

Nghiên cứu xây dựng quy trình đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng

Triệu Tiến Sang^{1*}, Trần Anh Đức², Trần Văn Khoa⁴, Nguyễn Hà Anh¹
Nguyễn Thị Thanh Nga¹, Nguyễn Thị Trang³

¹Bộ môn Sinh học và di truyền y học, Học viện Quân y

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Bộ môn Y sinh học - di truyền, Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 11/5/2018; ngày chuyển phản biện 15/5/2018; ngày nhận phản biện 13/6/2018; ngày chấp nhận đăng 20/6/2018

Tóm tắt:

Đứt gãy ADN tinh trùng hiện nay được biết đến là một trong những nguyên nhân chiếm tỷ lệ không nhỏ trong những ca điều trị vô sinh, khoảng 10% những bệnh nhân có kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ bình thường nhưng có mức độ đứt gãy ADN cao, giảm hiệu quả điều trị vô sinh. Phương pháp xét nghiệm đứt gãy ADN tinh trùng phổ biến nhất hiện nay là đếm số lượng tinh trùng sau xử lý với bộ Kit Halotech và thiết lập chỉ số đứt gãy ADN tinh trùng (DFI) để đánh giá nhằm tiên lượng cho các biện pháp hỗ trợ sinh sản. Nghiên cứu này nhằm mục đích xây dựng một quy trình phù hợp về thời gian và công thức các dung dịch xử lý mẫu từ hóa chất thô nhằm tiết kiệm về mặt tài chính so với việc sử dụng bộ Kit thương mại. Mẫu tinh dịch được xử lý song song bằng bộ Kit và phương pháp này để so sánh và đánh giá mức độ tin cậy. Kết quả thu được cho thấy, phương pháp này mang lại hiệu quả xử lý tương đối đồng nhất với kết quả nhận được từ bộ Kit.

Từ khóa: Đứt gãy ADN tinh trùng, hỗ trợ sinh sản, quy trình mới.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Vô sinh hiện nay là một vấn đề phổ biến và nhận được sự quan tâm ngày càng cao của xã hội. Theo thống kê, từ năm 1997 đến nay, trên toàn thế giới có khoảng 5% các cặp vợ chồng gặp những vấn đề vô sinh nghiêm trọng và chưa giải quyết được. Bên cạnh đó, khoảng 12 đến 28% các cặp đôi gặp khó khăn trong việc có con trong ít nhất 1 năm sau kết hôn [1]. Có khoảng 20-30% số ca được chuẩn đoán là do người chồng, 20-35% là do người vợ và 25-40% là do cả hai, trong đó có khoảng 10-20% không xác định được nguồn nguyên nhân [2]. Tỷ lệ vô sinh theo thống kê của các nhà nghiên cứu trên thế giới ở các thời điểm khác nhau là khác nhau. Theo thống kê trên thế giới tỷ lệ vô sinh chiếm 8-18%, cũng có nghiên cứu thống kê lên tới 40% [3]. Những nghiên cứu gần đây cho thấy, cứ 6 cặp vợ chồng lại có một cặp có vấn đề về khả năng sinh sản. Ở Australia, theo nghiên cứu của Kildea (2000), tỷ lệ vô sinh chiếm 26,3% ở nam giới độ tuổi 20-45, còn tại Mỹ theo Wyshak (2001) tỷ lệ này là 17,1% [4], trong khi ở giai đoạn 2006-2010 là 9,4% ở nam giới độ tuổi 15-44 và 12% ở độ tuổi 25-44 [5].

Theo A. Hellani và cs (2006) [6], ở Ả Rập có khoảng

10-15% cặp vợ chồng vô sinh, trong đó nguyên nhân do nam giới chiếm tỷ lệ 50%. Vấn đề vô sinh cho đến nay còn rất phổ biến ở nhiều nước trên thế giới. Tỷ lệ vô sinh trên thế giới có xu hướng ngày càng gia tăng [7]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, có gần 48,5 triệu cặp vợ chồng trên thế giới không thể có con sau 5 năm điều trị [8].

