

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ
ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP. HỒ CHÍ MINH



NGUYỄN HỒNG LẬP
ẢNH HƯỞNG THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT
NHÓM PHOSPHO HỮU CƠ ĐẾN
CHẤT LƯỢNG TINH TRỪNG
NGƯỜI PHUN THUỐC TẠI TỈNH AN GIANG

NGÀNH: KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM Y HỌC
MÃ SỐ: 9720601
TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH, Năm 2024

Công trình được hoàn thành tại:

Đại học Y được Thành phố Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. LÂM VĨNH NIÊN

2. PGS.TS. TRẦN THIỆN THUẦN

Phản biện 1:

Phản biện 2:.....

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm
luận án cấp trường

họp tại

vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp
- Thư viện Đại học

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN

1. Nguyễn Hồng Lập, Ngô Quốc Đạt, Nguyễn Văn Chinh, Nguyễn Kim Trung, Ngô Kiến Đức, Lâm Vĩnh Niên, Trần Thiện Thuận, Trần Quang Hiền (2023), “Ứng dụng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS) đánh giá phơi nhiễm thuốc BVTV phosphor hữu cơ người dân phun thuốc tại tỉnh An Giang”, Tạp chí Y học Việt Nam tập 529- tháng 8, số chuyên đề-2023 trang174 -181.
2. Hong Lap Nguyen, Quoc Dat Ngo, Van Chinh Nguyen, Kien Duc Ngo, Vinh Nien Lam, Ngoc Dang Tran, Quang Hien Tran, Tri Dung Phung, Kim Trung Nguyen, Bui Thi Hong Loan, Thien Thuan Tran (2024), “Organophosphat Pesticide Exposure: Effect on Farmers’ Sperm Quality in the MekongDelta,Vietnam”, <https://doi.org/10.1080/1059924X.2024.2337675>. Volume 29, 2024 - Issue 3, Pages 404-414

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

a. Lý do và tính cần thiết của nghiên cứu

Phơi nhiễm và tác động thuốc BVTV nhóm phospho hữu cơ đến chất lượng tinh trùng được biết qua các y văn của thế giới. Trong khi Việt Nam có thế mạnh về nông nghiệp, phơi nhiễm thuốc BVTV là điều không tránh khỏi, đặc biệt là người nông dân tiếp xúc trực tiếp hằng ngày trên cánh đồng, tuy nhiên có rất ít nghiên cứu đánh giá tác hại của thuốc BVTV. Bên cạnh đó các y văn trên thế giới cũng chưa thống nhất kết quả về tác động thuốc BVTV trong vòng 10 năm trở lại đây. Đó là cơ sở chúng tôi chọn đề tài “Ảnh hưởng thuốc BVTV nhóm phospho hữu cơ đến chất lượng tinh trùng của người phun thuốc tại tỉnh An Giang”.

b. Mục tiêu nghiên cứu:

1. Xây dựng quy trình định lượng 6 chất chuyển hóa Dialkylphosphat (DAP) bao gồm Dimethyl phosphat (DMP), Dimethyl diphosphat (DMTP), Dimethyl dithiophosphat (DMDTP), Diethyl phosphat (DEP), Diethyl diphosphat (DETP), Diethyl dithiophosphat (DEDTP) trong nước tiểu bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS).
2. Đánh giá phơi nhiễm thuốc BVTV nhóm OP qua chỉ số Pseudocholinesterase (PChE) trong huyết thanh và 6 chất chuyển hóa DAP trong nước tiểu của người dân phun thuốc tại tỉnh An Giang

3. Đánh giá tác động thuốc BVTV nhóm phospho hữu đến các thông số tình trạng của người dân phun thuốc tại tỉnh An Giang

4. So sánh kết quả DAP, PChE và các thông số tình trạng bước đầu thăm dò các hoạt động giáo dục sức khỏe, hướng dẫn thực hành đúng và bảo hộ lao động của người dân phun thuốc tại tỉnh An Giang.

c. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Mục tiêu 1: Đối tượng nghiên cứu bao gồm các chất chuyển hóa DAP của thuốc BVTV nhóm OP trong nước tiểu. **Mục tiêu 2,3,4:** Người làm nông nghiệp có tham gia phun xịt thuốc BVTV trong vụ mùa tại hai huyện Phú Tân và An Phú tỉnh An Giang

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu thực nghiệm gồm các bước xây dựng quy trình định lượng DAP trong mẫu nước tiểu bằng phương pháp LC-MS/MS.

