

MỐI LIÊN QUAN GIỮA CÁC ĐỘT BIẾN GEN NAT2 VÀ GSTP1 VỚI VÔ SINH NAM NGUYÊN PHÁT VÀ STRESS OXY HÓA

Vũ Thị Huyền*, Nguyễn Thị Trang*, Trần Đức Phần*

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Đột biến gen chuyển hóa xenobiotic (gen GSTP1 và NAT2) là một trong những nguyên nhân gây vô sinh ở nam giới. Stress oxy hóa cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng tới khả năng sinh sản. Đề tài tiến hành với mục tiêu mô tả một số đột biến gen NAT2 và GSTP1 ở nam giới vô sinh nguyên phát và mối liên quan giữa đột biến gen này với mức độ stress oxy hóa ở nam giới vô sinh nam nguyên phát. **Phương pháp nghiên cứu:** DNA của 200 đối tượng nghiên cứu (100 nam giới vô sinh nguyên phát và 100 người bình thường) được xác định đột biến gen bằng kỹ thuật ARMS - PCR. Chọn ngẫu nhiên 35/100 mẫu tinh dịch của nam giới bình thường và 35/100 mẫu tinh dịch của nam giới có ít nhất một đột biến của hai gen NAT2 và (hoặc) GSTP để xác định mức độ stress oxy hóa bằng kit Oxysperm. **Kết quả nghiên cứu:** Các kiểu gen CT + TT của gen NAT2 (481C>T), (OR, 95% CI: 3,12, 95% (CI): 1,72-5,68, p<0,001) và GA + AA của NAT2 (590 G>A)), (OR, 95% CI: 2,34, 95% (CI): 1,27-4,31, p<0,001). Kiểu gen GA + AA của gen GSTP1 (313G>A), (OR, 95% CI: 5,25, 95% (CI): 2,71-10,19, p<0,001) và CT + TT của gen GSTP1 (341C>T), (OR, 95% CI: 12,36, 95% (CI): 4,19 - 36,49, p<0,001) có liên quan với vô sinh nam nguyên phát và tăng mức độ stress oxy hóa.

Từ khóa: GSTP1, NAT2, xenobiotics, vô sinh nam, đột biến, stress oxy hóa.

SUMMARY

IDENTIFICATION OF POLYMORPHISM OF NAT2, GSTP1 GENES AND PRIMARY INFERTILE MEN, OXIDATIVE STRESS

Introduction: Mutation of GSTP1 and NAT2 gene could reduce xenobiotics metabolism, which increases oxidation and causes chronic diseases including infertility. Oxidative stress is a common pathology seen in approximately half of all infertile men. This study aimed to describe some of the mutations of the NAT2 and GSTP1 genes and the association between these mutations and the oxidative stress level in primary male infertility. **Material and Methods:** A total 200 DNA samples (100 infertile patients and 100 fertile men) were genotyped for the polymorphisms by ARMS - PCR. Randomly selected 70 samples of seminal plasma (35 samples of infertile men and 35 samples of

normal men) from 200 subjects were studied to determine the level of oxidative stress with Oxysperm kit (Halotech, Spain). **Results:** There was a significant association between the NAT2 variant genotypes (CT + TT (NAT2 (481C>T)), (OR, 95% CI: 3,12, 95% (CI): 1,72-5,68, p<0,001)) and GA + AA (NAT2 (590 G>A)), (OR, 95% CI: 2,34, 95% (CI): 1,27-4,31, p<0,001) and/or NAT2 variant genotypes (GA+AA) (GSTP1 (313G>A), (OR, 95% CI: 5,25, 95% (CI): 2,71-10,19, p<0,001)) and CT + TT (GSTP1 (341C>T)), (OR, 95% CI: 12,36, 95% (CI): 4,19 - 36,49, p<0,001)) with idiopathic infertility risk. Our findings also rate the significance of the effect of GSTP1 and/or NAT2 in modulating the risk of male infertility in males from Viet Nam. The level of oxidative stress is high in patients carrying these mutations. **Conclusions:** This pilot study found, as far as is known for the first time, that the polymorphisms GSTP1 (313G>A) and (341C>T); NAT2 (481C>T) and (590 G>A) were some novel genetic markers for susceptibility to idiopathic male infertility, but the risk is potentiated by exposure to various environmental oxidants.

