

Nguyễn Thị Thanh Hương năm 2015 tại Bệnh viện phổi Trung ương là 3,17 và của Trần Thủy Hương năm 2018 tại BVĐK Xanh Pôn – Thành phố Hà Nội là 3,0.

V. KẾT LUẬN - KIẾN NGHỊ

Kết luận: Số lượng nhân lực tăng dần từ năm 2019-2022, tuy nhiên vẫn còn thiếu nhiều so với Thông tư số 08/2007/TTLT-BYT-BNV. Trong đó, nhân lực chuyên môn còn thiếu Bác sĩ và Dược sĩ Đại học. Số bác sĩ trình độ sau đại học chiếm 15,22 % so với tổng số. Số lượng cán bộ tuyển dụng được qua các năm còn thiếu so với kế hoạch tuyển dụng. Trong nhóm yếu tố đào tạo và phát triển, yếu tố việc định hướng, cử đi đào tạo có điểm đánh giá trung bình (3,964 + 0,557) và tỷ lệ tốt (87,4%) cao nhất. Yếu tố chính sách đào tạo có điểm đánh giá trung bình (2,928 + 0,582) và tỷ lệ bình thường (74,6%) cao nhất trong nhóm

Kiến nghị: Có chính sách đãi ngộ hợp lý với nhân viên công tác lâu năm, có kinh nghiệm, có chuyên môn cao. Cụ thể hóa tiêu chuẩn đánh giá nhân viên theo từng vị trí việc làm; tiêu chuẩn đánh giá cần được bổ sung những yếu tố định lượng về khối lượng, thời gian hoàn thành công việc, và các yếu tố đánh giá về chất lượng. Xây dựng lại các tiêu chí xét thu nhập tăng thêm nhằm tăng thu nhập cho nhóm có thu nhập thấp, giảm sự chênh lệch về thu nhập tăng thêm giữa nhóm cao nhất và nhóm thấp nhất. Quan tâm đến đào tạo về quản lý và hợp tác quốc tế trong đào tạo nhân lực.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ban Chấp hành Trung ương (2017), Nghị quyết số 20-NQ/TW ngày 25/10/2017 của Ban Chấp hành Trung ương về tăng cường công tác bảo vệ, chăm sóc và nâng cao sức khỏe nhân dân trong tình hình mới.
2. Bệnh viện Đa khoa Trung tâm Tiền Giang (2016), Báo cáo tổng kết hoạt động Bệnh viện năm 2016 và phương hướng hoạt động năm 2017.
3. Bệnh viện Đa khoa Trung tâm Tiền Giang (2017), Báo cáo tổng kết hoạt động Bệnh viện năm 2017 và phương hướng hoạt động năm 2018.
4. Bệnh viện Đa khoa Trung tâm Tiền Giang (2018), Báo cáo tổng kết hoạt động Bệnh viện năm 2018 và phương hướng hoạt động Bệnh viện năm 2019.
5. Bộ Y tế (2015), Quyết định số 2992/QĐ-BYT ngày 17/7/2015 phê duyệt Kế hoạch phát triển nhân lực trong hệ thống khám bệnh, chữa bệnh giai đoạn 2015-2020.
6. Lê Quang Cường (2012), Nguồn bác sĩ cho hoạt động dự phòng ở tuyến cơ sở, Tạp chí Chính sách y tế, số 10/2012, tr.10-11.
7. Trần Kim Dung (2009), Quản trị nguồn nhân lực, Nhà xuất bản Thống kê.
8. Phạm Trí Dũng (2008), Mô tả và đánh giá thực trạng cơ sở vật chất, nhân lực, chuyên môn và công tác quản lý của hệ thống bệnh viện Việt Nam, Đề tài Khoa học cấp Bộ.
9. Hội đồng nhân dân tỉnh Tiền Giang (2011), Nghị quyết số 07/2011/NQ-HĐND ngày 25/8/2011 của Hội đồng nhân dân tỉnh Tiền Giang về chính sách đào tạo, bồi dưỡng cán bộ, công chức và thu hút nguồn nhân lực của tỉnh Tiền Giang.
10. Hội đồng nhân dân tỉnh Tiền Giang (2014), Nghị quyết số 82/2014/NQ-HĐND ngày 11/7/2014 của Hội đồng nhân dân tỉnh Tiền Giang về việc sửa đổi, bổ sung một số nội dung của Nghị quyết số 07/2011/NQ-HĐND ngày 25/8/2011 về chính sách đào tạo, bồi dưỡng cán bộ, công chức và thu hút nguồn nhân lực của tỉnh Tiền Giang.