Ở Việt Nam, theo một nghiên cứu trên toàn quốc do Bệnh viện Phụ sản Trung ương và Trường Đại học Y Hà Nội tiến hành với 14.300 cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh đẻ đại diện cho 8 vùng sinh thái cho thấy, tỷ lệ vô sinh của dân số Việt Nam đang ở mức 7,7%. Bên cạnh đó, có đến 50% cặp đôi vô sinh có độ tuổi dưới 30. Đây là những con số rất đáng báo động vì tỷ lệ vô sinh đang gia tăng rất nhanh theo thời gian [9].

Hiện nay để xét nghiệm vô sinh với nam giới, bệnh nhân thường được chỉ định xét nghiệm tinh dịch đồ. Đây là xét nghiệm cần thiết, không quá phức tạp cũng như không tốn kém để đánh giá sơ bộ khả năng sinh sản của nam giới. Xét nghiệm tinh dịch đồ có thể cho biết các chỉ số như mật độ tinh trùng, tỷ lệ sống, tỷ lệ di động, hình thái của tinh trùng... Tuy nhiên, hiện nay có nhiều trường hợp có kết quả tinh dịch đồ bình thường nhưng vẫn bị vô sinh. Nhiều

*Tác giả liên hệ: Email: trieuangsang83@yahoo.com.vn

Building a procedure for testing level of sperm DNA fragmentation

Tien Sang Trieu¹, Anh Duc Tran², Van Khoa Tran¹,
Ha Anh Nguyen¹, Thi Thanh Nga Nguyen¹,
Thi Trang Nguyen³

¹Department of Biology and Medical Genetic, Military Medical University

²Faculty of Biology, University of Natural Sciences, Vietnam National University, Ha Noi

³Department of Medical Biology and Genetic, Ha Noi Medical University

Received 11 May 2018; accepted 20 June 2018

Abstract:

DNA fragmentation is known as a common reason contributing a noticeable proportion in infertility treatment, approximately 10% of patients who have normal semen parameters possesses a high level of DNA fragmentation which significantly reduces infertility treatment effect. The most common method of testing is counting number of sperm processed by Halotech Kit and then setting up DNA fragmentation index (DFI) to evaluate and anticipate useful assisted reproductive technology. This research worked on building up a suitable process of timing and required chemical solution formula from raw separated chemicals to reduce financial cost compared with the commercial Kit. Samples were handled parallel by this working process and the given DNA Halotech Kit to compare and evaluate reliability. Results exhibited that this method brought up a processing effect in similar pattern with the commercial Kit.

Keywords: Assisted reproduction, new procedure, sperm DNA fragmentation.

Classification number: 3.2

ngiên cứu đã chỉ ra rằng, không chỉ những đặc điểm hình thái của tinh trùng đóng góp vào khả năng thụ tinh mà còn bao gồm cả những đặc tính về mặt vật chất di truyền [10].

Đứt gãy ADN tinh trùng là một trong những rối loạn vật chất di truyền dẫn tới khả năng thụ tinh kém, thai kém phát triển hoặc thai dị tật bẩm sinh, dễ sảy thai. Thông thường trong trạng thái tự nhiên, đứt gãy ADN thường liên quan đến các rối loạn trong hoạt động chết theo chương trình hoặc do sự thành thực không thành công của tế bào tinh

trùng. Bên cạnh đó, các yếu tố bên ngoài cơ thể như chế độ dinh dưỡng, hút thuốc, trầm cảm, ma túy, độ tuổi... cũng là những nguyên nhân gây ra đứt gãy ADN tinh trùng. Cơ chế chính của đứt gãy ADN tinh trùng bao gồm: 1) Quá trình tái tổ hợp không hoàn chỉnh khi hình thành tinh trùng; 2) Bất thường trong quá trình đóng gói chất nhiễm sắc của tinh trùng; 3) Lỗi trong quá trình chết theo chương trình của tế bào; 4) Tác động oxy hoá bất lợi [11-15].