Keyword: GSTP1, NAT2, xenobiotics, infertile men, mutation, stress oxidatives.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vô sinh là tình trạng bệnh lý gặp ở 12%-15% cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh sản. Vô sinh nói chung và vô sinh nam giới nói riêng ngày càng ảnh hưởng lớn tới chất lượng cuộc sống. Xenobiotics là các chất không có nguồn gốc từ sinh vật, trong đó có nhiều chất có hại với sức khỏe con người, có thể là nguyên nhân gây vô sinh. Glutathione S transferase P1 (GSTP1) và N-acetyl-transferase 2 (NAT2) là các gen mã hóa cho enzym có vai trò quan trọng trong chuyển hóa, đào thải xenobiotics, chuyển hóa xenobiotic ở giai đoạn II thành dạng không độc để đào thải ra ngoài [1]. Stress oxy hóa (Oxidative Stress, OS) là hậu quả của sự mất cân bằng giữa sự hình thành các gốc tự do có oxy (Reactive Oxygen Species, ROS) và cơ chế chống oxy hóa của cơ thể. Đột biến các gen GSTP1 và NAT2 làm cho quá trình chuyển hóa xenobiotics không tốt, gây tăng gốc tự do và tăng stress oxy hóa. Vì vậy nghiên cứu mối liên quan giữa các gen chuyển hóa xenobiotics với stress oxy hóa là cần thiết đặc biệt có ý nghĩa để có biện pháp điều trị thích hợp [2]. **Mục tiêu nghiên cứu:**

1. Mô tả một số đột biến gen NAT2 và GSTP1 ở nam giới vô sinh nguyên phát.

2. Xác định mối liên quan giữa một số đột biến gen NAT2 và GSTP1 với vô sinh nam và mức độ stress oxy hóa.

*Trường Đại Học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Vũ Thị Huyền

Email: drhuyenvu@gmail.com

Ngày nhận bài: 29.10.2017

Ngày phản biện khoa học: 15.12.2017

Ngày duyệt bài: 25.12.2017

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: Bệnh nhân nam vô sinh không rõ nguyên nhân trong độ tuổi sinh sản đã làm xét nghiệm tinh dịch đồ tại Trung tâm tư vấn-Di truyền, trường Đại học Y Hà Nội từ năm 2015-2017.

Tiêu chuẩn lựa chọn:

Nhóm bệnh: 100 nam giới vô sinh không có tinh trùng hoặc ít tinh trùng (<15 triệu, WHO 2010).

Nhóm chứng: 100 nam giới khỏe mạnh đã có ít nhất một con.

Tiêu chuẩn loại trừ: Nam giới vô sinh có kết quả tinh dịch đồ bình thường, do viêm cơ quan sinh dục, giãn tĩnh mạch tinh, tắc nghẽn đường sinh dục, mất đoạn nhỏ trên NST Y, nhiễm sắc đồ bất thường, bị các bệnh ung thư, cấp tính, tâm thần...

2.2. Phương pháp nghiên cứu: Mẫu DNA được tách chiết từ máu ngoại vi (chống đông EDTA) bằng kit tách DNA Express (Lytech, Nga). Sử dụng kỹ thuật ARMS-PCR để xác định các đa hình gen GSTP1 (341C>T (A114V), 313 G>A (I105V)) và NAT2 (481C>T (L161L), 590G>A (R197Q)) với trình tự mỗi được sản xuất bởi bộ kit thường mại.

