Đánh giá mất đoạn nhỏ nhiễm sắc thể y ở 269 bệnh nhân vô sinh nam do không có tinh trùng bằng kỹ thuật Multiplex PCR

Nguyễn Thị Hương; Trần Văn Khoa*; Nguyễn Thị Thục Anh**

TÓM TẮT

Nghiên cứu 269 bệnh nhân (BN) nam vô sinh nguyên phát do không có tinh trùng. PCR sử dụng sáu cặp mồi cho các đoạn gen AZFa, b, c trên nhiễm sắc thể (NST) Y mã hoá cho yếu tố azoospermia (AZF). Kết quả cho thấy: 21/269 BN (7,81%) mất đoạn nhỏ trên NST Y. Trong đó, 17/269 (6,32%) mất đoạn AZFc, còn lại là mất đoạn AZFa và AZFb, mỗi loại 2/269, chiếm 0,74%. 1 trường hợp mất cả 3 đoạn gen AZFa, b, c. Phản ứng Multiplex-PCR nhân gen thuộc STR locus AZF có giá trị chẩn đoán mất đoạn nhỏ NST Y. Tỷ lệ mất đoạn chiếm trong nhóm nghiên cứu là 7,81%, chủ yếu là mất đoạn AZFc.

* Từ khoá: Mất đoạn nhỏ nhiễm sắc thể Y; Vô sinh nam; Vô tinh trùng.

Evaluation of microdeletions on y chromosome in 269 azoospermia infertile men using Multiplex PCR

SUMMARY

The study was carried out on 269 primary azoospermia infertile men. Multiplex-Polymerase chain reactions (PCR) were conducted using six Y-specific primer sets of gene regions coding for azoospermia factor (AZF), including AZFa, b, c. The results showed that, of the 269 infertile men, 21 cases having microdeletions in the AZF regions on Y-chromosome, accounted for 7.81%. In which, 17/269 cases having AZFc deletion, accounted for 6.32%, the remained having AZFa or AZFb deletion (2+2/269), accounted for 0.74% each. AZFa+b+c deletion presented in one case. Multiplex-PCR amplification of AZF locus is useful for diagnosis of microdeletions in the Y-chromosome. Taking up rate of the deletion among the study subjects was 7.81%, which is mainly AZFc deletions.

** Key words: Microdeletions in the Y-chromosome; Male infertile; Azoospermia.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Khoảng 15 - 20% các cặp vợ chồng vô sinh và khoảng 40% trong số đó là do nam giới [3]. Phân tích di truyền cho thấy: có 3 vùng không chồng nhau trên NST Y, gọi là vùng yếu tố vô tinh trùng AZFa, AZFb và AZFc. Các nghiên cứu di truyền gần đây đã xác định được gần 15 gen mới hoặc họ gen trên NST Y, một số gen, trong số đó thuộc vùng AZF [4]. Mất đoạn nhỏ một trong số các gen này có thể liên quan đến suy giảm sinh tinh và dẫn đến vô sinh nam [10].

* *Học viện Quân y*

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Đình Tảo

Nhiều nghiên cứu tần số mất đoạn nhỏ NST Y ở các chủng tộc khác nhau trên thế giới cho kết quả mất đoạn nhỏ nam giới vô tinh trùng và thiểu tinh trùng dao động từ 1 - 55%. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có

nhiều nghiên cứu về mất đoạn nhỏ NST Y trên BN vô sinh nam ở Việt Nam.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

269 nam giới vô sinh, vô tinh trùng nguyên phát, tuổi từ 20 - 45 (trung bình 28,7 tuổi), dân tộc Kinh, đến khám tại Trung tâm Công nghệ Phôi, Học viện Quân y và Viện Nam học và Hiếm muộn Hà Nội từ tháng 12 - 2009 đến 2 - 2011, được khám lâm sàng, xét nghiệm hormon và kiểm tra hệ thống sinh dục. Mỗi trường hợp lấy 2 ml máu, chống đông bằng EDTA.

** Tiêu chuẩn loại trừ:* vô sinh thứ phát, có bất thường cơ quan sinh dục, bất thường NST, lấy tinh dịch xét nghiệm sau khi kiêng sinh hoạt trong vòng 3 ngày. Phân tích mẫu tinh dịch theo tiêu chí của Tổ chức Y tế Thế giới [10]. Các mẫu chứng dương và mẫu chứng âm được lựa chọn từ nam, nữ đã có con trong 2 năm.