Nghiên cứu cắt ngang và can thiệp tại cộng đồng : Xét nghiệm DAP nước tiểu, PChE huyết thanh và các chỉ số tình dịch đồ. Can thiệp gồm truyền thông giáo dục sức khỏe, hướng dẫn sử dụng thuốc BVTV đúng và an toàn, cung cấp bảo hộ lao động

d. Những đóng góp mới của NC về mặt lý luận và thực tiễn

Xây dựng quy trình định lượng DAP trong nước tiểu bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS) để đánh giá mức độ phơi nhiễm thuốc BVTV nhóm OP là một yêu cầu cần thiết nhằm định lượng các chất chuyển hoá DAP, đây là một phương pháp đánh giá khách quan, trung thực có độ đặc hiệu cao

Nghiên cứu bước đầu thăm dò hiệu quả các hoạt động can thiệp, đồng thời đánh giá hiệu quả sau can thiệp. Nghiên cứu có ý nghĩa thực tiễn khi góp phần giảm tác động do phơi nhiễm thuốc BVTV nhóm OP trên nông dân ở địa điểm nghiên cứu.

e. Bố cục của luận án

Luận án được bố cục: Đặt vấn đề: 2 trang; Tổng quan tài liệu: 35 trang; Đối tượng và phương pháp: 28 trang; Kết quả: 31 trang; Bàn luận: 29 trang; Kết luận: 2 trang; Kiến nghị: 1 trang

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Định nghĩa, đường phơi nhiễm, thời gian bán hủy

1.1.1 Định nghĩa thuốc BVTV

Thuốc BVTV hay còn gọi là thuốc trừ dịch hại là những chế phẩm có nguồn gốc hóa chất, thực vật, động vật, vi sinh vật và các chế phẩm khác dùng để phòng trừ sinh vật gây hại tài nguyên thực vật. Thế giới cũng quy định thuốc trừ dịch hại còn bao gồm thuốc trừ ruồi, muỗi trong y tế và thú y.^{16,17}

1.1.2 Đường phơi nhiễm thuốc BVTV nhóm OP

Đường phơi nhiễm thuốc BVTV qua da, hô hấp hoặc đường tiêu hoá. Trong môi trường nghề nghiệp, đường phơi nhiễm qua da là quan trọng nhất.²

1.1.3 Thời gian bán hủy thuốc BVTV nhóm OP

Thuốc BVTV không bền có thời gian bán hủy lên tới 30 ngày, trung bình thuốc BVTV có thời gian bán hủy từ 31 - 99 ngày và thuốc khó phân hủy có thời gian bán hủy từ 100 ngày trở lên.²³

1.2 Tổng quan xét nghiệm đánh giá mức độ phơi nhiễm thuốc BVTV

1.2.1 Nguyên lý của phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS)

Phân tích phổ khối lượng (thường được gọi là máy đo phổ khối – Mass Spectrometer) dựa trên sự đo lường trực tiếp tỷ lệ khối lượng theo thể điện tích (ký hiệu là m/z) của những ion trong pha khí của chất phân tích. Những ion của chất phân tích, sinh ra từ nguồn ion của máy, được gia tốc và tách ra bởi bộ phận phân tích trước khi đến bộ phận phát hiện. Thông tin từ phổ khối lượng cho phép định tính (dựa vào khối lượng phân tử, cấu trúc phân mảnh), định lượng (dùng chất chuẩn nội hay chuẩn ngoại) với giới hạn phát hiện từ đinhomol (10^{-12} M) đến femtomol (10^{-15} M).^{42,43}

1.2.2 Xét nghiệm hoạt độ cholinesterase trong huyết thanh

Nguyên tắc:Thực hiện đo theo phương pháp động học. Phương pháp này sử dụng butyrylthiocholine làm cơ chất. Cholinesterase xúc tác phản ứng thủy phân cơ chất butyrylthiocholine tạo thành butyrate và thiocholine, với sự có mặt của kali hexacyanoferrate (III). Thiocholine khử kali hexacyanoferrate (III) (màu vàng) thành kali hexacyanoferrate (II) (không màu). Sự giảm độ hấp thu tỷ lệ thuận với hoạt độ CHE trong mẫu.⁵⁶

1.2.3 Xét nghiệm tinh dịch đồ

Định nghĩa xét nghiệm tinh dịch đồ: Xét nghiệm tinh dịch đồ là một xét nghiệm cơ bản đánh giá khả năng sinh sản tự nhiên

của nam giới. Kết quả xét nghiệm tinh dịch đồ có ý nghĩa quan trọng trong lâm sàng như đưa ra hướng điều trị hiếm muộn, đặc biệt trong điều trị nam học.⁶⁵

Nguyên lý hoạt động: Sự chuyển động của các tinh trùng sẽ được xử lý và chuyển đổi thành các tín hiệu tương tự thông qua các cảm biến quang học (kênh chuyển động và mật độ). Sau đó các tín hiệu này sẽ được chuyển đổi và ghi lại thành các báo cáo thông qua thuật toán độc quyền trên phần mềm của MES.⁶⁷