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN VI MẮT ĐOẠN NHỎ VÙNG MỞ RỘNG TRÊN NHIỄM SẮC THỂ Y CỦA BỆNH NHÂN VÔ TINH VÀ THIỂU TINH

Triệu Tiên Sang¹, Nguyễn Thanh Tùng¹,
Trần Văn Tuấn¹, Đặng Thái Sơn²

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng quy trình chẩn đoán vi mắt đoạn nhỏ vùng mở rộng trên nhiễm sắc thể Y. **Đối tượng và phương pháp:** Tiến hành nghiên cứu với

mục đích xây dựng phương pháp Multiplex PCR (M-PCR) để phát hiện đồng thời và chính xác các vi mắt đoạn nhỏ trên 32 bệnh nhân vô sinh làm xét nghiệm mất đoạn AZF tại Bộ môn Sinh học và Di truyền Y học - Học viện Quân Y từ 8/2021 – 12/2022. Trong nghiên cứu này đã tối ưu thành công M-PCR thành 7 phản ứng được sắp xếp theo từng vùng AZFabc góp phần làm giảm thời gian xét nghiệm, phát hiện được cùng lúc 23 STS trên NST Y với độ đặc hiệu cao và tiết kiệm chi phí. **Kết quả:** Mất đoạn AZFa có 2/32 bệnh nhân chiếm 6,25%, xuất hiện mất đoạn dài trên NST Y với cả 3 vùng AZFa,b,c với 6/32 bệnh nhân chiếm 18,75%. Tỷ lệ mất đoạn cao nhất chiếm 56,24% với

¹Học viện Quân Y

²Đại học Mở Hà Nội

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Thanh Tùng

Email: bstungvmp@gmail.com

Ngày nhận bài: 18.8.2023

Ngày phản biện khoa học: 2.10.2023

Ngày duyệt bài: 24.10.2023

mất đoạn kết hợp AZFb,c ở 18 bệnh nhân. Nghiên cứu này bước đầu xây dựng thành công quy trình phản ứng M-PCR phát hiện được các vi mất đoạn nhỏ vùng mở rộng AZF trên đối tượng vô sinh. **Kết luận:** Phương pháp có thể dùng trong xét nghiệm chẩn đoán vi mất đoạn vùng mở rộng AZF để tiết kiệm chi phí cũng như thời gian xét nghiệm trong tương lai.

Từ khóa: AZF; AZFabc; Vi mất đoạn AZF mở rộng; Multiplex PCR; PCR.

SUMMARY

STUDY ON BUILDING DIAGNOSTIC PROCEDURE FOR MICRODELETION OF ENLARGED REGION ON Y CHROMOSOME OF PATIENTS WITH AZOOSPERMIA AND OLIGOSPERMIA

Developing a diagnostic process for detecting small deletions in the expanded AZF region on the Y-chromosome. **Objectives and procedures:** A research study was conducted to develop a Multiplex PCR (M-PCR) method to accurately and simultaneously detect small deletions in 32 male patients with infertility who were tested for AZF deletions at the Department of Biology and Medical Genetics, Military Medical Academy from 8/2021 to 12/2022. In this study, M-PCR was successfully optimized into 7 reactions arranged according to each AZFabc region, contributing to reducing testing time and detecting 23 STS simultaneously on the Y chromosome with high specificity and cost-effectiveness. **Results:** AZFa deletions occurred in 2/32 patients (6.25%), while deletions of the AZFa,b,c regions occurred in 6/32 patients (18.75%). The highest deletion rate was 56.24% with combined deletions of AZFb,c in 18 patients. This research has successfully developed a diagnostic process using M-PCR to detect small deletions in the expanded AZF region in male infertility patients. **Conclusion:** This method can be used for diagnosing small deletions in the expanded AZF region, saving costs and testing time in the future.

Keywords: AZF; AZFabc; AZF microdeletion of enlarged region; Multiplex PCR; PCR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, vô sinh đã trở thành một trong những vấn đề sức khỏe sinh sản gây ảnh hưởng tới cuộc sống hạnh phúc của rất nhiều cặp vợ chồng và là một vấn đề lớn của toàn xã hội. Căn bệnh vô sinh ảnh hưởng đến khoảng 15% các cặp vợ chồng trên toàn cầu, tương đương 48,5 triệu cặp vợ chồng [1]. Có nhiều nghiên cứu thống kê tỷ lệ vô sinh theo đối tượng gây vô sinh: vô sinh do nam giới, vô sinh do nữ giới, vô sinh do cả nam và nữ. Nội dung đề tài chỉ đề cập tới trường hợp vô sinh do nam giới. Vô sinh nam giới là trường hợp của một cặp vợ chồng vô sinh mà nguyên nhân do người chồng, người vợ hoàn toàn bình thường. Gần 30 triệu nam giới trên toàn thế giới bị vô sinh với tỷ lệ vô sinh do nam giới dao động từ khoảng 20-