Kỹ thuật ARMS - PCR thực hiện với thể tích 50 µl phản ứng có chứa 5µl (50-100 ng) ADN di truyền, trong mỗi ống (allen bình thường hoặc

allen đột biến) 17,5µl đệm PCR, 2,5µl primer mix (mỗi bình thường hoặc mỗi đột biến), 0,2 Taq DNA polymerase và 25µl đầu khoảng (Lytech, Nga) với chu trình luân nhiệt: 93°C-1 phút; 35 chu kì (93°C - 10s, 64°C - 10s, 72°C - 20s), 72°C - 10 phút. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên thạch agarose 3% để xác định kiểu gen của các đối tượng nghiên cứu.

Mẫu tinh dịch đồ của 35 bệnh nhân nhóm bệnh (có ít nhất 1 đột biến gen NAT2 và (hoặc) GSTP1) và 35 bệnh nhân nhóm chứng không có đột biến gen nào được xác định mức độ stress oxy hóa bằng kit Oxysperm của hãng Halotech. Kết quả xác định mức độ stress oxy hóa được chia làm 4 mức: Mức 1 (màu trắng) - mức độ stress oxy hóa thấp; Mức 2 (màu hồng) - mức độ stress oxy hóa trung bình thấp; Mức 3 (màu xanh tím) - mức độ stress oxy hóa trung bình cao; Mức 4 (màu đen) - mức độ stress oxy hóa cao.

2.3. Xử lý số liệu: Số liệu được thu thập và xử lý trên phần mềm SPSS 16.0.

2.4. Đạo đức nghiên cứu: bệnh nhân hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu và có quyền rút khỏi nghiên cứu khi không đồng ý. Bệnh nhân sẽ được thông báo về kết quả xét nghiệm gen. Các thông tin cá nhân được đảm bảo bí mật.

III. KẾT QUẢ

3.1 Kết quả phân tích đột biến gen NAT2 và GSTP1 ở nhóm bệnh và nhóm chứng

Bảng 1: Các đột biến gen NAT2 ở nhóm bệnh và nhóm chứng

NAT2 polymorphism	Nhóm vô sinh (n = 100)	Nhóm chứng (n = 100)	χ^2 (p)	OR	95% CI
481C>T (L161L)					
CC	49 (59%)	75 (75%)	14,35 (0,0008)	0,32	0,18 - 0,58
CT	51 (51%)	25 (25%)		3,12	1,72 - 5,68
TT	0 (0%)	0 (0%)		1,0	0,02 - 50,89
CT+TT	51 (51%)	25 (25%)	14,35 (0,0002)	3,12	1,72 - 5,68
590G>A (R197Q)					
GG	54 (54%)	66 (66%)	9,61 (0,008)	0,43	0,23 - 0,79
GA	42 (42%)	24 (24%)		1,99	1,08 - 3,68
AA	4 (4%)	0 (0%)		8,44	0,45 - 158,99
GA+AA	46 (46%)	24 (24%)		7,61(0,006)	2,34

Bảng 2: Các đột biến gen GSTP1 ở nhóm bệnh và nhóm chứng

GSTP1 polymorphism	Nhóm vô sinh (n = 100)	Nhóm chứng (n = 100)	χ^2 (p)	OR	95% CI
313G>A (Ile 105 Val)					
GG	50 (50%)	84 (84%)	30,32 (3.10 ⁻⁷)	0,19	0,10 - 0,37
GA	36 (36%)	16 (16%)		2,95	1,51 - 5,79
AA	14 (14%)	0 (0%)		33,69	1,98-573,16
GA+AA	50 (50%)	16 (16%)	26,14 (3.10 ⁻⁷)	5,25	2,71-10,19
341C>T Ala 114 Val					
CC	66 (66%)	96 (96%)	29,24(5.10 ⁻⁷)	0,08	0,03 - 0,24
CT	34 (34%)	4 (4%)		12,36	4,19 - 36,49
TT	0 (0%)	0 (0%)		1,00	0,02 - 50,89
CT+TT	34 (34%)	4 (4%)		12,36	4,19 - 36,49

3.2. Kết quả đánh giá mức độ stress oxy hóa ở bệnh nhân nhóm bệnh và nhóm chứng**Bảng 3: Kết quả mức độ stress oxy hóa ở bệnh nhân nhóm bệnh và nhóm chứng**

