

ĐỨT GÃY DNA TINH TRÙNG: NGHIÊN CỨU PHA CHẾ BỘ XÉT NGHIỆM VÀ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG LÂM SÀNG

Nguyễn Minh Thu¹, Lê Thị Minh Phương¹, Nguyễn Ngọc Dũng¹,
Bùi Thị Lành¹, Phạm Quang Anh², Nguyễn Hoàng Long³,
Lương Thị Lan Anh¹, Hoàng Thu Lan¹, Đoàn Kim Phượng¹
Lê Thị Quyên¹ và Nguyễn Thị Trang¹, ✉

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Trường THCS và THPT Nguyễn Tất Thành

³Trường THPT chuyên Đại học Sư phạm Hà Nội

Đứt gãy DNA tinh trùng ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sinh sản của nam giới. Đa số bộ kit xác định mức độ đứt gãy DNA tinh trùng ở nước ta hiện nay đều phải nhập ngoại với giá thành cao. Do đó chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục đích tự sản xuất bộ kit phục vụ nhu cầu trong nước và bước đầu ứng dụng phương pháp này để chẩn đoán nguyên nhân bất thường sinh sản nam, sảy thai, thai lưu và thất bại hỗ trợ sinh sản. Mẫu nghiên cứu là tinh dịch của 350 nam giới đến khám sức khỏe sinh sản tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội từ tháng 8/2018 đến tháng 8/2019. Đề tài đã hoàn thiện thành công quy trình pha chế bộ xét nghiệm với độ chính xác đạt yêu cầu ($CV \leq 5\%$, $t_n < t_c$), độ nhạy 96,91% và độ đặc hiệu 97,10%. Bộ xét nghiệm cũng có khả năng đánh giá mức độ đứt gãy DNA tinh trùng (DFI) tương đương với bộ xét nghiệm thương mại Halosperm ($R = 0,995$; $p < 0,001$). Các phân tích cũng cho thấy DFI có tương quan nghịch với vận tốc và hình thái bình thường của tinh trùng ($p < 0,01$) và có liên quan đến tiền sử sảy thai, thai lưu và thất bại hỗ trợ sinh sản. Đề tài này là cơ sở quan trọng để hướng tới ứng dụng rộng rãi xét nghiệm xác định đứt gãy DNA tinh trùng trên lâm sàng.

Từ khóa: DFI, vô sinh nam, sảy thai, thai lưu, hỗ trợ sinh sản, tinh trùng.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đứt gãy DNA tinh trùng là một trong những rối loạn vật chất di truyền dẫn tới khả năng thụ tinh kém, thai kém phát triển hoặc dễ sảy thai.^{1,2} Theo ước tính, khoảng 25% bệnh nhân nam vô sinh có mức độ đứt gãy DNA tinh trùng cao.³

Ngoài ra, ở những cặp vợ chồng vô sinh, đứt gãy DNA tinh trùng còn liên quan đến tiền sử sảy thai, thai lưu nếu đứt gãy xảy ra ở các vị trí gen liên quan đến làm tổ.⁴ Chỉ số đứt gãy DNA tinh trùng cũng có giá trị rất cao trong việc tiên lượng khả năng sinh sản của nam giới, giúp lựa chọn phương pháp hỗ trợ sinh sản

(HTSS) thích hợp và dự đoán tỷ lệ thành công của phương pháp hỗ trợ sinh sản đó.⁵

Trong các phương pháp đánh giá mức độ đứt gãy DNA tinh trùng, phổ biến nhất là khảo sát mức độ phân tán chất nhuộm sắc của tinh trùng (SCD) do Fernandez và cộng sự xây dựng năm 2003. Phương pháp này dựa trên sự biến tính DNA có kiểm soát để tạo điều kiện cho việc loại bỏ các protein có trong mỗi tinh trùng thông qua các dung dịch biến tính DNA, dung dịch ly giải tách protein màng nhân. Hình ảnh của quầng halo được tạo ra sau thí nghiệm cho phép đánh giá các mức độ đứt gãy khác nhau của DNA tinh trùng. Bộ xét nghiệm thương mại Halosperm của hãng Halotech (Tây Ban Nha), được xây dựng dựa theo nguyên lý trên và được phổ biến rộng rãi ở nhiều bệnh viện, trung