1.3 Nhận xét phản tổng quan các nghiên cứu

Thứ nhất: Từ kết quả những nghiên cứu trước cho thấy thực trạng đáng lo ngại về thực hành của người dân trong việc sử dụng các phương tiện bảo hộ lao động cá nhân giúp giảm nguy cơ mắc các bệnh do phơi nhiễm với thuốc BVTV lâu ngày. Xuất phát từ nền nông nghiệp tiên tiến đến các nền nông nghiệp trình độ thấp hơn, kiến thức, thái độ, thực hành của người nông dân phun thuốc đều ở mức rất thấp. Các bằng chứng đã củng cố cho giả thuyết về việc thiếu kiến thức của người dân dẫn đến việc thực hành chưa đúng của nông dân. Bên cạnh đó, các bằng chứng về tác động ngắn hạn hay tác động tích lũy lâu dài của việc tiếp xúc thuốc BVTV chưa được công bố chắc chắn. Do đó, cần thực hiện các nghiên cứu ở nhiều cộng đồng khác nhau với nhiều nền nông nghiệp khác nhau, từ đó đưa ra khuyến cáo cụ thể về mối liên quan giữa phơi nhiễm thuốc BVTV và các rủi ro sức khỏe, đồng thời can thiệp thay đổi kiến thức người dân nhằm nâng cao tỷ lệ tuân thủ thực hành phun thuốc đúng tại cộng đồng.

Thứ hai Việt Nam là nước nông nghiệp với khoảng 62% dân số sống ở vùng nông thôn và hơn 50% làm nông nghiệp, trong đó Đồng bằng sông Cửu Long được xem là vựa lương thực chính của cả nước, xuất khẩu gạo và đem lại giá trị GDP cao nhất thì khả năng người nông dân phun thuốc nơi đây phơi nhiễm thuốc BVTV là rất cao, trong khi đó việc đánh giá phơi nhiễm chủ yếu chỉ dựa vào đo lường hoạt độ PChE hoặc AChE mà chưa có phương pháp đánh giá phơi nhiễm khách quan, trung thực và kết quả đáng tin cậy như đo lường nồng độ chất chuyển hoá DAP trong nước tiểu, nên việc xây dựng quy trình định lượng và ứng dụng trong việc giám sát phơi nhiễm trong cộng đồng là vô cùng thiết thực

Thứ ba kết quả các nghiên cứu trên thế giới chưa thống nhất, nên việc triển khai nghiên cứu của chúng tôi góp phần cung cấp minh chứng một cách đầy đủ nhất để các nhà quản lý, nhà cung cấp có cái nhìn toàn diện sâu sắc hơn vấn đề liên quan thuốc BVTV tác động đến sức khỏe mà cụ thể ảnh hưởng đến sức khỏe sinh sản nam giới thông qua đánh giá chất lượng tinh dịch đồ. Đó là cơ sở chúng tôi chọn đề tài và lĩnh vực nghiên cứu.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Thiết kế nghiên cứu

Mục tiêu 1: Nghiên cứu thực nghiệm: Xây dựng quy trình định lượng chất chuyển hóa Dialkyl phosphate. **Mục tiêu 2,3:** Nghiên cứu cắt ngang có phân tích. **Mục tiêu 4:** Nghiên cứu can thiệp tại cộng đồng

2.2 Đối tượng nghiên cứu

Mục tiêu 1: Gồm 6 chất chuyển hóa DAP của thuốc BVTV nhóm OP trong nước tiểu và mẫu nước tiểu giả lập. **Mục tiêu 2,3** là người làm nông nghiệp có tham gia pha, trộn, xịt thuốc BVTV tại hai huyện Phú Tân và An Phú tỉnh An Giang. **Mục tiêu 4** là đối tượng đã tham gia nghiên cứu cắt ngang thuộc huyện Phú Tân.

2.3 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu: Xây dựng quy trình định lượng chất chuyển hoá DAP từ tháng 12/2020 đến tháng 12 năm 2021. Nghiên cứu cắt ngang từ tháng 12/2021 đến tháng 03/2022. Nghiên cứu can thiệp tại cộng đồng từ tháng 03/2022 đến tháng 03/2023

Địa điểm nghiên cứu: Xây dựng quy trình và phân tích mẫu DAP tại Phòng thí nghiệm Viện kiểm nghiệm thuốc TPHCM. Nghiên cứu cắt ngang và can thiệp tại cộng đồng: hai huyện Phú Tân và An Phú của tỉnh An Giang, bao gồm các xã Bình Thạnh Đông, Phú Bình, Hiệp Xương, Vĩnh Lộc, Phú Hữu, Vĩnh Trường, Vĩnh Hậu.

2.4 Cỡ mẫu nghiên cứu

2.4.1 Cỡ mẫu nghiên cứu cắt ngang

Được tính theo công thức chọn mẫu ngẫu nhiên đơn, cỡ mẫu n.

$$n = Z^2_{(1-\alpha/2)} \times \frac{p(1-p)}{d^2} \times DE$$

Cỡ mẫu $n = 503$. Thực tế chúng tôi đã tiến hành khảo sát được 748 đối tượng, trong đó bao gồm 611 đối tượng nhóm phơi nhiễm và 137 đối tượng nhóm chứng.