Người ta ước tính rằng, khoảng 25% bệnh nhân nam vô sinh có mức độ đứt gãy ADN tinh trùng cao [16]. Có rất nhiều mối liên hệ giữa đứt gãy ADN tinh trùng và kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ. Nam giới với kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ cho tinh trùng có khả năng di động kém thường có tỷ lệ đứt gãy ADN tinh trùng cao [17]. Tuy nhiên, tại Việt Nam, khoảng 10% bệnh nhân vô sinh có kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ bình thường có vấn đề với đứt gãy ADN tinh trùng [18]. Đứt gãy ADN tinh trùng có hậu quả đặc biệt nghiêm trọng trong việc điều trị vô sinh do làm giảm khả năng thụ tinh và chất lượng phôi thai [19, 20]. 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 để có được một đứa con là rất thấp. Để đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng, người ta sử dụng chỉ số DFI làm thông số chuẩn, với: DFI <15% là tỷ lệ đứt gãy ADN tinh trùng thấp; DFI 15-30% là tỷ lệ đứt gãy ADN tinh trùng trung bình; DFI >30% là tỷ lệ đứt gãy ADN tinh trùng cao [21, 22].

Tỷ lệ đứt gãy này càng cao thì khả năng có con sau khi sử dụng các phương pháp hỗ trợ sinh sản càng thấp. Do đó, xét nghiệm đứt gãy ADN tinh trùng có vai trò vô cùng quan trọng vì chi phí cho các phương pháp hỗ trợ sinh sản là tương đối cao.

Trong xét nghiệm đứt gãy ADN tinh trùng có rất nhiều phương pháp đánh giá đứt gãy đã được xây dựng và công bố như: Sử dụng chất nhuộm acridine orange (AO), khảo sát cấu trúc chromatin tinh trùng (Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA), sử dụng chất nhuộm aniline blue (AB), sử dụng chất nhuộm toluidine blue (TB), đánh dấu đứt gãy ADN bằng các dUTP (Terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling - TUNEL), điện di tế bào đơn (COMET).

Phương pháp xét nghiệm phổ biến nhất hiện nay là khảo sát mức độ phân tán chất nhiễm sắc của tinh trùng (Sperm Chromatin Dispersion - SCD) được xây dựng bởi C. Wegner [22] do đây là phương pháp đơn giản, dễ thực hiện với chi phí thấp so với những phương pháp khác và hiệu quả cao, phù hợp với điều kiện hiện nay. Tuy nhiên, chi phí cho xét nghiệm này ở nước ta hiện còn tương đối cao do phải nhập khẩu bộ Kit xử lý từ nước ngoài. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi đề xuất "Nghiên cứu xây dựng quy trình đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng" theo

phương pháp SCD cho kết quả tương đương bộ Kit với độ tinh cậy cao nhưng giá thành rẻ hơn.

Vật liệu và phương pháp

Thu thập mẫu

Mẫu tinh trùng được thu nhận từ Bệnh viện Nam học và hiếm muộn Hà Nội và Trung tâm Mô phôi - Học viện Quân y. Tinh dịch cần được lấy bằng tay sau khi vệ sinh bộ phận sinh dục (như thủ dâm). Không được dùng bao cao su vì trong bao cao su có thể chứa chất diệt tinh trùng. Mẫu thu nhận cần được xử lý trong vòng 1 giờ để đảm bảo kết quả xét nghiệm tốt nhất. Trong trường hợp cần lưu mẫu lâu dài, có thể sử dụng hóa chất bảo quản cung cấp cùng bộ Kit.