70% [1]. Việc chẩn đoán nguyên nhân gây vô sinh ở nam giới là một trong những yêu cầu bắt buộc trước khi tiến hành điều trị và hết sức cần thiết để thực hiện tư vấn di truyền. Việc mất các đoạn trên nhiễm sắc thể Y rất phổ biến và được coi là nguyên nhân di truyền thường gặp gây vô sinh nam cùng với hội chứng Klinefelter [2]. Trên mức độ phân tử, sự ảnh hưởng đến khả năng sinh tinh của nam giới do nơi chứa gen các vùng yếu tố azoospermia (AZF) bao gồm ba vùng di truyền trong nhánh dài của nhiễm sắc thể Y ở người được gọi là AZFa, AZFb và AZFc [3]. Việc phát hiện các vi mất đoạn vùng mở rộng sẽ giúp có thêm bằng chứng giúp cho việc điều trị và chẩn đoán cho những bệnh nhân vô sinh nam. Hiện nay cùng với sự phát triển của thời đại sinh học phân tử nhiều kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (ART) can thiệp đặc biệt là bơm tinh trùng vào bào tương trứng (ICSI) và trích xuất tinh trùng từ tinh hoàn (TESE) giúp cho một số vợ chồng hiếm muộn có thể sinh con. Tuy nhiên, quy trình này có nguy cơ làm tăng các bất thường di truyền sang thế hệ sau với bối cảnh di truyền của vô sinh nam rất phức tạp vì các kiểu hình mô học của tinh dịch và tinh hoàn cực kỳ không đồng nhất và có rất nhiều gen liên quan đến quá trình sinh tinh. Yếu tố di truyền gây ra vô sinh ở nam giới đóng góp (25%) là do không có tinh trùng, tuy nhiên bằng các thiết bị hiện đại việc phát hiện ra số lượng bất thường trong tinh dịch ngày một tăng cao. Vì vậy chẩn đoán nguyên nhân di truyền gây vô sinh có ý nghĩa lâm sàng rõ ràng vì nó có thể ảnh hưởng đến sức khỏe sinh sản và sức khỏe chung của bệnh nhân và con cái của họ. Ngoài ra, nó có thể có giá trị tiên lượng cho việc lấy tinh trùng từ tinh hoàn. Trong nghiên cứu và sàng lọc ở các bệnh nhân vô sinh là nam giới có mật độ tinh trùng ($<5 \times 10^6$ triệu tinh trùng/mL) đã được chỉ định sử dụng kỹ thuật chẩn đoán phân tử xác định tình trạng mất đoạn nhỏ trên NST Y [4]. Việc mất đoạn nhỏ trên nhánh dài của nhiễm sắc thể Y (Yq) ở nam giới vô tinh đã thúc đẩy hai nhà nghiên cứu đề xuất yếu tố vô tinh AZF, được dự đoán là yếu tố cần thiết cho quá trình sinh tinh. Một đặc điểm đặc biệt của ranh giới các vùng AZF là sự hiện diện của các trình tự tương đồng lặp đi lặp lại dễ bị xóa hoặc sao chép thông qua một cơ chế gọi là tái tổ hợp tương đồng không alen (NAHR). Từ góc độ lâm sàng, những mất đoạn này được gọi là AZFa cổ điển, AZFb, AZFbc (với hai điểm ngắt khác nhau) và AZFc (bắt đầu từ vùng gần hơn đến vùng Yq xa hơn) [5].

Với thời đại phát triển vượt bậc của sinh học

phân tử hiện nay bằng các kỹ thuật PCR, real-time PCR, MLPA, lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) và Multiplex-PCR là phản ứng PCR đa môi sử dụng đồng thời nhiều cặp môi để khuếch đại nhiều đoạn DNA trong cùng một phản ứng PCR đã được dùng để phát hiện cùng lúc nhiều mất đoạn nhỏ AZF ở trên thế giới [6]. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm tối ưu hóa kỹ thuật M-PCR giúp giảm tối đa thời gian và chi phí xét nghiệm. Quy trình chuẩn hóa PCR đơn môi sử dụng 24 cặp môi đặc hiệu và có độ nhạy cao xác định các điểm đánh dấu vị trí được gắn thẻ trình tự cụ thể (STS) nhiễm sắc thể Y được sử dụng để phát hiện các vi mất đoạn nhỏ vùng mở rộng AZF trên nhiễm sắc thể Y. Tùy thuộc vào điều kiện của phòng thí nghiệm, việc tối ưu để xây dựng quy trình M-PCR có tiềm năng lớn để ứng dụng chẩn đoán vi mất đoạn nhỏ vùng mở rộng trên nhiễm sắc thể Y của bệnh nhân vô tinh trung và thiếu tinh.

II. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu: Mẫu máu của 32 bệnh nhân nam giới vô sinh làm xét nghiệm kiểm tra vi mất đoạn AZF trên NST Y đã được lấy máu và tới khám tại Bộ môn Sinh học và Di truyền y học – HVQY.

Mẫu đối chứng dương là bệnh nhân nam giới đã có 2 người con bình thường khỏe mạnh.

Vật liệu: Dụng cụ và hóa chất: hệ thống máy PCR, bộ điện di, một số trang thiết bị đạt chuẩn điều kiện của một phòng sinh học phân tử. Sử dụng kit tách chiết G-spin™ Total DNA Extraction Kit (Hàn Quốc); GoTaq Green Mastermix 2X của hãng ProOmega (Hoa Kỳ); dung dịch TBE 0.5X, bột Agarose 3% và EtBr.

Bộ môi: Bộ môi được xây dựng để phát hiện các vi mất đoạn nhỏ vùng mở rộng AZF trên nhiễm sắc thể Y đã được công bố trên NCBI (bảng 1)[4].