2.4.2 Cỡ mẫu nghiên cứu can thiệp tại cộng đồng

2.4.2.1 Cỡ mẫu

Áp dụng công thức so sánh 2 trung bình với hệ số đã biết theo các chỉ số ước lượng của một nghiên cứu tương tự tại Malaysia:

$$n_1 \geq \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 (\sigma_1^2 + \sigma_2^2 / r)}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

$$n_2 = n_1 \times r$$

Áp dụng công thức cho cỡ mẫu tối thiểu là 27 người.

2.6 Phương pháp, công cụ đo lường và thu thập số liệu

♦ Thu thập các yếu tố dịch tễ và tính chất công việc

Phòng vấn trực tiếp đối tượng nghiên cứu mặt đối mặt thông qua bộ câu hỏi cấu trúc (phụ lục 3).

♦ **Thu thập chỉ số Cholinesterase (PChE):** Cholinesterase (PChE) được thu thập bằng cách lấy mẫu máu toàn phần. Mẫu máu được ly tâm tách huyết thanh tại địa điểm nghiên cứu, bảo quản ở 4°C trong thùng lạnh và vận chuyển về Bộ môn Xét nghiệm, tiếp tục bảo quản ở -70°C , đến khi phân tích. Thực hiện phân tích trên máy Beckman coulter AU 480.

♦ Thu thập Creatinine trong nước tiểu

Chúng tôi thực hiện định lượng Creatinin theo phương pháp phương pháp Kinetic, phản ứng Jaffe, đo ở bước sóng 450 nm,

mẫu nước tiểu pha loãng tỷ lệ (1/20). Thực hiện trên máy sinh hoá bán tự động Humalyzer 3000.

♦ **Thu thập 6 chất chuyển hoá DAP nước tiểu:**

Mẫu nước tiểu phân tích chất chuyển hóa DAP sẽ được phân tích tại Viện Kiểm nghiệm thuốc TP.HCM sau khi quy trình đã thẩm định đạt yêu cầu theo FDA- MEA. Thực hiện trên hệ thống máy sắc ký lỏng ACQUITY UPLC H-CLASS SYSTEM Waters, khối phổ Xevo TQS MS/MS.

♦ **Thu thập các thông số tinh dịch đồ**

Mẫu tinh dịch đồ của đối tượng nghiên cứu sẽ lấy tại nhà, đối tượng nghiên cứu sẽ được tư vấn, hướng dẫn cách lấy, phát lộ đựng mẫu, mẫu được lấy sau kiêng xuất tinh từ 2 - 3 ngày, sau khi lấy mẫu sẽ đưa đến Trạm y tế xã, ở đây chúng tôi bố trí phòng phân tích mẫu. Mẫu sẽ được phân tích trên thiết bị tự động SQA-iO. Thời gian phân tích tuân thủ theo trình tự các bước thực hiện xét nghiệm tinh dịch đồ theo hướng dẫn của WHO 2021

2.8 Phương pháp phân tích dữ liệu

Nhập liệu: Dữ liệu được nhập bằng EpiData 3.1. Phân tích thống kê bằng phần mềm Stata phiên bản 16.0. Cụ thể như sau:

2.8.1 Phân tích dữ liệu cho mục tiêu 2, 3

Đặc điểm dân số được mô tả bằng trung bình và độ lệch chuẩn và áp dụng kiểm định bằng T độc lập. mô tả bằng tần số và tỷ lệ, và áp dụng kiểm định Fisher's exact.

Nồng độ DAP và các chỉ số chất lượng tinh trùng được mô tả bằng trung vị và tứ phân vị và kiểm định Mann-Whitney.

Mối liên hệ giữa PChE và DAP với các thông số chất lượng tinh trùng được đánh giá đơn biến thông qua tương quan Pearson. Hồi quy tuyến tính đa biến được sử dụng để xác nhận các yếu tố liên quan độc lập. Các biến số độc lập của mô hình được xác định dựa trên phân tích Directed Acyclic Graphs

2.8.2 Phân tích dữ liệu cho mục tiêu 4

Hiệu quả của can thiệp trên PChE, DAP và tinh dịch đồ được đánh giá dựa trên so sánh giữa nhóm can thiệp về mức thay đổi trước-sau can thiệp (Δ) và khoảng tin cậy (KTC) 95%. Sự thay đổi trong nhóm sử dụng kiểm định T bắt cặp. Khả năng gây nhiễu của các yếu tố có phân bố khác nhau của nhóm can thiệp cũng được kiểm tra lại bằng hồi quy tuyến tính.