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Trang,

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: trangnguyen@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 25/11/2019

Ngày được chấp nhận: 01/04/2019

tâm hỗ trợ sinh sản. Tuy nhiên, Việt Nam chưa có khả năng tự sản xuất bộ xét nghiệm đứt gãy DNA tinh trùng mà phải nhập ngoại hoàn toàn, với giá thành khá cao so với mặt bằng chung của bệnh nhân. Để góp phần giảm chi phí, đưa xét nghiệm đứt gãy DNA tinh trùng đến gần hơn với bệnh nhân, chúng tôi tiến hành đề tài " Đứt gãy DNA tinh trùng: nghiên cứu pha chế bộ xét nghiệm và bước đầu ứng dụng lâm sàng " với mục tiêu:

1. Hoàn thiện quy trình pha chế bộ xét nghiệm xác định đứt gãy DNA tinh trùng.
2. Sử dụng bộ xét nghiệm xác định đứt gãy DNA tinh trùng để đánh giá mối liên quan với bất thường sinh sản nam, sảy thai thai lưu, thất bại hỗ trợ sinh sản.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Mẫu tinh dịch của nam giới đến khám và sàng lọc vô sinh có thực hiện xét nghiệm đứt gãy DNA tinh trùng tại Trung tâm Tư vấn Di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội được lấy bằng phương pháp tự thủ dâm vào lọ nhựa vô khuẩn sau khi kiêng xuất tinh trong vòng từ 2 ngày đến 7 ngày. Các mẫu tinh dịch được bảo quản ở nhiệt độ thường trong vòng 4 tiếng hoặc tại 4°C trong vòng 24h.

Tiêu chuẩn loại trừ

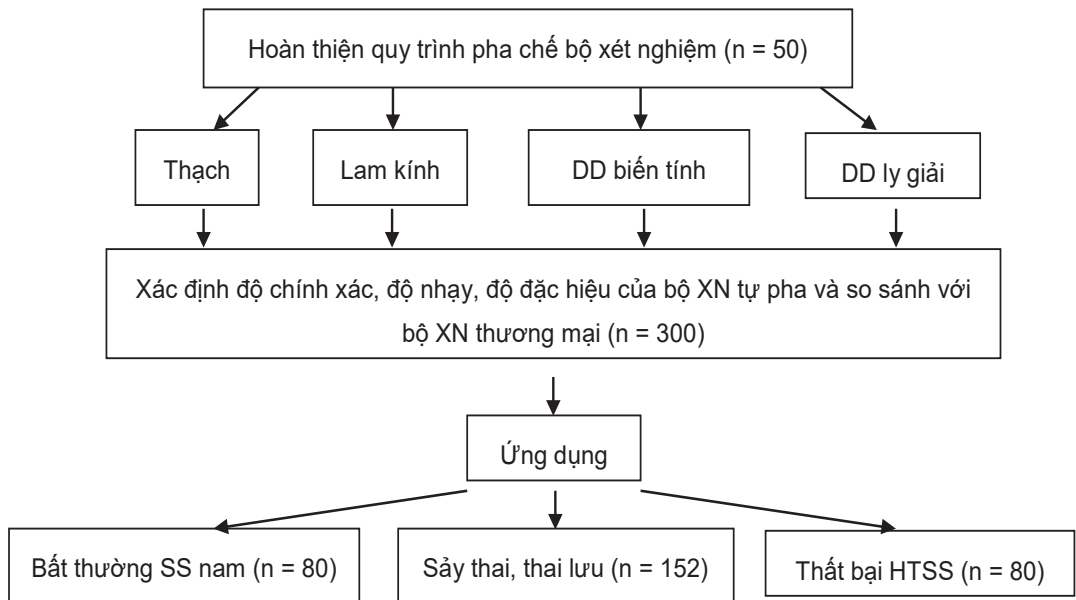
Nam giới dưới 18 tuổi, mật độ tinh trùng dưới 1 triệu/ml, mắc các bệnh HIV, tâm thần và không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2. Phương pháp

Thời gian và địa điểm nghiên cứu: từ tháng 8/2018 đến tháng 8/2019 tại Trung tâm Tư vấn Di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

Phương pháp nghiên cứu: mô tả.