Bảng 1: Các cặp môi phát hiện 24 (STS) trên nhiễm sắc thể Y

STS	Kích thước (bp)	Gene	Vị trí	Trình tự môi xuôi (5'-3') và ngược (3'-5')
1	495	ZFX/Y	Control	ACCRCTGTA CTGACTGTGATTACAC GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT
2	472	SRY	Control	GAATATTCCCGCTCTCCGGA GCTGGTGCTCCATTCTTGAG
3	125	sY152	AZFd	AAGACAGTCTGCCATGTTTCA ACAGGAGGGTACTTAGCAGT
4	320	sY86	AZFa	GTGACACACAGACTATGCTTC ACACACAGAGGGACAACCCT
5	274	sY127	AZFb	GGCTCACAAACGAAAAGAAA CTGCAGGCAGTAATAAGGGA
6	350	sY254	AZFc	GGGTGTTACCAGAAGGCAAAA GAACCGTATCTACCAAAGCAGC
7	326	sY84	AZFa	AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT GCCTACTACCTGGAGGCTTC
8	301	sY134	AZFb	GTCTGCCTCACCATAAAAACG ACCACTGCCAAAACCTTTCAA
9	126	sY255	AZFc	GTTACAGGATTCGGCGTGAT CTCGTCATGTGCAGCCAC
10	264	sY82	AZFa	ATC CTG CCC TTC TGA ATC TC CAG TGT CCA CTG ATG GAT GA
11	275-277	sY83	AZFa	CTT GAA TCA AAG AAG GCC CT CAA TTT GGT TTG GCT GAC AT
12	110	sY1064	AZFa	GGG TCG GTG CAC CTA AAT AA TGC ACT AAA GAG TGA TAA TAA ATT CTG
13	239	sY1065	AZFa	TCA GGT ACT GTG ATG CCG TT TGA AGA GGA CAC AAA GGG AAA
14	247	sY1182	AZFa	ATG GCT TCA TCC CAA CTG AG CAT TGG CCT CTC CTG AGA CT
15	123	sY88	AZFa	TTG TAA TCC AAA TAC ATG GGC CAC CCA GCC ATT TGT TTT AC
16	301	sY105	AZFb	AAG GGC TTC TTC TCT TGC TT AGG GAG CTT AAA CTC ACC GT

17	190	sY121	AZFb	AGT TCA CAG AAT GGA GCC TG CCT GTG ACT CCA GTT TGG TC
18	690	sY1224	AZFb	GGC TTA AAC TTG GGA GGG TG CAAAGAGCCTCCAG ACCA
19	311	sY143	AZFb	GCA GGA TGA GAA GCA GGT AG CCG TGT GCT GGA GAC TAA TC
20	255	sY1192	AZFb	ACT ACC ATT TCT GGA AGC CG CTC CCT TGG TTC ATG CCA TT
21	139	sY153	AZFb	GCA TCC TCA TTT TAT GTC CA CAA CCC AAA AGC ACT GAG TA
22	527	sY1291	AZFc	TAA AAG GCA GAA CTG CCA GG GGG AGA AAA GTT CTG CAA CG
23	385	sY1191	AZFc	CCA GAC GTT CTA CCC TTT CG GAG CCG AGA TCC AGT TAC CA
24	236	sY160	AZFc	TAC GGG TCT CGA ATG GAA TA TCA TTG CAT TCC TTT CCA TT

Quy trình phân tích phát hiện vi mất đoạn vùng mở rộng AZF: Phân tích tinh dịch đồ đối với các bệnh nhân có mật độ tinh trùng ($< 5 \times 10^6$ triệu tinh trùng/mL) ta bắt đầu sàng lọc AZF với vị trí được gắn thẻ trình tự cụ thể (STS) cơ bản AZFa gồm: sY84, sY86; AZFb gồm: sY127, sY134; AZFc gồm: sY254, sY255, sY1524 và vùng mở rộng với AZFa gồm: sY82, sY83, sY1064, sY1065, sY1182, sY88. AZFb gồm: sY105, sY121, sY1224, sY143, sY1192, sY153. AZFc gồm: sY160, sY1191, sY1291. Sử dụng kỹ thuật multiplex PCR.

Tách chiết DNA. Lấy 2ml máu toàn phần của bệnh nhân được bảo quản trong ống có chất chống đông EDTA, sau đó mang đi tách chiết DNA bằng bộ kit G-spin™ Total DNA Extraction Kit (Hàn Quốc) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Lấy 200µl máu toàn phần (lắc đều nhẹ trước khi hút), 20µl Proteinase K (20 mg/ml) và 200µl Buffer BL votex ủ ở 56°C trong vòng 12 phút (cách 3-4p đảo trộn 1 lần). sau đó cho thêm 200µl cồn tuyệt đối votex rồi chuyển toàn bộ dịch sang cột lọc có sẵn trong kit. Ly tâm rồi loại bỏ dịch, tiếp theo rửa với 700µl Buffer WA và Buffer WB. Cuối cùng DNA được thu bằng 70µl Buffer CE và được bảo quản ở -20°C.

Tối ưu hóa phương pháp PCR đơn mỗi. Phản ứng PCR đơn mỗi được tối ưu phản ứng với 6,25µl GoTaq Green Mastermix 2X, 0,25µl mỗi mỗi (theo STS theo bảng 1), 1µl ADN tách chiết cuối cùng thêm nuclease-free water cho vừa đủ 12,5µl. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR đơn mỗi mới 95°C trong 10 phút, 35 chu kỳ với 94°C - 30s, 57°C (1-23) hoặc 60°C (24) - 30s, 72°C - 30s và 72°C - 10 phút và bảo quản ở 4-8°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2% trong 22 phút với cường độ dòng điện là 250V sau đó ngâm bản

gel với thuốc nhuộm Ethidium bromide 1 µl/ml.