Hóa chất và dụng cụ

Hóa chất. Bộ kit Halosperm (bao gồm dung dịch lysis, dung dịch acid HCl, agarose, lame kính); nước cất, PBS; cồn 70 độ, cồn 90 độ, cồn 100 độ; dung dịch Giemsa 30%; các loại hóa chất khác gồm NaCl, EDTA, Tris base, Sodium N-Lauroyl Sarcosine (SLS), Dithiothreitol (DTT).

Máy móc và dụng cụ. Pipet, đầu côn, khay ngâm lam; lò vi sóng, tủ lạnh, cân điện tử; kính hiển vi quang học độ phóng đại 40X; máy đo pH.

Xử lý mẫu với bộ Kit Halosperm Test Kit (Hãng Halotech, Anh)

Mẫu tinh dịch sau khi thu nhận và bảo quản được xử lý với bộ Kit Halosperm [23] theo quy trình như sau:

Bước 1 - Chuẩn bị thạch: Đun agarose 1% trong lò vi sóng 3 phút, cho đến khi hóa lỏng hoàn toàn agarose, mỗi eppendorf chứa 100 μ l thạch agarose được sử dụng đo độ đứt gãy ADN cho một mẫu tinh dịch. Pha loãng mẫu tinh dịch bằng dung dịch PBS sao cho nồng độ khoảng 10 triệu tinh trùng/ml tinh dịch. Giữ ống agarose ở nhiệt độ 92°C bằng máy vi eppendorf.

Bước 2 - Chuẩn bị hỗn hợp tinh dịch - thạch: Cho 30 μ l tinh dịch vào ống 100 μ l agarose và trộn đều bằng pipet. Nhanh chóng thực hiện bước kế tiếp, tránh agarose bị đông. Nhỏ một giọt 30 μ l hỗn hợp tinh dịch - thạch lên vị trí được khoan tròn trên lam kính, đặt nhẹ, ấn nhẹ, tránh bọt khí xuất hiện. Lam kính được đặt nằm ngang trong suốt quá trình thao tác. Đặt tiêu bản vào tủ lạnh 4°C trong 20 phút để agarose đông lại.

Bước 3 - Sau khi hỗn hợp tinh dịch - thạch đông lại: Lấy tiêu bản ra khỏi tủ lạnh, bỏ lam kính bằng cách trượt nhẹ ra, để tiêu bản ở nhiệt độ phòng trong 3-5 phút cho đến khi khô hoàn toàn.

Bước 4 - Biến tính ADN tinh trùng bằng dung dịch biến

tính từ bộ Kit: Đặt tiêu bản vào khay chứa dung dịch biến tính trong vòng 7 phút.

Bước 5 - Ly giải (lysis) tế bào: Lấy tiêu bản từ dung dịch biến tính và đặt vào khay chứa 10 ml dung dịch lysis trong 25 phút.

Bước 6 - Rửa dung dịch lysis: Sau khi kết thúc bước lysis, đặt tiêu bản vào khay chứa nước cất trong 5 phút để rửa dung dịch lysis.

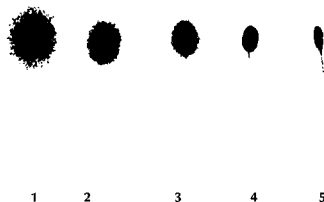
Bước 7 - Khử nước: Khử nước bằng cách lần lượt cho tiêu bản vào dung dịch cồn 70, 90 và 100% trong vòng 2 phút mỗi dung dịch, sau đó để khô tự nhiên.

Bước 8 - Nhuộm tiêu bản: Đặt tiêu bản nằm ngang, nhỏ dung dịch Giemsa 30% phủ lên trên bề mặt tiêu bản, để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút rồi rửa qua nước từ vòi, chú ý tránh rửa quá mạnh làm nhạt màu quảng halo.