Sơ đồ nghiên cứu: Hình 1: Sơ đồ nghiên cứu



Hình 1. Sơ đồ nghiên cứu

Chú thích: DD: dung dịch; XN: xét nghiệm; SS: sinh sản; HTSS: hỗ trợ sinh sản

Quy trình xét nghiệm: Mẫu tinh dịch của bệnh nhân được sử dụng để làm tiêu bản với thạch agarose trên lam kính. Tiêu bản này sẽ được xử lý qua dung dịch biến tính, dung dịch ly giải, cồn, và thuốc nhuộm. Tiêu bản sau đó được đánh giá trên kính hiển vi quang học và chỉ số DFI thu được sẽ đặc trưng cho mức độ đứt gãy DNA tinh trùng của mỗi bệnh nhân.

3. Đạo đức nghiên cứu

Bệnh nhân được giải thích đầy đủ về quyền lợi khi tham gia nghiên cứu và đồng ý tham gia nghiên cứu. Tất cả thông tin của bệnh nhân được bảo mật hoàn toàn và chỉ phục vụ mục đích nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ

1. Hoàn thiện quy trình pha chế bộ xét nghiệm xác định đứt gãy DNA tinh trùng

Tối ưu bộ xét nghiệm xác định đứt gãy DNA tinh trùng

Các nguyên vật liệu sử dụng trong bộ xét nghiệm:

- Thạch để tạo hỗn hợp với tinh dịch: 70μl thạch agarose 0,7%.
- Lam kính tạo tiêu bản: lam kính phủ thạch

agarose 0,3%.

- Dung dịch biến tính: HCl 30%.
- Dung dịch ly giải: 0,5 M DTT; 2,5 M NaCl; 0,2 M Tris; 1% Triton X - 100
- Thuốc nhuộm: Giemsa 30%

Sử dụng 50 mẫu tinh dịch để tối ưu từng bước của bộ xét nghiệm bằng cách xác định đứt gãy DNA tinh trùng của bệnh nhân song song bằng 2 phương pháp: i. Thay đổi từng thành phần phản ứng, ii. sử dụng hoàn toàn kit Halosperm. So sánh ghép cặp kết quả thu được, kết quả không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa kết quả đứt gãy DNA tinh trùng làm bằng bộ xét nghiệm tự pha với bộ xét nghiệm Halosperm với độ tin cậy 95% ($p = 0,154 - 0,572 > 0,05$).

Xác định độ chính xác bộ xét nghiệm tự pha Độ chụm

Độ chụm mô tả mức độ dao động của các kết quả thử nghiệm độc lập quanh trị giá trung bình trong các điều kiện khác nhau (kỹ thuật viên, dụng cụ, phòng thí nghiệm...). Xác định mức độ đứt gãy DNA tinh trùng của một mẫu bằng bộ xét nghiệm tự pha lặp lại 10 lần, kết quả thu được $CV\% = 2,62 - 4,87\% \leq 5\%$.

