, hiện nay người ta đã thấy có thể điều trị để người mắc Klinefelter có thể có con, vì vậy nếu xét nghiệm thấy có bất thường NST giới tính như bị mắc Klinefelter vẫn nên làm xét nghiệm multiplex PCR để xác định mất đoạn AZFabcd. Xét nghiệm này rất có ý nghĩa trong việc lựa chọn hướng can thiệp và tư vấn di truyền.

Có 8/469 (1,71%) trường hợp vừa có bất thường NST và mất đoạn AZF. Tất cả đều VT và các bất thường ở đây đều là bất thường ở NST giới tính, có karyotyp là: 46,XX hoặc 45,X hoặc 46,X,del(Yq) phù hợp với kết quả xét nghiệm có nhiều vị trí mất đoạn AZF trên NST Y.

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có mối liên quan giữa bất thường NST giới tính và mất đoạn nhỏ NST Y. Nếu NST Y có mất đoạn nhánh dài càng lớn thì mất đoạn nhỏ vùng AZFabcd càng nặng.

4.5. Mối liên quan giữa đặc điểm tinh dịch và bất thường di truyền

Về mật độ tinh trùng, kết quả ở bảng 3.24 cho thấy: Nam giới VT có nguy cơ bất thường NST cao gấp 3,63 lần và nguy cơ bất thường ADN bằng 0,57 lần so với người TTN. Trong số 469 nam giới vô sinh, phát hiện 13,9% trường hợp VT, TTN có bất thường NST. Bất thường NST ở nhóm VT là 16,7% cao hơn ở nhóm TTN là 5,2%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

KẾT LUẬN

1. Tỷ lệ, phân bố các dạng bất thường NST và mất đoạn nhỏ NST Y

- Bất thường NST:

- + Ở các nam giới VT và TTN, bất thường NST chiếm 13,9%.
- + Trong các dạng bất thường NST thì bất thường số lượng NST giới tính kiểu 47,XXY chiếm tỷ lệ cao nhất với là 60%.
- + Bất thường cấu trúc NST thường gặp chủ yếu là chuyển đoạn, đảo đoạn và mất đoạn. Đảo đoạn NST số 9 chiếm tỷ lệ cao nhất với là 9,23%. Mất đoạn nhánh dài NST Y là 7,7%.

- Mất đoạn nhỏ NST Y:

- + Đã phát hiện được 10,4% nam giới VT và TTN có mất đoạn nhỏ ở các vùng AZFabcd.

+ Mất đoạn AZFabcd xảy ra ở cả nam giới VT và TTN, trong đó ở nhóm VT là 9%, nhóm TTN 14,8%. Mất đoạn AZFc và AZFd ở nhóm TTN cao hơn ở nhóm VT, trong khi mất đoạn AZFc hoặc AZFd kết hợp như mất đoạn AZFb+c; AZFb+c+d; AZFa+b+c+d xảy ra chủ yếu ở nhóm nam giới VT.

+ Mất đoạn AZFc và AZFc+d chiếm tỷ lệ cao nhất: đều là 26,53%. Các mất đoạn khác có tỷ lệ là: AZFb+c+d (16,33%), AZFd (14,29%), AZFa+b+c+d (6,12 %), AZFb+c (6,12 %) và AZFb (4,08%), không thấy mất đoạn đơn thuần AZFa.

- Bất thường NST và mất đoạn nhỏ NST Y:

+ Số nam giới vô sinh vừa có bất thường NST vừa mất đoạn nhỏ NST Y chiếm 8/469 (1,71%) và tất cả đều ở nhóm VT. Những người này có karyotyp là: 46,XX hoặc 45,X hoặc 46,X,del(Yq) phù hợp với kết quả xét nghiệm có nhiều vị trí mất đoạn AZF trên NST Y.

2. Mối liên quan giữa đặc điểm tinh dịch và bất thường di truyền

- Không có mối liên quan giữa đặc điểm thể tích, độ pH, độ nhớt tinh dịch và bất thường di truyền.

- Tốc độ di chuyển, mật độ tinh trùng và tỷ lệ tinh trùng sống ở những có bất thường di truyền luôn thấp hơn ở những người bình thường.

- Bất thường NST ở những nam giới VT cao hơn ở nhóm TTN, trong khi mất đoạn nhỏ AZFabcd thì ngược lại (nam giới VT có bất thường NST cao gấp 3,63 lần và nguy cơ bất thường ADN bằng 0,57 lần so với người TTN).

- Có mối liên quan giữa bất thường NST giới tính và mất đoạn nhỏ NST Y. NST Y có mất đoạn nhánh dài càng lớn thì mất đoạn nhỏ vùng AZFabcd càng nặng.

KIẾN NGHỊ

1. XN NST và ADN để phát hiện mất đoạn AZFabcd cần được tiến hành thường qui đối với những trường hợp vô sinh nam để tìm nguyên nhân và đưa ra những lời khuyên tư vấn điều trị cho phù hợp.

2. Những người nam giới có bất thường NST vẫn nên được xét nghiệm phát hiện mất đoạn AZFabcd.

3. Nên đưa các chỉ số VSL, VCL, VAP vào xét nghiệm tinh dịch thường quy.