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Multiplex PCR:*

Tiến hành phản ứng Multiplex PCR trên 2 ống PCR riêng rẽ từ mẫu ADN của 269 BN vô sinh nam, kèm theo các chứng dương và chứng âm, bao gồm cả chứng âm nước cất. Ống thứ nhất bao gồm các marker nội đối chứng SRY và sY86, sY127, sY254, tương ứng là vùng AZFa, AZFb và AZFc. Ống thứ hai gồm các marker nội đối chứng SRYvà sY84, sY134, sY153, tương ứng là các vùng AZFa, AZFb và AZFc [1].

Mỗi phản ứng bao gồm 25µl mastermix, 500 µg ADN khuôn, 20 mmol dNTP, 0,25µl mỗi mồi, đệm, 1UI Taq DNA polymerase, 25 mM MgCl2, nước cất vừa đủ đến 50µl. Thực hiện phản ứng qua 35 chu kỳ. Chu trình nhiệt mỗi chu kỳ như sau: 94^{o}C trong 45 giây, 57^{o}C trong 45 giây và 72^{o}C trong 1 phút. Chương trình được đặt biến tính lần đầu trước ở 94^{o}C trong 5 phút và cuối cùng nối dài 72^{o}C trong 6 phút [2].

** Điện di ADN:*

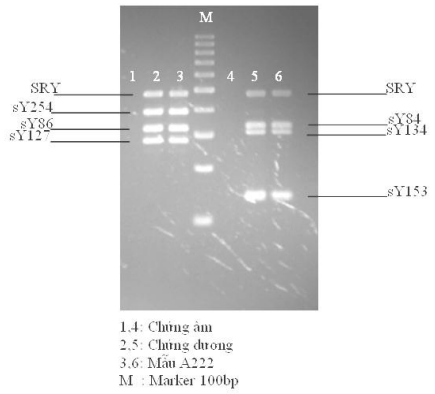
Sản phẩm PCR điện di trên gel agarose 1,5%, nhuộm ethidium bromide, soi UV và chụp hình, phân tích trên hệ thống Chemi doc.

Các mẫu có nghi ngờ mất đoạn đều thực hiện phản ứng nhân gen đơn mồi lặp lại 3 lần để khẳng định kết quả thu được.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

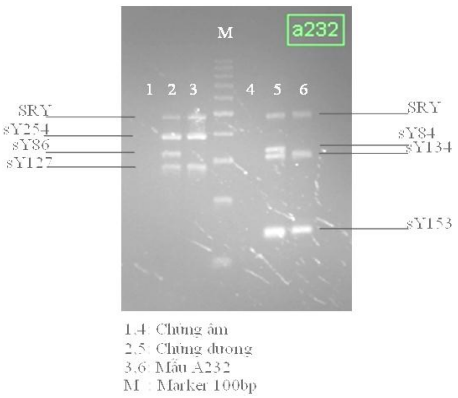
1. Tỷ lệ mất đoạn gen AZF.

Trong số 269 BN vô tinh trùng, phát hiện 21 BN mất đoạn gen AZF. Dưới đây là một số hình ảnh điện di của trường hợp bình thường và mất đoạn AZF.



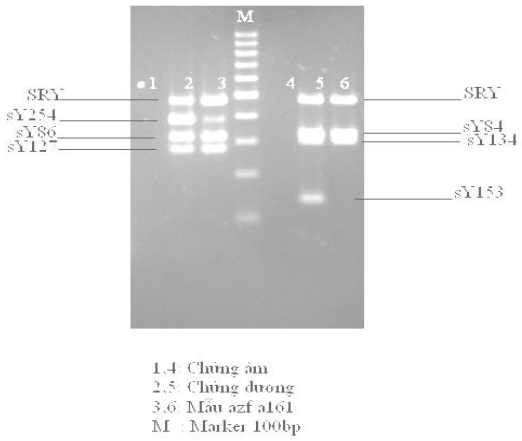
Hình 1: Hình ảnh không mất đoạn ở mẫu A222.

Dải băng 1 và 4: chứng âm; dải băng 2 và 5: chứng dương; dải 3 và 6: mẫu bệnh không có mất đoạn.