Bước 9 - Đánh giá kết quả: Quan sát lam kính dưới kính hiển vi quang học, đếm ít nhất 500 tế bào tinh trùng có đuôi trong tinh dịch để xác định độ đứt gãy ADN của tinh trùng. Độ đứt gãy ADN tinh trùng được xác định bằng quảng halo của tinh trùng theo Fernandez và cs (hình 1).

TT không bị phân mảnh ADN

TT bị phân mảnh ADN



Hình 1. Tiêu chí phân loại tinh trùng (TT) sau khi xử lý [23]. 1: Tinh trùng có quảng halo lớn (big halo). Kích thước quảng halo $\geq$ đường kính ngang của nhân; 2: Tinh trùng có quảng halo vừa (medium halo): $1/3$ đường kính ngang của nhân $<$ kích thước quảng halo $<$ đường kính ngang của nhân; 3: Tinh trùng có quảng halo nhỏ (small halo): Kích thước quảng halo $\leq 1/3$ đường kính ngang của nhân; 4: Tinh trùng không có quảng halo (without halo); 5: Tinh trùng thoái hoá (degraded). Tinh trùng có nhân bất màu kém, không đều.

Xử lý mẫu với phương pháp nghiên cứu

Bước 1: Chuẩn bị mẫu, quan sát mẫu trực tiếp dưới kính hiển vi và pha loãng nếu cần thiết với dung dịch PBS (tới khi đạt mật độ 10-20 tinh trùng/vi trường hiển vi).

Bước 2: Chuẩn bị gel agarose 1%, đun trong lò vi sóng trong 3 phút tới khi hóa lỏng hoàn toàn. Lấy 100 μ l agarose

vào ống eppendorf, ủ trong máy ủ eppendorf tới 96°C.

Bước 3: Mix đều 30 µl mẫu vào ống eppendorf: Nhanh tay thực hiện để tránh bị đông gel.

Bước 4: Trãi đều 30 µl hỗn hợp đã mix lên lam kính, đập lamen và làm lạnh ở 4°C trong 30 phút.

Bước 5: Bóc lamen bằng cách miết nhẹ, ngâm lam trong denature solution trong 6 phút.

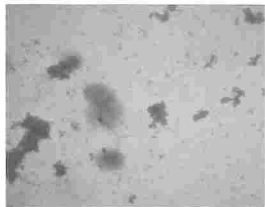
Bước 6: Loại bỏ denature solution, ngâm mẫu trong lysis solution trong 16 phút.

Bước 7: Rửa denature solution bằng cách ngâm trong nước 5 phút.

Bước 8: Khử nước bằng cồn trong 5 phút. Sau đó để khô tự nhiên.

Bước 9: Nhuộm tiêu bản bằng Giemsa (pha loãng tỷ lệ 1:2) trong 17 phút, rửa Giemsa với nước và để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng.

Bước 10: Soi tiêu bản và đếm tỷ lệ tinh trùng dưới kính hiển vi. Đếm ít nhất 500 tinh trùng để xác định độ đứt gãy ADN. Tiêu chuẩn đánh giá được xác định bằng quảng Halo theo Fernandez và cs [23] (hình 2).



Hình 2. Tinh trùng bị ly giải màng tế bào do xử lý lysis solution trong 17 phút.

Thống kê số lượng và so sánh tiêu bản

Các mẫu được xử lý với bộ Kit và phương pháp nghiên cứu được đếm số lượng tinh trùng theo tiêu chuẩn, sau đó được thống kê số lượng và so sánh với phương pháp thống kê sinh học bằng Microsoft Excel. Sau khi tính chỉ số DFI, hai dãy chỉ số này của 40 mẫu đã xử lý được kiểm tra sai số phương sai và áp dụng phương pháp kiểm định t-test với phương sai không bằng nhau.