Bảng 1. Độ chính xác của bộ xét nghiệm đánh giá mức độ đứt gãy DNA tinh trùng tự pha chế

1a	Độ lặp lại	Độ chụm trung gian	Độ tái lập
Giá trị trung bình	14,92	24,05	7,36
SD	0,391	0,686	0,359
CV%	2,62%	2,85%	4,87%

1b	Kit thương mại	Kit tự pha
DFI (%)	14,8	14,92
SD	0,391	

Bảng 1a: Kiểm định độ chụm

Bảng 1b: Kiểm định độ đúng

Độ đúng

Độ đúng chỉ mức độ gần nhau giữa các giá trị trung bình của kết quả thử nghiệm và giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận là đúng. Xác định mức độ đứt gãy DNA tinh trùng lặp lại 10 lần, so sánh với kết quả được xác định bởi bộ kit Halosperm, tính được $t_m = 0,971 < t_c$ (tra bảng $t_c = 2,262$).

Độ nhạy và độ đặc hiệu

Đánh giá độ phân mảnh DNA tinh trùng của 300 mẫu tinh dịch song song bằng 2 phương pháp: bằng bộ xét nghiệm tự pha và bộ xét nghiệm thương mại Halosperm thu được kết quả như Bảng 2.

Bảng 2. Độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ xét nghiệm tự pha chế

Chỉ số	Kết quả
Số kiểm nghiệm dương tính thật	162
Số kiểm nghiệm dương tính giả	2
Số kiểm nghiệm âm tính thật	131
Số kiểm nghiệm âm tính giả	5

Từ đó, chúng tôi tính độ nhạy của bộ xét nghiệm tự pha là 96,91% và độ đặc hiệu 97,10%

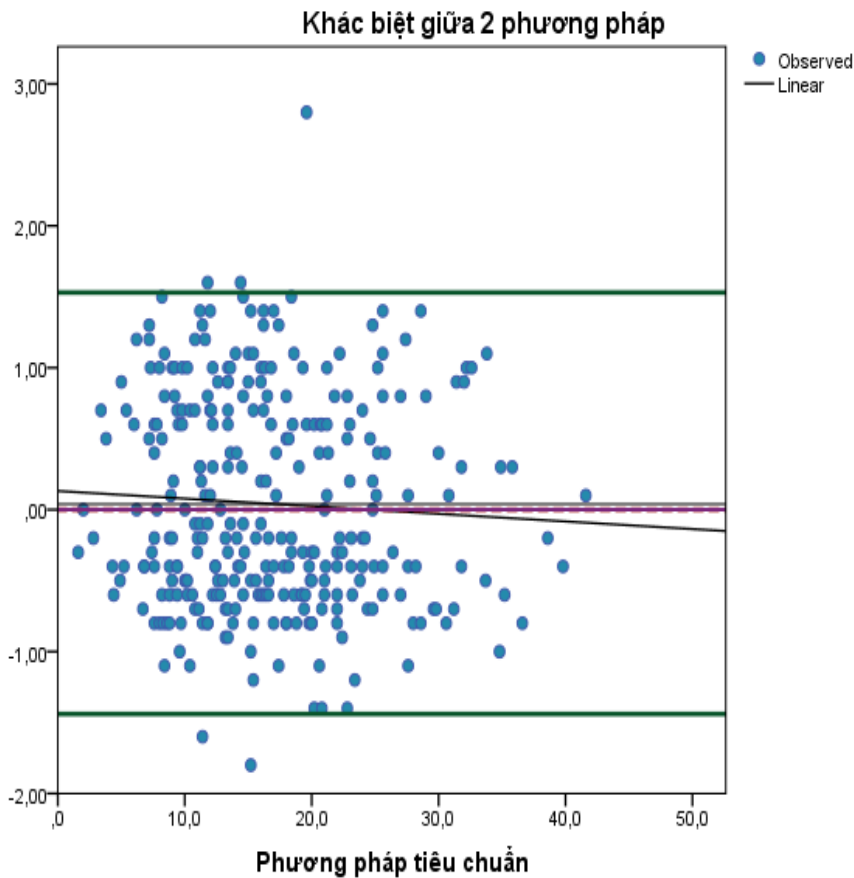
So sánh bộ xét nghiệm tự pha và bộ xét nghiệm Halosperm

So sánh kết quả đứt gãy DNA tinh trùng của 300 mẫu tinh dịch trên bằng hai phương pháp, tính được hệ số tương quan Pearson = 0,995 với $p < 0,001$; chứng tỏ kết quả thu được giữa 2 phương pháp có sự tương quan mạnh và có ý nghĩa. So sánh T - test cũng cho kết quả xét nghiệm thu được từ 2 phương pháp không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% ($p = 0,236 > 0,05$).