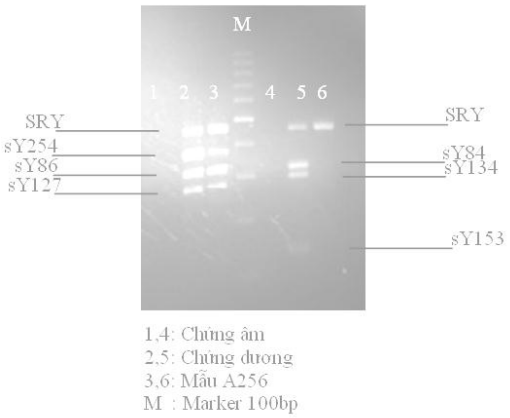
Hình 2: Hình ảnh mất đoạn AZFa ở mẫu A232.

Dải băng 1 và 4: chứng âm; dải băng 2 và 5: chứng dương; dải băng 3: mất đoạn sY86 (AZFa); dải 6: mất đoạn sY84 (AZFa).



Hình 3: Hình ảnh mất đoạn AZFc ở mẫu A262.

Dải băng 1 và 4: chứng âm; dải băng 2 và 5: chứng dương; dải băng 3: không mất đoạn; dải băng 6: mất đoạn gen sY153 (AZF c).



Hình 4: Hình ảnh mất cả ba đoạn AZFa+b+c ở mẫu A256.

Dải băng 1 và 4: chứng âm; dải băng 2 và 5: chứng dương; dải băng 6: mất đoạn sY84 thuộc vùng AZFa, sY134 thuộc vùng AZFb, sY153 thuộc vùng AZFc.

2. Tỷ lệ dạng mất đoạn gen AZF.

Trong số 21 BN có mất đoạn AZF, tỷ lệ các dạng mất đoạn như sau: mất đoạn AZFc cao nhất (76,19%), tiếp theo là mất đoạn AZZa (9,52) và AZFb (9,52), đặc biệt có trường hợp mất cả 3 đoạn gen AZF (4,76%).

Theo nghiên cứu các nhiều tác giả, trong số 3 vùng AZFa, AZFb và AZFc, tỷ lệ mất đoạn thường gặp nhất ở AZFc, rồi đến AZFb và thấp nhất là AZFa. Tần số mất đoạn chung gen AZF dao động trong các nhóm đối tượng khác nhau. Nghiên cứu của Yao và CS gặp 16%. Một số tác giả khác lại thấy, tỷ lệ mất đoạn gen thuộc vùng AZF rất cao như Ali Mohammad M và CS tại Iran (52%) [1], hay nghiên cứu của Foresta và CS tại Ý, tần số này lên đến 55,5% [4]. Rima Dama và CS (2003), nghiên cứu 83 trường hợp, tại Ấn Độ gặp 8 trường hợp (9,63%) mất đoạn nhỏ NST Y. Trong đó, mất cả AZF a + b là 3, 1 trường hợp mất đoạn AZFb và 4 trường hợp mất đoạn AZFc [7]. Martinez M. C và CS tại Tây Ban Nha (2000) trên 57 trường hợp vô tinh trùng, phát hiện 14% mất đoạn AZF, không phát hiện thấy mất a và chỉ phát hiện thấy mất AZFb hoặc AZFc hoặc mất đoạn cả AZFa + b [5]. Nói chung, tỷ lệ trung bình mất đoạn nhỏ NST Y trong vô tinh trùng và thiểu tinh trùng của đa số nhiều tác giả khác từ 5 - 10% [5, 6]. Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện thấy tần số mất đoạn là 7,81%, nằm trong khoảng phát hiện của nhiều tác giả khác.

Nhiều nghiên cứu hiện nay đều cho rằng: mất đoạn AZF thuộc vùng Yq11.23 có liên quan đến chức năng sinh tinh [9]. Vogt và CS cho rằng: có mối liên quan đến giữa kích thước đoạn đứt và vị trí đoạn đứt trên vùng AZF với mức độ rối loạn sinh tinh [8]. Mất đoạn AZFa liên quan đến không có tế bào mầm sinh dục trong ống sinh tinh, trong khi mất đoạn AZFb gây rối loạn quá trình chín trong phân bào giảm nhiễm. Mất đoạn AZFc, có thể gây ra những kiểu hình khác nhau từ hội chứng chỉ có tế bào Sertoli týp II đến giảm sinh tinh. Chính vì điều đó, việc phát hiện và phân loại mất đoạn NST Y có giá trị định hướng lâm sàng điều trị. Khi BN mất đoạn AZFa không có tế bào dòng tinh, các biện pháp điều trị nhằm kích thích sinh tinh vô hiệu quả. Đặc biệt, những BN mất cả 3 vùng gen khảo sát AZFa+b+c, việc điều trị nội khoa không mang lại hiệu quả gì, chỉ gây tốn kém cho BN. Xét nghiệm sẽ giúp BN tránh được việc điều trị tốn kém và trong trường hợp này, bác sỹ sẽ tư vấn cho BN xin tinh trùng. Đối với trường hợp mất đoạn khác trên vùng AZF, có tế bào dòng tinh, BN vẫn còn hy vọng có con bằng chính tinh trùng của mình thông qua các biện pháp hỗ trợ sinh sản như lấy và biệt hóa tinh tử từ trong mô tinh hoàn.v.v.