Kết quả và bàn luận

Kết quả

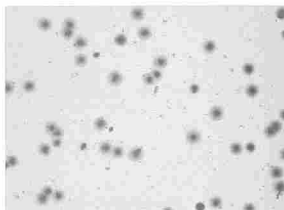
Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng được quy

trình mới dựa trên nền tảng quy trình cung cấp cùng bộ Kit. Các bước xử lý đều được kiểm tra và thử nghiệm với các mốc thời gian khác nhau nhằm tìm ra thời gian phù hợp mới với các loại dung dịch hóa chất được nghiên cứu của chúng tôi.

Quy trình xử lý gồm hai dung dịch chính là denature solution và lysis solution. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tham khảo và xây dựng công thức pha hóa chất phù hợp cho hai dung dịch trên [6] được trình bày như sau:

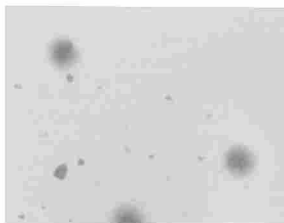
Dung dịch denature solution: HCl pha loãng (pha 80 µl HCl với 10 ml nước cất để thu được dung dịch denature solution).

Dung dịch lysis solution: 1,25M NaCl, 50mM EDTA, 100mM Tris base, điều chỉnh pH đến 10, thêm 0,01% SLS, 2 mg/ml DTT, bảo quản lạnh.



Hình 3. Tinh trùng được xử lý 6 phút với denature solution và 16 phút với lysis solution.

Chúng tôi đã thử nghiệm và đưa ra mức đề xuất thời gian xử lý với 2 dung dịch trên gồm 6 phút với denature solution và 16 phút với lysis solution (hình 3). Bất kỳ xử lý nào nhiều hơn ít nhất 1 phút so với mức đề xuất trên sẽ cho kết quả tinh trùng bị ly giải màng tế bào hoặc đứt đuôi số lượng lớn (hình 2 và 4).



Hình 4. Tinh trùng bị đứt đuôi số lượng lớn.

Bàn luận

Đối với dung dịch denature solution (bản chất là HCl pha loãng), chúng tôi đã tham khảo về ảnh hưởng của việc tiền xử lý với dung dịch có tính acid đối với tình trạng xét nghiệm SCD. Trong nghiên cứu của Fernandez và cs, việc xử lý với dung dịch có tính acid trước khi ly giải giúp phân biệt rõ ràng sự khác nhau ở quãng Halo của tình trạng đứt gãy và không đứt gãy. Nghiên cứu này đã khẳng định vai trò của dung dịch acid loãng trong xét nghiệm đứt gãy ADN.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình xử lý Sperm Chromatin Dispersion với hiệu quả tương đương như bộ Kit nhưng có giá thành rẻ hơn rất nhiều, góp phần làm giảm chi phí xét nghiệm đứt gãy ADN tình trạng. Như trình bày, có thể thấy không có quá nhiều sự khác biệt về kích thước và chất lượng quãng Halo giữa tiêu bản xử lý bằng bộ Kit và bằng phương pháp nghiên cứu này (hình 5 và 6).



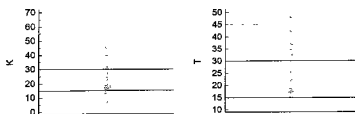
Hình 5. Tiêu bản được xử lý bằng bộ Kit.

Để kiểm chứng lại bằng số liệu thực tế, các mẫu sau khi được xử lý với hai phương pháp trên được đếm số lượng tình trạng theo tiêu chí trình bày ở hình 1 tối thiểu 500 tế bào tính trung.

Chỉ số DFI được sử dụng như tiêu chí so sánh giữa hai phương pháp vì nó thể hiện tỷ lệ giữa số lượng tình trạng có ADN bị đứt gãy và tổng số tình trạng. Sau đó số liệu được thống kê số lượng và xử lý với phương pháp kiểm định thống kê sinh học. Chỉ số DFI được tính như sau:

$$DFI = \frac{\text{Halo nhỏ} + \text{Không có Halo} + \text{Bị ly giải}}{\text{Tổng}} (\%)$$

Mẫu được thống kê số lượng theo tiêu chí trình bày ở hình 1 với hai phương pháp (K - Tiêu bản xử lý bằng bộ Kit; T - Tiêu bản xử lý bằng phương pháp nghiên cứu). Phân bố dữ liệu được thống kê trong hình 7.