Bảng 3. Kiểm định Pearson và t - test

N				300
Hệ số tương quan Pearson				0,995
p				< 0,001
Khoảng tin cậy 95 %			Giới hạn trên	0,996
			Giới hạn dưới	0,994
			Khoảng tin cậy 95%	
t	p	Trung bình sự khác biệt	Giới hạn dưới	Giới hạn trên
1,187	0,236	- 0,010	- 0,003	0,011

Biểu đồ Bland Atlman cũng cho thấy khác biệt trung bình giữa 2 phương pháp là rất nhỏ (0,042). Đa số khác biệt nằm trong giới hạn $\pm 1,96$ SD.



Biểu đồ 1. Biểu đồ Bland - Altman

2. Liên quan đứt gãy DNA tinh trùng với bất thường sinh sản nam, sảy thai thai lưu, thất bại hỗ trợ sinh sản

Liên quan đứt gãy DNA tinh trùng và bất thường sinh sản nam

Trong 80 bệnh nhân nam giới được chẩn đoán vô sinh được làm tinh dịch đồ và xác định đứt gãy DNA tinh trùng, 36 trường hợp có tinh dịch đồ bình thường theo WHO 2010 chiếm 45%. Đứt gãy DNA tinh trùng có mối tương quan với tỉ lệ di động tiến tới, vận tốc trung bình, bất thường hình thái ($p = 0,003 - 0,008 < 0,01$) tuy nhiên mức độ tương quan chỉ ở mức thấp. Đặc biệt 23,75% nam giới vô sinh có chỉ số tinh dịch đồ hoàn toàn bình thường nhưng có mức độ đứt gãy DNA tinh trùng ở mức trung bình và cao.

Liên quan đứt gãy DNA tinh trùng và sảy thai thai lưu

Trên 152 người chồng trong các cặp vợ chồng có tiền sử sảy thai, thai lưu, đứt gãy DNA tinh trùng chủ yếu thuộc nhóm trung bình và cao (DFI 15 - 30%: 40,8% và DFI > 30%: 39,5%). Số lần sảy thai, thai lưu của người vợ có mối tương quan tỷ lệ thuận với mức độ đứt gãy DNA tinh trùng người chồng ($p < 0,05$).

Liên quan đứt gãy DNA tinh trùng và thất bại hỗ trợ sinh sản

Trên 80 bệnh nhân nam giới thất bại trong hỗ trợ sinh sản, DFI trung bình là $34,0 \pm 24,9$ (%). Trong đó chủ yếu bệnh nhân nam có mức độ đứt gãy DNA tinh trùng trung bình hoặc cao (DFI 15 - 30% : 39%, DFI > 30%: 40%). Có sự khác biệt có ý nghĩa về DFI ở nam giới thất bại

HTSS trên 2 lần nam giới thất bại HTSS ≤ 1 lần ($p < 0,05$).

