

PHÁT HIỆN VI ĐỨT ĐOẠN NHIỄM SẮC THỂ Y Ở BỆNH NHÂN VÔ SINH NAM BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX-PCR

Trần Văn Khoa*; Trần Thị Thu Huyền**;
Quản Hoàng Lâm*

TÓM TẮT

Nghiên cứu trên 16 trường hợp nam vô tinh trùng-vô sinh nguyên phát. Sử dụng phản ứng Multiplex-Polymerase chain reaction (PCR) với 6 cặp mồi trình tự đặc hiệu STR trên nhiễm sắc thể Y mã hoá cho yếu tố azoospermia (AZF). Kết quả: 1/16 bệnh nhân (BN) vô sinh nam, có vi đứt đoạn ở vùng AZFb và AZFc trên nhiễm sắc thể Y. Phản ứng Multiplex-PCR nhân gen thuộc STR locus AZF có giá trị chẩn đoán vi đứt đoạn nhiễm sắc thể Y.

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

DETECTION OF MICRODELETIONS ON Y-CHROMOSOME IN INFERTILE MEN BY MULTIPLEX-PCR

SUMMARY

The study was carried out on sixteen primary azoospermia infertile men. Multiplex-Polymerase chain reaction (PCR) amplification using six Y-specific STS primer sets of azoospermia factor (AZF) regions. Results: Of the 16 infertile subjects, one showed micro deletion in the AZFb and AZFc regions of Y-chromosome. Multiplex-PCR amplification of STR-AZF locus may be useful for the diagnosis of microdeletions in the Y-chromosome.

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

ĐẶT VẤN ĐỀ

Khoảng 15 - 20% các cặp vợ chồng vô sinh. Trong đó, khoảng 40% trong số này có nguyên nhân do nam giới [3]. Phân tích di truyền cho thấy có 3 vùng không chồng nhau trên nhiễm sắc thể Y gọi là vùng yếu tố vô tinh trùng AZFa, AZFb và AZFc. Những nghiên cứu di truyền gần đây đã xác định được gần 15 gen mới hoặc họ gen trên nhiễm sắc thể Y, một số gen trong số đó thuộc vùng AZF [4]. Vi đứt đoạn một trong số các gen này liên quan đến suy giảm sinh tinh và vô sinh nam [5].

Những nghiên cứu tần số vi đứt đoạn nhiễm sắc thể Y ở các chủng tộc người khác nhau trên thế giới cho thấy kết quả vi đứt đoạn nam giới vô tinh trùng và thiếu tinh trùng dao động từ 1 - 55%. Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu về vi đứt đoạn nhiễm sắc thể Y trên BN vô sinh nam.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

16 nam giới vô sinh, vô tinh trùng nguyên phát, tuổi từ 24 - 62 (trung bình 36), dân tộc Kinh, đến khám tại Trung tâm Công

*

**

Phản biện khoa học: PGS.TS. Hoàng Văn Lương

nghe Phôi, Học viện Quân y từ tháng 11- 2009 đến 3 2010. BN được khám lâm sàng, xét nghiệm hormon và kiểm tra hệ thống sinh dục. Tiêu chí loại trừ: vô sinh thứ phát, có bất thường cơ quan sinh dục, bất thường nhiễm sắc thể. Lấy tinh dịch xét nghiệm sau khi kiêng sinh hoạt tình dục trong vòng 3 ngày. Phân tích mẫu tinh dịch theo tiêu chí của Tổ chức Y tế Thế giới [6]. 10 nam giới đã có con được chọn làm chứng dương.

2. Phương pháp nghiên cứu.

* Multiplex-PCR:

Phản ứng Multiplex-PCR tiến hành trên 2 ống PCR riêng rẽ, từ mẫu ADN của 16 trường hợp vô sinh nam, 10 chứng dương kèm theo chứng âm nước cất. Ống 1 bao gồm các marker nội đối chứng SRY và sY86, sY127, sY254 tương ứng là vùng AZFa, AZFb và AZFc. Ống thứ hai bao gồm các marker nội đối chứng SRY và sY84, sY134, sY153 tương ứng với vùng AZFa, AZFb và AZFc [1].

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

* Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5%, nhuộm ethidium bromide, soi UV, chụp hình và phân tích.

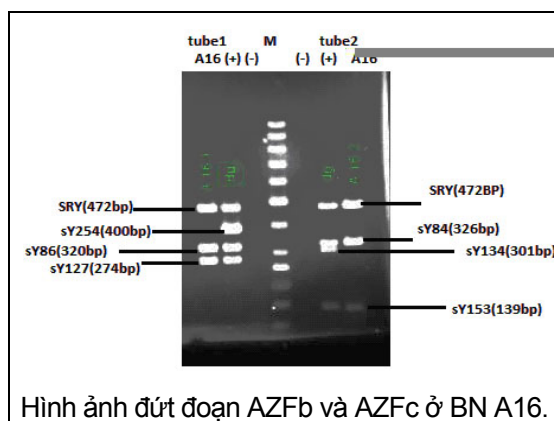
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả trên nhóm chứng.