Hình 7. So sánh phân bố dữ liệu số lượng hai phương pháp.

Bảng 1. Tiêu bản xử lý với hai phương pháp được đếm số lượng tình trạng theo tiêu chí đã trình bày và thống kê số lượng.

STT	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K
1	154	237	134	59	93	43	83	51	36	110
2	233	323	105	33	23	20	43	26	96	98
3	314	241	99	143	33	42	26	31	28	43
4	145	124	114	74	47	12	34	46	160	244
5	290	345	73	57	23	24	3	25	111	49
6	229	208	87	116	26	7	17	36	141	133
7	235	236	153	88	45	21	23	15	44	140
8	203	189	121	81	26	53	44	52	106	125
9	252	254	83	49	25	18	17	45	123	134
10	286	299	51	20	7	13	18	29	138	139
11	280	305	121	40	26	10	15	18	58	127
12	335	237	91	171	10	39	6	14	58	39
13	332	346	40	94	14	10	50	2	64	48
14	360	273	66	70	12	33	10	24	52	100
15	316	228	78	118	20	63	26	21	60	70
16	301	275	90	87	23	10	21	46	65	82
17	303	310	72	70	14	11	23	20	88	89
18	374	320	40	60	12	10	2	2	72	108
19	297	303	81	40	17	11	15	22	90	124
20	333	270	46	75	18	27	15	38	88	90
21	304	259	82	151	28	28	23	11	63	51
22	233	214	106	102	23	61	43	35	95	88
23	215	329	178	81	27	29	13	7	67	54
24	398	202	24	21	18	5	9	10	51	262
25	284	238	30	47	3	23	8	17	175	175
26	323	305	49	11	3	3	24	10	101	171
27	181	228	176	108	15	15	17	11	111	138
28	329	311	75	41	21	32	26	9	49	107
29	337	311	61	99	30	17	15	1	57	72
30	368	344	36	78	3	20	18	12	75	46
31	411	390	14	11	2	5	4	0	69	94
32	386	357	22	79	1	1	6	1	85	62
33	311	240	80	127	14	11	14	17	81	105
34	349	367	44	49	4	13	6	9	97	62
35	405	250	18	152	1	6	3	9	73	83
36	329	310	86	113	26	21	17	32	42	24
37	374	397	40	37	9	9	33	28	44	29
38	288	371	123	40	23	3	15	5	51	81
39	381	393	30	22	9	6	44	63	36	16
40	413	421	15	42	5	3	7	17	60	17

Vì $P(\text{Ftest})$ bằng $0,0228 < 0,05$ nên phương pháp kiểm định t-test với phương sai không bằng nhau được sử dụng.

Vì t Critical two-tail > t Stat nên giả thiết H_0 được chấp nhận

Kiểm định với đầy DFI

Đặt H_0 là Sai khác giữa hai dãy số không mang ý nghĩa thống kê

t-Test Two-Sample Assuming Unequal Variances

	Variable 1	Variable 2
Mean	23,875	27,42
Variance	66,945	140,5638923
Observations	40	40
Hypothesized Mean Difference	0	
df	69	
t Stat	-1,556424607	
P(T<=t) one-tail	0,062091154	
t Critical one-tail	1,667238549	
P(T<=t) two-tail	0,124182309	
t Critical two-tail	1,994945415	

Vì t Critical two-tail > t Stat nên giả thiết H_0 được chấp nhận

Hình 8. Kết quả kiểm định phương sai của hai phương pháp.