2.9 Đạo đức trong nghiên cứu

Đạo đức trong nghiên cứu được phê duyệt và chấp thuận về mặt Y đức từ Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học của Đại học Y dược TP. HCM (QĐ số 296/HĐĐĐ- ĐHYD, ngày 16/04/2021)

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ

3.1 Kết quả xây dựng quy trình định lượng chất chuyển hoá

DAP bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối

3.1.1 Kết quả lựa chọn điều kiện khối phổ

Bảng 3.1. Kết quả thể phân mảnh sau khi tối ưu điều kiện

Chất phân tích	m/z	Cone (V)	CE (V)	Mảnh ion
DMP	124,91 > 62,85	46	16	Định lượng

Chất phân tích	m/z	Cone (V)	CE (V)	Mảnh ion
DEP	124,91 > 78,81	46	14	Định tính
	124,91 > 109,86	46	80	Định tính
	152,88 > 124,85	28	8	Định lượng
	152,88 > 78,85	28	18	Định tính
	152,88 > 62,90	28	72	Định tính
DMTP	140,83 > 78,80	10	10	Định lượng
	140,83 > 125,85	10	12	Định tính
	140,83 > 94,87	10	10	Định tính
DETP	168,92 > 94,81	22	16	Định lượng
	168,92 > 140,88	22	10	Định tính
	168,92 > 62,88	22	36	Định tính
DMDTP	156,87 > 141,85	68	12	Định lượng
	156,87 > 111,69	68	20	Định tính
	156,87 > 78,85	68	28	Định tính
DEDTP	184,90 > 110,80	74	16	Định lượng
	184,90 > 156,81	74	10	Định tính
	184,90 > 78,78	74	32	Định tính

3.1.2 Kết quả lựa chọn thành phần và tỷ lệ pha động

Thành phần pha động	Cường độ tín hiệu (cps)					DEDTP
	DMP	DEP	DMTP	DETP	DMDTP	
Nước	682,8	7286,9	1546,4	6457,1	3211,5	2390,1

Bảng 3.2. Khảo sát tỷ lệ pha động

Tỷ lệ nước và methanol	Cường độ tín hiệu (cps)					DEDTP
	DMP	DEP	DMTP	DETP	DMDTP	
90:10	440,3	3019,7	1011,7	4827,0	4366,4	3303,7
75:25	680,1	5176,7	1597,6	6424,9	4099,9	2907,7
50:50	602,8	7506,9	2210,4	7457,1	3341,5	2270,8
30:70	620,1	9547,3	3001,4	7500,4	1945,7	2311,1

Như vậy tỷ lệ pha động với dung môi methanol và nước được lựa chọn là 25:75. Chúng tôi chọn tỷ lệ này cho khảo sát tiếp theo trong quy trình, tuy nhiên tỷ lệ pha động sẽ thay đổi cho phù hợp khi khảo sát cột sắc ký cùng với điều kiện xử lý mẫu.

3.1.3 Kết quả lựa chọn cột sắc ký

Cột InertSustain C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) đạt yêu cầu về hình dạng đỉnh, đáp ứng tín hiệu. Nên chọn cột C18 InertSustain để tiến hành các bước tiếp theo. Điều kiện tối ưu sau khi khảo sát: Cột sắc ký chọn cột InertSustain C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m); Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút; Thể tích tiêm: 5 μ L; Pha động: Methanol – Nước (25:75).

3.1.4 Kết quả lựa chọn phương pháp xử lý mẫu nước tiểu

Phương pháp pha loãng với NH_3

Chúng tôi tiến hành pha loãng với NH_3 với các nồng độ 5%, 10%, 15%. Theo như biểu đồ cho thấy ở nồng độ NH_3 10% thì đáp ứng tín hiệu của các DAP cao nhất. Tìm thấy 6 chất DAP. Tín hiệu đáp ứng đỉnh và hình dạng đỉnh phù hợp để tiến hành định lượng các DAP.

3.1.5 Kết quả lựa chọn chuẩn nội

Chất phân tích	m/z	Cone (V)	CE (V)	Mảnh ion
DBP	209,07 > 78,85	30	16	Định lượng
	209,07 > 152,96	30	12	Định tính
	209,07 > 96,88	30	12	Định tính
FOS	137,00 > 78,77	8	16	Định lượng
	137,00 > 62,70	8	10	Định tính
	137,00 > 79,51	8	46	Định tính

3.2 Kết quả đánh giá phơi nhiễm thuốc BVTV nhóm OP qua các chỉ số PChE và 6 chất chuyển hóa DAP của đối tượng nghiên cứu

3.2.1 Kết quả PChE /HT của đối tượng nghiên cứu

Bảng 3.2. Hoạt độ PChE /HT của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm	Tổng (n=748)	Phơi nhiễm (n=611)	Chứng (n=137)	p
	<i>TB ± DLC</i>	<i>TB ± DLC</i>	<i>TB ± DLC</i>	