Đa số các mất đoạn nhỏ NST Y được phát hiện là đột biến mới. Điều này là một thực tế, vì những trường hợp mất đoạn AZF gây vô sinh do vô tinh trùng ở BN, nhưng không hề có ở người bố. Nếu người bố bị mất đoạn NST Y như ở người con thì không thể sinh con bình thường được. Nguồn gốc của mất đoạn còn chưa rõ. Mất đoạn có thể phát sinh ở tinh hoàn, trong trứng đã thụ tinh hoặc ở phôi gây, ngăn cản quá trình tạo nguyên bào dòng tinh, dẫn đến giảm sinh tinh ở người trưởng thành [8]. Tần số cao mất đoạn nhỏ NST Y cho thấy NST này rất dễ bị mất vật chất di truyền. Những bất thường xảy ra do tái tổ hợp trình tự tương đồng giữa NST X và Y, cũng như trên chính những đoạn lặp lại trên NST Y sẽ gây ra bệnh lý. Tính không ổn định trên NST Y liên quan đến tần số cao đoạn lặp lại dọc chiều dài NST này [8].

Mặc dù mất đoạn nhỏ NST Y thuộc vùng AZF gây giảm sinh tinh đã rõ ràng, nhưng những nghiên cứu hiện nay trên thế giới vẫn đang cố gắng làm sáng tỏ vai trò của gen đến quá trình sinh tinh.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu, chúng tôi đi đến một số kết luận sau:

Phản ứng Multiplex-PCR có hiệu quả trong việc nhân và phát hiện mất đoạn nhỏ gen AZF (a,b,c) trên NST Y.

Trong 269 BN nam vô sinh nguyên phát, vô tinh trùng, đã phát hiện 7,8% mất đoạn gen AZF. Trong đó, chủ yếu là mất đoạn AZFc (76,19%) tổng số các trường hợp có mất đoạn.

Việc phát hiện mất đoạn gen AZF ở BN vô sinh, vô tinh trùng nguyên phát có giá trị định hướng điều trị vô tinh trùng trong vô sinh nam, mang lại hiệu quả điều trị cao hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ali Mohammad M and Hayat Mombaini. Screening of Y-chromosome microdeletions in infertile males. J Hum Reprod Sci Jan. 2008, Jun 1 (1), pp.2-9.

2. Anurag M, Rima D, Rajeev K, et al. Screening for Y-chromosome microdeletions in infertile Idian males: utility of simplified multiplex PCR. Indian J Med Res. 2008, 127, pp.124-132.

3. De Kretser DM. Male infertility. Lancet. 1997, 349, pp.787-90.

4. Foresta C, Ferlin A, Garolla A, et al. High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. Hum Reprod. 1998, 13, pp.302-307.

5. Martinez M. C, M. J. Bernabe, E. Gomez, et al. Screening for AZF deletion in a large series of severely. Journal of Andrology. 2000, Vol 21, No 5, September/October, pp.651-655.

6. Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, et al. Screening for Y-chromosome microdeletions in 226 Slovenian sub-fertile men. Hum Reprod. 2002, 17, p17.

7. Rima Dada, N P. Gupta and K Kucheria. Molecular screening for Yq microdeletion in men with idiopath oligozoospermia and azoospermia. J Biosci. 2003, 28, pp.163-168.

8. Simoni M, Kamishke A, Nieschlag E. Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the workup of male fertility. Initiative for international quality control. Hum Reprod. 1998, 13, pp.1764-1768.

9. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al. Human Y-chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. Hum Mol Genet. 1996, 5, pp.933-943.

10. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of Human semen and sperm cervical mucus interaction. Cambridge, Cambridge University Press. 3rd edition. 1992.