Mức độ stress oxy hóa	Nhóm bệnh (có ít nhất 1 đột biến gen)		Nhóm chứng (không có đột biến gen)		p
	n	%	n	%	
M1	0	0	24	68,6	p < 0,05
M2	8	22,9	11	31,4	p > 0,05
Stress oxy hóa thấp (M1+M2)	8	22,9	35	100	p < 0,05
Stress oxy hóa cao (M3+M4)	27	77,1	0	0	p < 0,05

p < 0,05

IV. BÀN LUẬN

Đánh giá đột biến gen NAT2 (481C>T) ở nhóm bệnh với kiểu gen dị hợp tử CT 51% cao hơn ở nhóm chứng 25% (OR=3,12; CI= 1,72-5,68), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,001. Không gặp trường hợp nào mang kiểu gen đồng hợp tử (TT) ở cả hai nhóm. Đột biến gen NAT2 (590G>A) ở nhóm bệnh với kiểu gen dị hợp tử GA 42% cao hơn ở nhóm chứng 24% (OR=1,99; CI= 1,08-3,68), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,001. Gặp 4% kiểu gen đồng hợp AA ở nhóm bệnh mà không gặp trường hợp nào ở nhóm chứng. Kiểu gen GA+AA gặp ở nhóm bệnh và nhóm chứng lần lượt là 46% và 24% và có nguy cơ cao gây vô sinh nam (OR=2,34; CI= 1,27-4,31) cho thấy nguy cơ vô sinh tăng đáng kể ở những người mang kiểu gen này.

Theo nghiên cứu của Yarosh và cộng sự (2014) [3] nghiên cứu đột biến gen NAT2 ở 203 bệnh nhân vô sinh nam và 227 nam giới bình thường cho kết quả: Ở nhóm bệnh có 46,8% dị hợp tử, 34,5% bình thường, 18,7% đồng hợp tử đột biến. Ở nhóm chứng: 51,5% dị hợp tử, 34,8% bình thường và 14,1% đồng hợp tử đột biến. Kết quả phân tích cho thấy tỷ lệ phân bố genotypes và alleles giữa hai nhóm bệnh và nhóm chứng không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê (p>0,05). Tuy nhiên, theo nghiên cứu của tác giả trên, những trường hợp mang đột biến NAT2 (481C>T) và NAT2 (590G>A) làm tăng tính nhạy cảm dẫn đến vô sinh nam khi có sự tiếp xúc với các chất oxy hóa như: khói thuốc lá (OR = 1,7; 95%CI = 1,02 - 2,87; p = 0,042), lạm dụng rượu (OR = 2,14; 95%CI=1,08 - 4,27; p = 0,029), lượng thức ăn ít chất xơ (OR = 1,68; 95%CI = 1,01 - 2,79; p = 0,04) [4].

Nghiên cứu đột biến GSTP1 (313G>A) thấy tỷ lệ mang gen GA ở nhóm bệnh là 36%, nhóm chứng là 16% với OR=2,95; CI= 1,51-5,75; p<0,001. 14% ở nhóm bệnh mang kiểu gen AA, không gặp trường hợp nào mang kiểu gen AA ở nhóm chứng với OR = 33,69, CI= 1,98 - 573,16. Kiểu gen GA+AA gặp ở nhóm bệnh và nhóm chứng lần lượt là 50% và 16% với OR=5,25; CI=