Như kết quả thống kê, có thể kết luận được rằng sau khi kiểm tra với số lượng tình trùng và chỉ số DFI, không thấy có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa hai phương pháp này (bảng 1, hình 8). Do đó, phương pháp nghiên cứu của chúng tôi có tiềm năng cao thay thế cho bộ Kit nhằm tiết kiệm chi phí xét nghiệm.

Kết luận

Đã xây dựng thành công quy trình đánh giá mức độ đứt gãy ADN tình trùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] W. Himmel, et al. (1997), "Voluntary Childlessness and being Childfree", *British Journal of General Practice*, **47**(415), pp 111-118.
- [2] ART fact sheet (2014), *European Society of Human Reproduction and Embryology*.
- [3] Nguyễn Liêu (1998), "Mấy nét bàn về vô sinh", *Tạp chí Nghiên cứu y học*, **7**, pp.28-39.
- [4] G. Whysahl (2001), "Infertility in American college alumnae", *Int. J. Gynaecology Obstet.*, **73**(3), pp.237-242
- [5] A. Chandra, et al. (2013), "Infertility and Impaired Fecundity in the United States, National Survey of Family Growth", *Natl. Health Stat. Report.*, **14**(67), pp.1-18.
- [6] A. Hellani, S. Hassan (2006), "Y chromosome microdeletions in infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia", *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction*, doi:10.1186/1743-1050-3-1.
- [7] S. Tan, H. Jacobs (1999), *Hỏi đáp vô sinh*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội (Trần Thị Phương Mai dịch)
- [8] M. Mascarenhas, et al. (2012), *National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990 A Systematic Analysis of 227 Health Surveys*, WHO.

[9] Bệnh viện Phụ sản Trung ương (2009), *Nghiên cứu thực trạng vô sinh ở Việt Nam theo các vùng sinh thái*.

[10] Sheena Lewis (2013), "The place of sperm DNA fragmentation testing in current day fertility management", *Middle East Fertility Society Journal*, **18**(2), pp.78-82.

[11] J. Erenpreiss, et al. (2006), "Sperm chromatin structure and male fertility. biological and clinical aspects", *Asian J. Androl.*, **8**(1), pp.11-29.

[12] H. Azita, et al. (2009), "Sperm chromatin integrity: Etiologies and Mechanisms of Abnormality, Assays, Clinical Importance, Preventing and Repairing Damage", *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, **1**(3), pp.147-160.

[13] A. Roxani, P. Konstantina, M. Pavlos (2007), "Spermatozoa sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA", *Reproductive Biology and Endocrinology*, **30**, pp.5-36.

[14] T. Said, et al. (2004), "Role of Caspases in male infertility", *Hum. Reprod. Update*, **10**(1), pp.39-51.

[15] T. Kelton (2008), "Oxidative stress and male infertility a clinical perspective", *Human Reproduction Update*, **14**(3), pp.243-258.

[16] E. Duran, et al. (2002), "Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: A prospective cohort study", *Human Reproduction Update*, **17**(12), pp.3122-3128

[17] S. Belloc, et al. (2014), "Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation", *The Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **31**(5), pp.527-532

[18] Phan Hoan (2015), *Đánh giá tỷ lệ đứt gãy ADN tình trùng ở nam giới vô sinh*, Bộ môn Y sinh học - di truyền, Trường Đại học Y Hà Nội.

[19] L. Muriel, et al. (2006), "Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection", *Fertil Steril.*, **85**(2), pp.371-383.

[20] L. Muriel, et al. (2006), "Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination. A blind prospective study", *Human Reproduction*, **21**(3), pp.738-744.

[21] D. Evenson, et al. (2002), "Sperm chromatin structural assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques", *Journal of Andrology*, **23**(1), pp.25-43.

[22] C. Wegner (2001), *Your insider's guide to high tech infertility treatments and taking back control of your healthcare*, Fertility Lab Insider.

[23] J. Fernandez, et al. (2003), "The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation", *Journal of Andrology*, **24**(1), pp 59-66