Tối ưu hóa phương pháp M-PCR. Sau khi xác nhận khuếch đại thành công 24 cặp mỗi, tiến hành thực hiện ghép cặp phản ứng M-PCR nhằm cùng lúc đồng thời phát hiện các các mất đoạn nhằm giúp tiết kiệm chi phí và giảm được thời gian thực hiện xét nghiệm. Quy trình được chia thành 7 phản ứng sắp xếp dựa theo các vùng AZFabc với vùng cơ bản kết hợp nội kiểm ở: Phản ứng 1: 1-3-4-5-6 và Phản ứng 2: 2-7-8-9; vùng mở rộng từ: Phản ứng 3: 10-12-13; Phản ứng 4: 11-14-15; Phản ứng 5: 16-18-20; Phản ứng 6: 17-19-21; Phản ứng 7: 22-23-24.

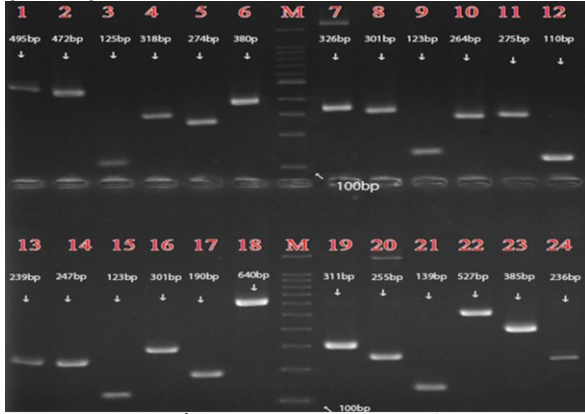
Phản ứng M-PCR được tối ưu trong 12,5 µl phản ứng với nồng độ các cặp mỗi (10pmol/ µl) cùng với 6,25 µl GoTaq Green Mastermix 2X, 1,5 µl dịch ADN tách chiết cuối cùng thêm nước sạch cho phản ứng đủ 12,5 µl. Chu trình nhiệt cho phản ứng M-PCR với Phản ứng: 2,3,4,5,6 ở 95°C trong 10 phút, 35 chu kỳ với 94°C - 30s, 59°C - 30s, 72°C - 45s và 72°C - 10 phút và bảo quản ở 4-8°C. Đối với phản ứng 1 và 7 do xuất hiện tình trạng sản phẩm phụ nhiều ta áp dụng kỹ thuật chạy touchdown để giảm tình trạng trên với chu trình nhiệt: 95°C trong 5 phút, 35 chu kỳ với 94°C - 30s, 61°C ở 5 chu kì đầu và 59°C ở 30 chu kì cuối - 60s, 72°C - 30s và 72°C - 5 phút và bảo quản ở 4-8°C.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 3% trong 35 phút với cường độ dòng điện 250V và nhuộm với Ethidium bromide 1 µl/ml.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Chuẩn hóa phương pháp PCR đơn mỗi. Việc tối ưu cho phản ứng PCR thành công với việc khảo sát điều kiện của phản ứng với nhiệt độ gắn mỗi là 57°C cho các STS 1-23 và 60°C cho STS 24. Ta thấy được kết quả điện di

trên gel agarose 3% các sản phẩm phản ứng PCR có kích thước đúng với công bố trên NCBI, bằng điện di không xuất hiện sản phẩm phụ, hình ảnh rõ nét thể hiện được trình tự mỗi có độ đặc hiệu cao xác định được chính xác các gene (hình 1).

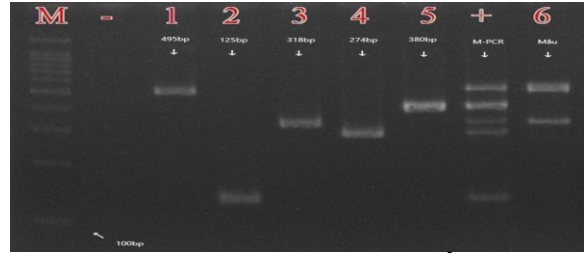


Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR đơn mỗi của 24 STS trên bảng 1. M: Maker 100 bp sử dụng làm thang chuẩn AND

M: Maker 100 bp sử dụng làm thang chuẩn ADN; các STS phát hiện được đánh dấu từ giếng 1 – 24 kích thước trùng với bảng 1.

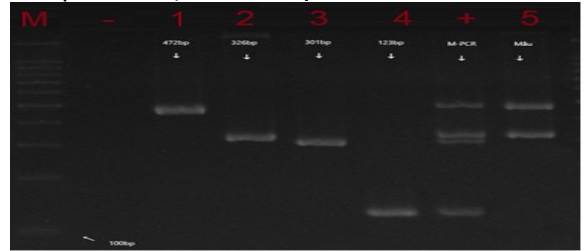
Ở hình 1 kết quả chạy điện di đơn mỗi, DNA bệnh nhân nam giới có khả năng sinh sản bình thường đã được sử dụng để khuếch đại thành công các đoạn gene AZF, việc sử dụng phương pháp PCR kết hợp với bộ mỗi đã giúp cho việc phát hiện các đoạn gene trở nên nhanh chóng chỉ mất từ 4-5 giờ. Phương pháp cho ưu điểm dễ dàng thực hiện hơn so với các phương pháp hiện đại tốn kém như giải trình tự gen, việc sử dụng kĩ thuật PCR giúp các nhà nghiên cứu có thể tận dụng được nhiều thời gian và là giải pháp đối với các bệnh viện. Với quy trình PCR đơn mỗi, đã xác định được 24 gene gây ảnh hưởng tới quá trình sinh tinh ở nam giới có tiềm năng lớn dùng để sàng lọc, chẩn đoán AZF tại các bệnh viện nhằm tối ưu thời gian cũng như chi phí cho bệnh nhân.