IV. BÀN LUẬN

Hoàn thiện quy trình pha chế bộ xét nghiệm xác định đứt gãy DNA tinh trùng

Xuất phát từ thực tế là các kĩ thuật hỗ trợ sinh sản đều rất tốn kém, nỗ lực tự sản xuất các bộ xét nghiệm với chất lượng tốt, hướng tới chăm sóc tốt hơn cho bệnh nhân là cần thiết. Bộ xét nghiệm của chúng tôi có ưu điểm là sử dụng các nguyên vật liệu sẵn có trong nước, không yêu cầu các trang thiết bị đắt tiền. Có hai cải tiến lớn trong bộ xét nghiệm này so với các tác giả trước đây. Một là giảm được thể tích DTT dùng trong dung dịch ly giải xuống 4 lần nhưng vẫn đảm bảo kết quả. Đây là bước quan trọng nhất để giảm giá thành xét nghiệm, vì DTT rất đắt. Việc này cũng làm giảm sự khó chịu khi thao tác cho kỹ thuật viên, do mùi của DTT rất nồng. Thứ hai là thay vì sử dụng SDS như các tác giả Nguyễn Thị Thúy An (2014)⁷ có nguy cơ gây mất đuôi tinh trùng số lượng lớn; chúng tôi sử dụng Triton X - 100 là dung dịch trung tính, có khả năng ly tách protein nhưng không làm biến tính protein của đuôi tinh trùng, giúp phân biệt được tinh trùng với các tế bào có nhân khác như bạch cầu, vi khuẩn có trong tinh dịch.

Kết quả xét nghiệm của bộ xét nghiệm tự pha với các tiêu chí về độ chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu đều đạt yêu cầu của một bộ xét nghiệm định lượng. Kết quả xác định đứt gãy DNA tinh trùng bằng bộ xét nghiệm tự pha so với bộ xét nghiệm thương mại Halosperm có tương quan mạnh, sự khác biệt là rất nhỏ, sai số hoàn toàn do ngẫu nhiên và không ảnh hưởng đến kết quả của bệnh nhân.

Liên quan đứt gãy DNA tinh trùng với bất thường sinh sản nam, sảy thai thai lưu, thất bại hỗ trợ sinh sản

Liên quan đứt gãy DNA tinh trùng với bất thường sinh sản nam

Đứt gãy DNA tinh trùng có tương quan thuận với bất thường hình thái, trong khi có tương quan nghịch với khả năng di động cũng như tốc độ di động của tinh trùng. Kết quả này tương đồng với các tác giả Cassuto N.G. (2012),⁸ cho thấy đứt gãy DNA tinh trùng chính là yếu tố dẫn đến suy giảm chất lượng tinh trùng, là nguyên nhân của bất thường sinh sản nam.

Đặc biệt, có đến 23,75% bệnh nhân có tinh dịch đồ hoàn toàn bình thường nhưng mức độ đứt gãy ADN trung bình hoặc cao. Đây là một cơ sở để chúng tôi tiến đến khuyến cáo xét nghiệm đứt gãy DNA tinh trùng thường quy ở những bệnh nhân vô sinh nam bên cạnh xét nghiệm cơ bản là tinh dịch đồ.

Liên quan đứt gãy DNA tinh trùng với sảy thai thai lưu

Trong nghiên cứu, nam giới mà vợ chồng có tiền sử sảy thai, thai lưu, tỷ lệ đứt gãy DNA tinh trùng mức độ trung bình và cao chiếm chủ yếu (80,3%). Đặc biệt ở nhóm sảy thai > 2 lần, 100% trường hợp BN thuộc nhóm đứt gãy trung bình và cao. Kết quả này tương đồng với Calini T. và cs (2017),⁹ Phạm Thị Xuân (2016).¹⁰ Đứt gãy DNA gây tổn thương bộ máy di truyền làm giảm khả năng tham gia tạo hợp tử của tinh trùng và gây đột biến nên tăng tỷ lệ sảy thai, thai lưu.

Liên quan đứt gãy DNA tinh trùng với thất bại hỗ trợ sinh sản

Cơ hội đậu thai giảm đi đáng kể ở những bệnh nhân có mức độ đứt gãy DNA tinh trùng cao. Nghiên cứu của các tác giả Avendano và cs (2009) cũng chỉ ra rằng khi mức DFI trên 20%, tỉ lệ có thai tự nhiên giảm dần và gần như bằng không khi DFI ở mức 30 - 40%.¹¹ Khi DFI > 30%, bệnh nhân cần được chỉ định làm các biện pháp hỗ trợ sinh sản như IVF/ICSI. Do đó giá trị của DFI được xem như là một yếu tố tiên lượng khả năng mang thai, giúp các bác sỹ lựa

chọn phương pháp hỗ trợ sinh sản phù hợp cho bệnh nhân.