2,71-10,19; p<0,005. Đột biến GSTP1 (341C>T) tỷ lệ người mang kiểu gen CT ở nhóm bệnh là 34%, nhóm chứng là 4% (OR=12,36; CI= 4,19-36,49). Không gặp trường hợp nào mang gen TT ở cả hai nhóm. Trong nghiên cứu của Feng Z. và cộng sự (2017) [5] về sự kết hợp của các đột biến gen SPO11 và GSTP1 đối với các trường hợp vô sinh I ở nam giới, kết quả so sánh trên 216 bệnh nhân và 198 người bình thường cho thấy tần suất đột biến đơn thuần 313G>A gen GSTP1 (GSTP1 Leu105Val) của 2 nhóm có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê (p < 0,05). Tác giả kết luận có thể có sự kết hợp của đột biến gen GSTP1 313G>A và nam giới vô sinh. Nghiên cứu đột biến gen GSTP1 313G>A của Yarosh và cộng sự (2015)[6] trên 203 bệnh nhân nam vô sinh I và 227 người bình thường cho thấy đột biến gen này làm tăng nguy cơ vô sinh ở nam giới (OR = 1,50, 95% CI 1,02-2,20, p = 0,04). Xiong D.K. và cộng sự (2015) kết luận sự đa hình trong các đột biến GSTP1 C341T và đột biến tại cả hai vị trí G313A, C341T làm phát triển các yếu tố nguy cơ vô sinh nam ở nam giới Tứ Xuyên, Tây Nam Trung Quốc[7].

Stress oxy hóa gây tổn thương đến lớp màng lipid của tinh trùng, ADN tinh trùng và tăng quá trình chết theo chương trình của tinh trùng. Từ đó ảnh hưởng đến số lượng, mật độ, tỷ lệ sống, độ di động, hình thái và mức độ đứt gãy ADN tinh trùng. Tiến hành đo mức độ stress oxy hóa ở 35 bệnh nhân có ít nhất 1 trong các đột biến GSTP1 (341C>T), (313 G>A) và (hoặc) NAT2 (481C>T), (590G>A) và 35 bệnh nhân nhóm chứng không có đột biến nào dựa trên kit Oxisperm có 4 mức từ M1 đến M4 được chia làm 2 nhóm: nhóm I có mức stress oxy hóa thấp gồm M1 và M2, nhóm II có mức stress oxy hóa cao gồm M3 và M4, ở nhóm bệnh chúng tôi không gặp trường hợp nào ở mức 1 còn ở nhóm chứng 68,6%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05). Ở mức độ stress oxy hóa cao gặp 77,1% ở nhóm bệnh, 0% ở nhóm chứng p<0,05. Có 8 trường hợp đột biến từ 3 gen trở lên đều có mức độ stress oxy hóa cao ở mức M3, M4. Điều

này cho thấy mức độ stress oxy hóa trong tình dịch tăng cao ở nhóm bệnh nhân bị đột biến một trong các gen trên.

V. KẾT LUẬN

1. Tần số xuất hiện kiểu gen ở nhóm bệnh và nhóm chứng khác biệt có ý nghĩa thống kê với χ^2 : 14,35 NAT2 (481C>T) và 9,61 NAT2 (590G>A); 30,32 GSTP1 (313G>A) và 29,24 GSTP1 (341C>T). Tỷ lệ xuất hiện kiểu gen dị hợp tử và đồng hợp đột biến ở nhóm bệnh là 51% NAT2 (481C>T), 46% NAT2 (590G>A) và 50% GSTP1 (313G>A); 34% GSTP1 (341C>T). Trong khi đó ở nhóm chứng là 25% NAT2 (481C>T), 24% NAT2 (590G>A) và 16% GSTP1 (313G>A); 4% GSTP1 (341C>T).

2. Có mối liên quan giữa các đột biến gen GSTP1 (341C>T (A114V), 313 G>A (I105V)) và NAT2 (481C>T (L161L), 590G>A (R197Q với vô sinh nam. Các kiểu gen GA+AA (GSTP1 313G >A); CT+TT GSTP1 (341C>T) và CT+TT NAT2 (481C>T); GA+AA NAT2 (590G>A) có nguy cơ cao gây vô sinh nam với OR lần lượt là: 5,25 (95% CI: 2,71-10,19); 12,36 (95%CI = 4,19-36,49) và 3,12 (95%CI: 1,72-5,68); 2,34 (95%CI=1,27-4,31) và mối liên quan giữa đột biến các gen này với mức độ stress oxy hóa ($p<0,05$).