3.2. Tối ưu hóa phương pháp Mutiplex PCR. Sau khi chuẩn hóa được phương pháp PCR đơn mỗi thành công việc lựa chọn các STS ghép cặp dựa theo từng vùng AZFabc sẽ giúp kiểm soát các mất đoạn theo vùng dễ dàng hơn với: Phản ứng 1: Control Y-sY152-sY86-sY127-sY254 (hình 2); Phản ứng 2: Control (Y)-sY84-sY134-sY255 (hình 3); Phản ứng 3: sY82-sY1064-sY1065 (hình 4); Phản ứng 4: sY83-sY1182-sY88 (hình 5); Phản ứng 5: sY105-sY1224-sY1192 (hình 6); Phản ứng 6: sY121-sY143-sY153 (hình 7); Phản ứng 7: sY1291-sY1191-sY160 (hình 8).



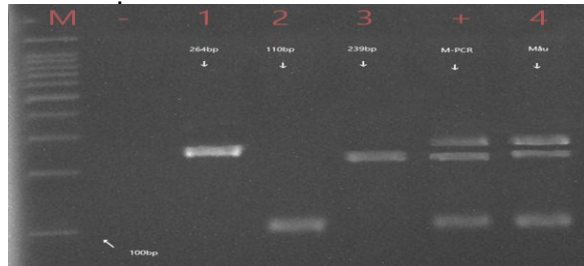
Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm M-PCR phản ứng 1

M: Maker 100 bp sử dụng làm thang chuẩn; (-): đối chứng âm; 1: ZFY (control); 2: sY152; 3: sY86; 4: sY127; 5: sY254; (+): phản ứng Multiplex PCR; 6: mẫu bệnh nhân.



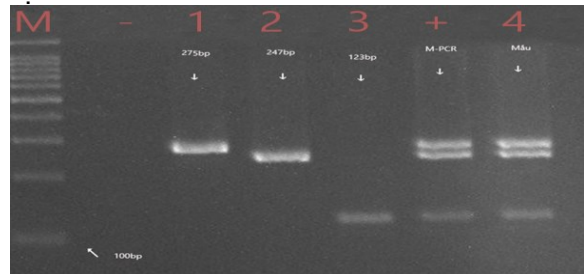
Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm M-PCR phản ứng 2

M: Maker 100 bp sử dụng làm thang chuẩn; (-): đối chứng âm; 1: SRY (control); 2: sY84; 3: sY134; 4: sY255; (+): phản ứng Multiplex PCR; 5: mẫu bệnh nhân.



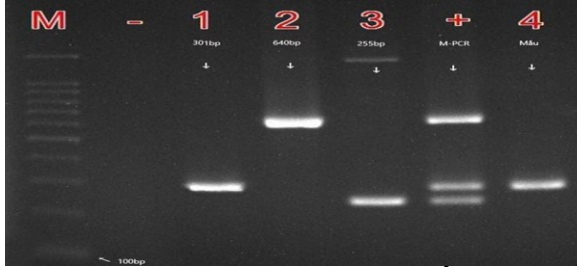
Hình 4: Kết quả điện di sản phẩm M-PCR phản ứng 3

M: Maker 100 bp sử dụng làm thang chuẩn; (-): đối chứng âm; giếng 1: sY82; 2: sY1064; 3: sY1065; (+): phản ứng Multiplex PCR; 4: mẫu bệnh nhân.



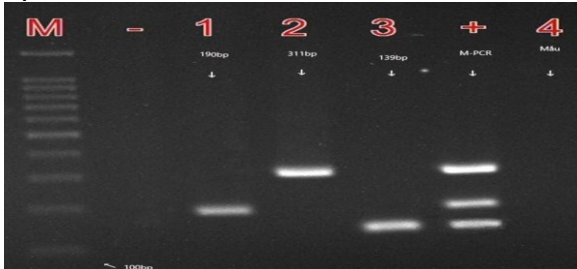
Hình 5: Kết quả điện di sản phẩm M-PCR phản ứng 4

M: Maker 100 bp sử dụng làm thang chuẩn; (-): đối chứng âm; giếng 1: sY83; 2: sY1182; 3: sY88; (+): phản ứng Multiplex PCR; 4: mẫu bệnh nhân.