V. KẾT LUẬN

Hoàn thiện thành công quy trình pha chế bộ xét nghiệm xác định đứt gãy DNA tinh trùng với độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu đạt yêu cầu và cho kết quả chính xác tương đương bộ xét nghiệm thương mại. Bộ xét nghiệm tự pha hoàn toàn có đủ khả năng có thể lưu hành trên thị trường.

Đứt gãy DNA tinh trùng có mối liên quan các bất thường sinh sản ở nam giới, tiền sử sảy thai, thai lưu và thất bại hỗ trợ sinh sản, tuy nhiên vẫn cần tiến hành các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn và phương pháp nghiên cứu phù hợp để làm rõ hơn các mối liên quan này.

Lời cảm ơn

Chân thành cảm ơn Bộ môn Y sinh học Di truyền, Trường Đại học Y Hà Nội đã giúp đỡ chúng tôi thực hiện nghiên cứu này. Nghiên cứu không có xung đột lợi ích với các tác giả khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sheena E., Lewis M., John A.R. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reproductive Biomedicine Online*. 2013;27(4):525 - 337.
2. Erenpreis J., Spano M., Erenpreisa J., et al . Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl*. 2006;8:11 - 29.
3. Agarwal A., Said T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*.

2003;9(4):331 - 345.

4. Sharma R.K., Said T., Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl*. 2004;6:139 - 148.

5. Duran E.H., Morshedi M., Taylor S., et al . Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Report*. 2002;17:3122 - 3128.

6. Fernandez J. L., Muriel L., Rivero M. T., et al . The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003;24(1):59 - 66.

7. Nguyễn Thị Thúy An. Kết quả so sánh chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng bằng kit Halosperm và quy trình SCD xây dựng tại Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản. Khoa Y, Đại học Quốc gia TPHCM, *Hội nghị IVF EXPERTS MEETING 10*, Vũng Tàu. 2014.

8. Cassuto N. G., Hazout A., Hammoud I., et al . Correlation between DNA defect and sperm - head morphology. *R Bio Onl*. 2012;24(2):211 - 218.

9. Carlini T., Paoli D., Pelloni M., al e. Sperm DNA fragmentation in Italian couples with recurrent pregnancy loss. *R Bio Onl*. 2017;34(1):58 - 65.

10. Phạm Thị Xuân. Đánh giá sự đứt gãy ADN của tinh trùng nam giới trong các cặp vợ chồng sảy thai, thai lưu. *Luận văn tốt nghiệp bác sỹ đa khoa*, Đại học Y Hà Nội. 2016.

11. Avendano C., Franchi A., Taylor S., et al. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2009;91(4):1077 - 1084.

Summary

SPERM DNA FRAGMENTATION: RESEARCH ON PRODUCING TEST KIT AND CLINICAL APPLICATION

Sperm DNA fragmentation directly affects reproductive health. Most kits for determining the level of sperm DNA fragmentation in our country today have to be imported with high prices. Therefore, we conducted this research with the purpose of producing a kit for domestic needs and determine DFI relationship with male reproductive abnormalities, miscarriage, stillbirth an assisted reproductive failure. The sample was the semen of 350 men who had reproductive health examination at Hanoi Medical University Hospital from August 2018 to August 2019. The research has successfully completed the production process of DFI test kit with satisfied accuracy ($CV \leq 5\%$, $t_{in} < t_c$), sensitivity of 96.91% and specificity of 97.10%. The ability to evaluate DFI is similar to the commercial Halosperm kit ($R = 0.995$; $p < 0.001$). The research also showed that DFI was negatively correlated with normal sperm motility and morphology ($p < 0.01$) and was associated with a history of miscarriage, stillbirth, and assisted reproductive failure.

Keywords: DFI, male infertility miscarriage, stillbirth a assisted reproductive failure, sperm.