ĐÁNH GIÁ ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, CẬN LÂM SÀNG VÀ KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ DỊ VẬT THỰC QUẢN TẠI BỆNH VIỆN TAI MŨI HỌNG CẦN THƠ

Châu Chiêu Hòa*

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Dị vật thực quản là một cấp cứu trong Tai Mũi Họng, chẩn đoán và điều trị còn khá phức tạp. Bệnh rất phổ biến và diễn biến nguy hiểm đến tính mạng. **Mục tiêu:** Mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đánh giá điều trị dị vật thực quản. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu được thực hiện trên 90 trường hợp dị vật thực quản, các bệnh nhân được sơ thực quản ở cấp cứu tại Bệnh viện Tai Mũi Họng Cần Thơ. Số liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS 18.0. **Kết quả:** Xương cá (46,67%), xương gia cầm (16,67%), viên thuốc (12,22%), đồng xu (8,89%), kích thước trung bình là $2,59 \pm 0,93$ cm. Triệu chứng nuốt vướng – nghẹn (91,11%), nuốt đau (90%), không ăn uống được

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ouerhani S., Ben Bahria I., Rouissi K., Cherni L. (2017). Distribution of xenobiotics metabolising enzyme genotypes in different Tunisian populations. *Ann. Hum. Biol.* 44(4): 366 - 372.
2. Magalon H., Patin E., Austerlitz F. (2008). Population genetic diversity of the NAT2 gene supports a role of acetylation in human adaptation to farming in Central Asia. *European Journal Human Genetic*, 16(2), 243 - 251.
3. Yarosh S.L., Kokhtenko E.V., Churnosov M.I et al (2014). Synergism between the N-acetyltransferase 2 gene and oxidant exposure increases the risk of idiopathic male infertility. *Report Biomed Online*. 29(3). 362 - 369.
4. Feng Z, Jing Z, Liu H, Liao S., (2015). Association of SPO11 and GST gene polymorphisms with idiopathic male infertility in ethnic Han Chinese. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 32(6). 866 - 870.
5. Yarosh S.L., Kokhtenko E.V., Churnosov M.I. (2015). Joint effect of glutathione S-transferase genotypes and cigarette smoking on idiopathic male infertility. *Adrologia*, 47(9), 980 - 986.
6. Brahem S., Mehdi M., Elghezai H. et al (2011). The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(5), 425 - 432.
7. Xiong D.K., Chen H.H., Ding X.P. (2015). Association of polymorphisms in glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with idiopathic azoospermia or oligospermia in Sichuan, China. *Asian J Androl*, 17(3), 481 - 486.

(67,78%). Thời gian hóc đi vật đến khi nhập viện trước 24 giờ (76,67%). X quang thực quản cổ nghiêng có hình ảnh dị vật là 68,89%. Có sự gia tăng công thức bạch cầu từ giai đoạn chưa viêm đến giai đoạn biến chứng, chủ yếu là bạch cầu đa nhân trung tính ($p<0,001$). Soi lấy dị vật thành công 97,78%, tổn thương cơ thực quản là 2,22%. Đánh giá điều trị tốt (94,44%), không tốt (5,56%), xấu (0%). Kết quả điều trị thành công 100%. **Kết luận:** Nội soi thực quản ống cứng lấy dị vật cho kết quả tốt.

Từ khóa: Dị vật thực quản, nội soi ống cứng

SUMMARY

THE CLINICAL, PARACLINICAL CHARACTERISTICS AND EVALUATE THE RESULTS OF TREATMENT ESOPHAGEAL FOREIGN BODY AT CAN THO ENT HOSPITAL

Background: Esophageal foreign body is an emergency in ENT, the diagnosis and treatment are difficult. This disease's common and dangerous. **Objectives:** Describe the clinical, paraclinical characteristics and evaluate the results of treatment esophageal foreign body. **Materials and Methods:**

*BV Tai Mũi Họng Cần Thơ

Chịu trách nhiệm chính: Châu Chiêu Hòa

Email: chieuhoa72@yahoo.com

Ngày nhận bài: 30.10.2017

Ngày phản biện khoa học: 14.12.2017

Ngày duyệt bài: 22.12.2017