10 trường hợp chứng dương là nam giới đã có con, kết quả nhân gen đều thấy xuất hiện đủ 4 băng khi điện di từ phản ứng Multiplex-PCR ở mỗi ống, chứng tỏ việc nhân gen với các mồi đã chọn đảm bảo độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

2. Kết quả trên nhóm vô tinh trùng.

Trong số 16 BN vô tinh trùng, chúng tôi phát hiện thấy 1 BN đứt đoạn gen thuộc vùng AZFb và vùng AZFc.



Ống 1: dải băng 1: đứt đoạn sY254 (AZFc);
dải băng 2: chứng dương; dải băng 3: chứng âm; M: Marker 50 bp.

Ống 2: dải băng 3: đứt đoạn sY134 (AZFb).
M: Marker 50 bp.

Theo nhiều tác giả, trong số ba vùng AZFa, AZFb và AZFc, tỷ lệ đứt đoạn thường gặp nhất ở AZFc rồi đến AZFb và thấp nhất là AZFa. Tần số đứt đoạn gen AZF dao động trong các nhóm đối tượng khác nhau. Theo nghiên cứu của Yao và CS là 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% [7]. Tỷ lệ trung bình vi đứt đoạn nhiễm sắc thể Y trong vô tinh trùng và thiếu tinh trùng của nhiều tác giả từ 5 - 10%. Nghiên cứu của chúng tôi với số lượng BN chưa nhiều, nên chưa gặp các trường hợp có đứt đoạn AZFa và chưa có thống kê tần số đứt đoạn. Các nghiên cứu hiện nay đều cho rằng đứt đoạn AZF thuộc vùng Yq11.23 có liên quan đến chức năng sinh tinh [10].

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]. Đứt đoạn AZFa liên quan đến không có tế bào mầm sinh dục trong ống sinh tinh, trong khi đứt đoạn AZFb gây rối loạn quá trình chín trong phân bào giảm nhiễm. Đứt đoạn AZFc có thể gây ra những kiểu hình khác nhau từ hội chứng chỉ có tế bào Sertoli tít II đến giảm sinh tinh. Vì vậy, việc phát hiện và phân loại đứt đoạn nhiễm sắc thể Y có giá trị định hướng lâm sàng điều trị. Trong trường hợp BN có đứt đoạn AZFa không có tế bào dòng tinh, các biện pháp điều trị nhằm kích thích sinh tinh không có hiệu quả. Xét nghiệm sẽ giúp BN tránh được việc điều trị tốn kém và với trường hợp này, bác sỹ sẽ tư vấn cho BN xin tinh trùng. Trong trường hợp đứt 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...

Đa số các vi đứt đoạn nhiễm sắc thể Y được phát hiện là đột biến mới. Nguồn gốc các đứt đoạn còn chưa rõ. Đứt 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 ở phôi thai dẫn đến giảm sinh tinh ở người trưởng thành [9]. Tần số cao vi đứt đoạn nhiễm sắc thể Y cho thấy nhiễm sắc thể Y rất dễ bị mất vật chất di truyền. Những bất thường xảy ra do tái tổ hợp những trình tự tương đồng giữa nhiễm sắc thể X và Y cũng như trên chính những đoạn lặp lại trên nhiễm sắc thể Y cũng gây ra bệnh lý. Tính không ổn định trên nhiễm sắc thể Y liên quan đến tần số cao những đoạn lặp lại dọc chiều dài nhiễm sắc thể này [8].

Mặc dù vi đứt đoạn nhiễm sắc thể Y thuộc vùng AZF gây giảm sinh tinh 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.

Với những kết quả bước đầu sử dụng Multiplex-PCR để phát hiện vi đứt đoạn gen trên vùng AZF, chúng tôi chưa có được tần số đứt đoạn gen AZF. Bằng kỹ thuật này, cần tiếp tục nghiên cứu để có những số liệu thống kê vi đứt đoạn nhiễm sắc thể Y trên BN vô tinh trùng và thiếu tinh trùng nguyên phát dẫn đến vô sinh nam và hỗ trợ cho công tác điều trị vô sinh nam mang lại hiệu quả cao hơn.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Đã hoàn thiện được quy trình Multiplex-PCR nhân gen AZF (a, b, c) trên nhiễm sắc thể Y.

2. Đã áp dụng quy trình kỹ thuật nói trên để phát hiện vi đứt đoạn gen AZF ở BN nam vô sinh nguyên phát-vô tinh trùng.

Việc phát hiện đứt 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 để mang lại hiệu quả điều trị cao hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Ali Mohammad M., 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 Indian males: utility of simplified Multiplex-PCR. indian J. med Res. 2008, 127, pp.124-132.

3. *De Kretser D.M.* Male infertility. Lancet. 1997, 349, pp.787-790.

4. *Lahn B.T., Page D.* Functional coherence of the human Y-chromosome. Science. 1998, 278, pp.675-680.

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

6. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the examination of Human semen and sperm cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press. 1992, 3rd edition.

7. *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.

8. *Krausz C., McElreavey K.* Y-chromosome and male infertility. Frontiers in Bioscience. 1999, 4, pp.1-8.

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

10. *Vogt P.H., 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.