PCHe (kUI/L)	6,268 ± 1,477	6,023 ± 1,399	7,362 ± 1,318	<0,001*
	<i>Tần số (%)</i>	<i>Tần số (%)</i>	<i>Tần số (%)</i>	
Giảm dưới 50%	11 (1,5)	11 (1,8)	0 (0)	
Giảm dưới 25%	38 (5,1)	38 (6,2)	0 (0)	<0,001#
Giảm dưới TSBT	139 (18,6)	131 (21,5)	8 (5,8)	
Bình thường	560 (74,9)	431 (70,5)	129 (94,2)	

* Kiểm định T độc lập; # Kiểm định Fisher's exact

3.2.2 Kết quả DAP trong nước tiểu của đối tượng NC

Bảng 3.3. Nồng độ DAP (ng/ml) trong nước tiểu của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm	Tổng (n=748)	Phơi nhiễm (n=611)	Chứng (n=137)	
DAP (ng/ml)	TV (TPV)	TV (TPV)	TV (TPV)	p^{&}
Σ DAP	1318 (663 – 2846)	1672 (801 – 3243)	624 (316 -1134)	<0,001
DMP	0,25 (0 – 5)	0,45 (0 – 4)	0,47 (0 – 7)	0,859
DMTP	791 (268 – 2118)	1004 (367 – 2575)	302 (90 – 663)	<0,001
DMDTP	6 (0 – 30)	7 (0 – 37)	2 (0 – 178)	0,005
DEP	39 (6,5 – 84)	42 (7 – 84)	35 (2 – 84)	0,335
DETP	27 (11 – 54)	29 (12 – 56)	18,8 (6 – 36)	0,002
DEDTP	132	161	95	0,010

	(19 – 381)	(22 – 414)	(10 – 292)	
Ln(Σ	<i>TB ± ĐLC</i>	<i>TB ± ĐLC</i>	<i>TB ± ĐLC</i>	p*
DAP)	7,12 ± 1,22	7,30 ± 1,18	6,31 ± 1,03	<0,001

* Kiểm định T độc lập; & Kiểm định Mann-Whitney

3.3 Kết quả đánh giá tác động thuốc BVTV nhóm OP đến các thông số tình dịch đồ của đối tượng nghiên cứu

Bảng 3.4. Kết quả thông số tình dịch đồ của đối tượng

Đặc điểm	Tổng (n=184) <i>TV (TPV)</i>	Phơi nhiễm (n=116) <i>TV (TPV)</i>	Chứng (n=68) <i>TV (TPV)</i>	p&
Thể tích (ml)	3 (2,2 – 3,8)	3 (2,1 – 3,7)	2,9 (2,2 – 4)	0,237
Mật độ	63 (33 – 101)	50 (22 – 94)	73 (48 – 131)	<0,001
Tổng số lượng	160 (87 – 303)	135 (56 – 252)	225 (141 – 363)	<0,001
% PR+NP	47 (34 – 60)	40 (26 – 51)	58 (46 – 68)	<0,001
% PR	35 (24 – 46)	27 (11 – 38)	46 (36 – 59)	<0,001
% IM	53 (40 – 66)	60 (49 – 74)	42 (32 – 54)	<0,001
% HDBT	8 (5 – 11)	5 (3 – 9)	11 (8 – 15)	<0,001
Điểm số CLTT	82 (32 – 188)	49 (26 – 88)	211 (125 – 373)	<0,001
Ln (điểm số CLTT)	4,30 ± 1,26	3,71 ± 1,13	5,30 ± 0,71	<0,001

& Kiểm định Mann-Whitney

Bảng 3.5. Tương quan giữa hoạt độ PChE với thông số tình dịch đồ

Thông số tình trùng đồ (n=184)	PChE	
	R	p
% tình trùng di động	0,185	0,012
% di động tiến tới	0,188	0,011
% bất động	-0,182	0,013
% hình dạng bình thường	0,197	0,007
Mật độ tình trùng di động (M/ml)	0,171	0,020
Mật độ tình trùng PR (M/ml)	0,174	0,019
Điểm số chất lượng tình trùng	0,197	0,007

R: Hệ số tương quan Pearson

Bảng 3.6. Tương quan giữa DAP với thông số TĐĐ

Thông số tình trùng đồ (n=184)	Ln(Σ DAP)	
	R	p
% tình trùng di động	-0,210	0,004
% di động tiến tới	-0,223	0,002
% bất động	0,215	0,003
% hình dạng bình thường	-0,203	0,006
Mật độ tình trùng di động (M/ml)	-0,179	0,015
Mật độ tình trùng PR (M/ml)	-0,190	0,010
Điểm số chất lượng tình trùng	-0,189	0,010