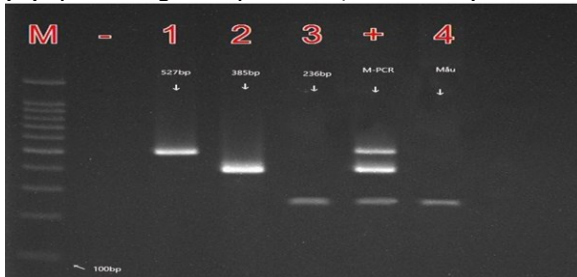
Hình 6: Kết quả điện di sản phẩm M-PCR phản ứng 5

M: Maker 100 bp sử dụng làm thang chuẩn; (-): đối chứng âm; 1: sY105 2: sY1224; 3: sY1192; (+): phản ứng Multiplex PCR; 4: mẫu bệnh nhân



Hình 7: Kết quả điện di sản phẩm M-PCR phản ứng 6

M: Maker 100 bp sử dụng làm thang chuẩn; (-): đối chứng âm; 1: sY121; 2: sY143; 3: sY153; (+): phản ứng Multiplex PCR; 4: mẫu bệnh nhân.



Hình 8: Kết quả điện di sản phẩm M-PCR phản ứng 7

M: Maker 100 bp sử dụng làm thang chuẩn; (-): đối chứng âm; 1: sY1291; 2: sY1191; 3: sY160; (+): phản ứng Multiplex PCR; 4: mẫu bệnh nhân

Đối với phản ứng M-PCR sau khi được tối ưu, hình ảnh điện di của sản phẩm cho thấy bằng được phân tách rõ ràng, gen control SRY xuất hiện bằng đã khẳng định được mẫu bệnh nhân là nam giới và trong phản ứng đối chứng (-) thể hiện trong quá trình làm không có sự nhiễm chéo. Tại mỗi phản ứng (+) (phản ứng M-PCR)

của các phản ứng cho thấy việc ghép cặp STS thành công. Trong mẫu nam vô sinh được chạy cùng với từng phản ứng đã có xuất hiện mất đoạn AZF. Ở phản ứng 1, bệnh nhân mất 3 đoạn gene sY127 (AZFb), sY254 (AZFc), sY152 (AZFc); Phản ứng 2: sY134 (AZFb), sY255 (AZFc); Phản ứng 3 và 4 mẫu lên bằng sáng bình thường, vậy không xảy ra mất đoạn ở 2 phản ứng này; Phản ứng 5 mất đoạn: sY1224 (AZFb), sY1992 (AZFb); Phản ứng 6: sY121 (AZFb), sY143 (AZFb), sY153 (AZFb); Phản ứng 7: sY1291 (AZFc), sY1191 (AZFc).

Bảng 2: Số lượng và tỷ lệ vô sinh nam giới mất đoạn AZF theo từng vùng

Mất đoạn vùng	Số lượng	Tỷ lệ
AZFa	2	6,25%
AZFb	0	0%
AZFc	3	9,38%
AZFa,c	3	9,38%
AZFb,c	18	56,24%
AZFa,b,c	6	18,75%
Tổng	32	100%

Nhận xét: Kết quả điện di cho thấy phát hiện 32 bệnh nhân mất đoạn AZF kết hợp cả vùng cơ bản và mở rộng ,trong đó mất đoạn AZFa chỉ có 2/32 trường hợp chiếm 6,25%. Không phát hiện mất đoạn AZFb đơn độc mà chỉ phối hợp với các mất đoạn khác tỉ lệ mất đoạn AZFb,c cao nhất với 18/32 trường hợp chiếm 56,24%. Có 6/32 bệnh nhân chiếm 18.75% mất kết hợp cả 3 vùng AZFabc, mất đoạn lớn vai dài NST Y, hội chứng chỉ có tế bào Sertoli không có tinh trùng, phải xin tinh trùng. Trong nghiên cứu của Lương Thị Lan Anh với số lượng 30 bệnh nhân mất đoạn nhỏ vùng cơ bản AZF chỉ chiếm 16,7%, còn lại chỉ mất đoạn vùng AZF mở rộng chiếm phần lớn (83,3%) [7]. So sánh với nghiên cứu này ở trên 32 bệnh nhân hiếm muộn không phát hiện được mất đoạn cơ bản đơn độc, tất cả đều mất đoạn cơ bản đều kết hợp mở rộng. Tình trạng này xuất hiện có thể do ở nghiên cứu của tác giả Lương Thị Lan Anh phát hiện được 8 trình tự cơ bản và 10 trình tự mở rộng, khác với nghiên cứu này có 7 trình tự cơ bản và 15 trình tự mở rộng (tại vùng AZFa mở rộng có thêm: sY1064,sY1182; AZFb mở rộng: sY1124, sY143).

Từ tối ưu nghiên cứu trên đã thể hiện bước đầu xây dựng thành công quy trình M-PCR đồng thời phát hiện được các vi mất đoạn nhỏ vùng mở rộng AZF. Các phản ứng được sắp xếp theo từng vùng AZF giúp cho việc kiểm soát mất đoạn theo vùng dễ dàng hơn. Phương pháp M-PCR giúp giải quyết được vấn đề về chi phí cũng như thời gian và có tiềm năng lớn được sử dụng giúp sàng lọc, chẩn đoán tại các bệnh viện.

IV. KẾT LUẬN

Tối ưu thành công kỹ thuật PCR đơn mỗi và đa mỗi xác định mất đoạn 24 vùng mở rộng AZF ảnh hưởng tới khả năng sinh sản ở nam giới.

Kiến nghị sử dụng kỹ thuật M-PCR tại các bệnh viện để tiết kiệm chi phí cũng như thời gian xét nghiệm. Mở rộng sàng lọc, chẩn đoán tại các bệnh viện nhằm đánh giá được tính đặc hiệu của kỹ thuật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Agarwal, A., et al.,** A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive biology and endocrinology*, 2015. 13(1): p. 1-9.
2. **Lahoz Alonso, R., et al.,** AZF gene microdeletions in azoospermic-oligozoospermic males. *Med Clin (Barc)*, 2022.
3. **Navarro-Costa, P., C.E. Plancha, and J. Goncalves,** Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for

male (in)fertility? *J Biomed Biotechnol*, 2010. 2010: p. 936569.

4. **Krausz, C., et al.,** EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*, 2014. 2(1): p. 5-19.
5. **Skaletsky, H., et al.,** The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 2003. 423(6942): p. 825-837.
6. **Motovali-Bashi, M., et al.,** Multiplex PCR based screening for micro/partial deletions in the AZF region of Y-chromosome in severe oligozoospermic and azoospermic infertile men in Iran. *Iranian journal of reproductive medicine*, 2015. 13(9): p. 563.
7. **Lương, T.L.A. and T.L. Hoàng,** Ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR phát hiện mất đoạn AZF ở bệnh nhân vô sinh nam không có tinh trùng. *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 2019. 61(2).

NGHIÊN CỨU TỔNG QUAN CÁC YẾU TỐ TIÊN LƯỢNG TRONG VIÊM MŨI XOANG MẠN TÍNH CÓ POLYP MŨI Ở NGƯỜI LỚN

Lê Nam Khánh¹, Lê Công Định²

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Viêm mũi xoang mạn tính (VMXMT) có polyp mũi là bệnh lý mạn tính thường gặp, đặc trưng bởi tổn thương thoái hóa polyp trong hốc mũi và các xoang cạnh mũi. Đây là bệnh khó kiểm soát, có tỉ lệ mắc ngày càng gia tăng và nguy cơ tái phát cao sau khi phẫu thuật. **Mục tiêu:** Mô tả các yếu tố tiên lượng trong viêm mũi xoang mạn tính có polyp mũi ở người lớn tái phát sau phẫu thuật. **Đối tượng và phương pháp:** Bài báo đăng trên các tạp chí có bình duyệt bằng tiếng Anh từ tháng 1 năm 2013 đến tháng 05 năm 2023, tìm trên thư viện Đại học Y Hà Nội, cơ sở dữ liệu Pubmed, sử dụng các từ khoá liên quan đến VMXMT có polyp mũi tái phát sau phẫu thuật. **Kết quả:** Trong số 375 bài báo tìm thấy, có 23 bài đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn được đưa vào nghiên cứu. Các yếu tố tiên lượng tái phát sau phẫu thuật được phân tích gồm tuổi, giới, địa dư, hút thuốc, tiền sử phẫu thuật, điều trị nội khoa trước phẫu thuật, bệnh đồng mắc, tổn thương trên CLVT, BCAT trong máu và trong mô polyp. **Kết luận:** Các yếu tố như địa dư, tiền sử phẫu thuật, điều trị nội khoa trước phẫu thuật, các bệnh đồng mắc như hen, viêm mũi dị ứng, cơ địa dị ứng, bệnh hô hấp kích phát do aspirin là các yếu tố

tiên lượng tái phát. Số lượng và tỉ lệ BCAT trong máu, số lượng BCAT trong mô polyp của nhóm tái phát cao hơn nhóm không tái phát.

Từ khoá: Viêm mũi xoang mạn tính có polyp mũi, tái phát sau phẫu thuật, các yếu tố tiên lượng

SUMMARY

CHRONIC RHINOSINUSITIS WITH NASAL POLYPS: A SCOPING REVIEW ON PROGNOSTIC FACTORS OF POST-OPERATIVE IN CHRONIC RHINOSINUSITIS WITH NASAL POLYPS

Background: Chronic rhinosinusitis with nasal polyps is a common chronic disease which is characterized by degenerative polypoid lesions in the nasal cavity and paranasal sinuses. An increasing incidence and a high risk of recurrence after surgery was recorded in this disease. **Objectives:** This study aims to describe the prognosis factors in recurrent chronic rhinosinusitis with nasal polyposis in adults with after surgery. **Subjects and methods:** A literature review were conducted in English peer-reviewed journals from January 2013 to May 2023, searching in Hanoi Medical University library, using Pubmed database with keywords related to chronic rhinosinusitis with recurrent nasal polyps postsurgery. **Results:** Among 375 articles were found, 23 articles were selected. The prognostic factors were analyzed including age, gender, geography, smoke, history of pre-surgery, preoperative treatment, co-morbidities, lesions on CT, eosinophil in blood and in polyp tissue. **Conclusion:** Geography, history of pre-surgery, preoperative treatment, co-morbidities including

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Bạch Mai

Chịu trách nhiệm chính: Lê Nam Khánh

Email: lekhanh145632@gmail.com

Ngày nhận bài: 21.8.2023

Ngày phản biện khoa học: 3.10.2023

Ngày duyệt bài: 26.10.2023