R: Hệ số tương quan Pearson

3.4 Kết quả so sánh DAP, PChE và các thông số tình dịch đồ bước đầu thăm dò các hoạt động của đối tượng NC

Hiệu quả can thiệp của PChE, DAP

**Bảng 3.21. Đáp ứng thay đổi trước - sau can thiệp của PChE
và DAP (n=86)**

	PChE	Ln(Σ DAP)
Trước, <i>TB $\pm$ DLC</i>	5913,1 $\pm$ 1888,1	3,08 $\pm$ 0,53
Sau, <i>TB $\pm$ DLC</i>	6456,1 $\pm$ 1570,5	2,94 $\pm$ 0,30
Δ (KTC95%)	543,1 (272,4 – 813,7)	-0,14 (-0,22 – -0,06)
p	<0,001 ^{&}	0,001 ^{&}

Δ Khác biệt trước và sau can thiệp; [&] Kiểm định T bất cặp;

Hiệu quả can thiệp tình trùng đồ: Sau can thiệp, phân tích đơn biến cho thấy hiệu quả đối với thông số tỷ lệ tình trùng có hình dạng bình thường. Theo đó, nhóm can thiệp cải thiện hình dạng trung bình từ 8,05% lên 9,98% ứng với mức cải thiện trung bình 1,93%. Nhóm can thiệp đã cải thiện có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng với $p=0,046$.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1 Xây dựng quy trình định lượng chất chuyển hoá DAP trong nước tiểu bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS)

Khảo sát điều kiện khối phổ

Thực nghiệm cho thấy chế độ ion hóa ESI (-) lựa chọn với điều kiện như sau: Điện thế corona (corona voltage): 5 μV ; Tốc độ dòng khí khử dung môi (nitơ): 900 lít/ giờ; Tốc độ dòng khí đầu cone (nitơ): 5 lít/ giờ ; nhiệt độ hóa hơi dung môi: 150 $^{\circ}\text{C}$; Nhiệt độ buồng ion hóa: 400 $^{\circ}\text{C}$ là phù hợp.

Khảo sát thành phần và tỷ lệ pha động, và cột sắc ký

Thực tế chứng minh cột Inertsustain C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm), pha động methanol: nước (25:75), cho thấy các chất được lưu giữ và thời gian phân tích nhanh, cho hiệu quả cao khi áp dụng điều kiện này để định lượng mẫu thử.

Khảo sát phương pháp xử lý mẫu nước tiểu

Chọn phương pháp pha loãng với dung môi và tiêm mẫu trực tiếp, nhận thấy phương pháp này có ưu điểm như cách xử lý mẫu đơn giản, thời gian xử lý mẫu được rút ngắn, thích hợp để phân tích số lượng mẫu lớn. Dung môi được nhóm nghiên cứu lựa chọn là NH_3 , trong quá trình thực nghiệm chúng tôi thử nghiệm với nhiều nồng độ khác nhau, cuối cùng lựa chọn nồng độ pha loãng NH_3 10%, với nồng độ này vừa có vai trò làm loãng nền mẫu đồng thời làm tăng hiệu quả ion hóa của chất phân tích

trong pha động, kết quả đạt được là hiệu quả chiết đáp ứng yêu cầu.

Lựa chọn chuẩn nội

Trong thực nghiệm chọn FOS làm chất chuẩn nội vì FOS có đầy đủ các yêu cầu về chất chuẩn nội phù hợp với chất phân tích. Thực tế cho thấy qua các kết quả hiệu suất chiết, ảnh hưởng nền mẫu, chuẩn nội FOS đều có tín hiệu cao và ổn định.

4.2 Đánh giá phơi nhiễm thuốc BVTV nhóm OP qua các chỉ số PChE, 6 chất chuyển hóa DAP

Hoạt độ PChE trong huyết thanh của đối tượng nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt độ trung bình PChE nhóm phơi nhiễm là 6023 ± 1399 (UI/L) thấp hơn so với 7362 ± 1318 (UI/L) ở nhóm chứng. Kết quả này phù hợp với các y văn được công bố trước đây như NC được thực hiện tại tỉnh Long An cho kết quả PChE trung bình là $6914 \pm 2466,4$ UI/L.

Nồng độ DAP trong nước tiểu của đối tượng nghiên cứu

Kết quả tổng DAP ở cả hai nhóm đạt trung vị là 1318 ng/ml, trong đó chất chuyển hoá được phát hiện cao nhất là DMTP với 791 ng/ml. Các chỉ số DAP gồm DMTP, DMDTP, DETP và DEDTP có sự khác biệt thống kê giữa nhóm phơi nhiễm so với nhóm chứng. Trung vị của DAP ở nhóm phơi nhiễm đạt 1672 ng/ml, cao hơn so với 624 ng/ml ở nhóm chứng với $p < 0,001$.

4.3 Đánh giá tác động thuốc BVTV ảnh hưởng đến các thông số tình dịch đề của đối tượng nghiên cứu

Đánh giá các thông số tình dịch đề của đối tượng NC

Các thông số tình dịch đề như số lượng tinh trùng và khả năng di động tinh trùng, di động tiến tới, tổng số lượng tinh trùng mỗi lần xuất tinh, hình thái bình thường và điểm số chất lượng tinh trùng khác nhau đáng kể giữa hai nhóm ($p < 0,001$). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các y văn trước đây, kết quả này đã chứng minh những tác động tiêu cực ảnh hưởng của việc tiếp xúc nhóm OP đối với chất lượng tinh trùng.

Mối tương quan giữa nồng độ DAP, PChE với thông số tình dịch đề của đối tượng nghiên cứu tại tỉnh An Giang

Chúng tôi nhận thấy PChE có liên quan thuận ở mức độ yếu với các thông số tình dịch. Riêng đối với tỷ lệ tinh trùng bất động thì có tương quan nghịch mức độ yếu. Hệ số tương quan giữa điểm số chất lượng tinh trùng với PChE là 0,197 với $p = 0,007$. Trong đó, tất cả các chỉ số như % tinh trùng di động; % di động tiến tới; % hình dạng bình thường, đều có khác biệt đáng kể. Bên cạnh đó $\text{Ln}(\sum \text{DAP})$ có liên quan nghịch, mức độ yếu với các thông số tình trùng. Riêng tỷ lệ tinh trùng bất động có tương quan thuận mức độ yếu. Hệ số tương quan giữa điểm số chất lượng tinh trùng với $\text{Ln}(\sum \text{DAP})$ là -0,189 với $p = 0,01$.

Hồi quy đa biến các yếu tố liên quan đến CLTT

Sau khi hiệu chỉnh mô hình toàn bộ theo phân tích DAG, hồi quy tuyến tính đa biến cho thấy DAP và PChE là các yếu tố

liên quan độc lập với chất lượng tinh trùng. Mỗi đơn vị PChE gia tăng liên quan đến tăng 1,181 đơn vị của chỉ số chất lượng tinh trùng (KTC 95%: 1,055 – 1,322). Mô hình hiệu chỉnh đã giải thích được 40,8% biến thiên của chỉ số chất lượng tinh trùng.

4.4 So sánh DAP, PChE và các thông số tinh dịch đồ bước đầu thăm dò các hoạt động giáo dục sức khỏe, hướng dẫn thực hành đúng của người dân phun thuốc

Hiệu quả can thiệp trên PChE, DAP, tinh dịch đồ

Đánh giá sau can thiệp PChE có xu hướng tăng ở cả nhóm can thiệp. Cụ thể là nhóm can thiệp tăng trung bình 543UI/L với $p < 0,001$. Ta có thể thấy hiệu quả can thiệp trên đối tượng nghiên cứu trước và sau can thiệp có khác biệt có ý nghĩa thống kê ở nhóm can thiệp, chứng tỏ can thiệp góp phần cải thiện chỉ số PChE. **Hiệu quả can thiệp trên DAP:** Kết quả quá trình can thiệp cho thấy Σ DAP có xu hướng giảm. Giá trị DAP nhóm can thiệp giảm 0,14 Ln và đạt ý nghĩa thống kê với $p = 0,001$. **Hiệu quả can thiệp trên tinh dịch đồ:** Sau khi tiến hành can thiệp và phân tích đơn biến nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy hiệu quả của sự can thiệp thông qua chất lượng tinh trùng của những đối tượng tham gia, cụ thể là chỉ số tỷ lệ tinh trùng có hình dạng bình thường. Bên cạnh đó, nhóm can thiệp cải thiện hình dạng tinh trùng trung bình từ 8,05% lên 9,98% ứng với mức cải thiện trung bình 1,93%.

KẾT LUẬN

♦ Xây dựng quy trình định lượng chất chuyển hoá DAP trong nước tiểu:

- Luận án đã xây dựng quy trình định lượng chất chuyển hoá DAP trong nước tiểu bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS) bước đầu lựa chọn điều kiện thích hợp như kỹ thuật ion hoá ESI (-), chế độ ghi phổ MRM, cột sắc ký InertSustain C18, pha động methanol : nước tỷ lệ 25: 75, phương pháp xử lý mẫu nước tiểu: pha loãng bằng dung môi NH_3 10%, chất chuẩn nội là Fosfomycin.
- Quy trình định lượng đã đạt theo yêu cầu của cơ quan thẩm định của tổ chức US-FDA và EMA bao gồm tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, giới hạn định lượng dưới, khoảng tuyến tính, độ đúng và độ chính xác trong ngày và giữa các ngày

♦ Đánh giá mức độ phơi nhiễm nhóm OP của người dân phun thuốc:

- Xác định được tỷ lệ giảm PChE là 21,5% và trung bình PChE là 6023 ± 1399 (UI/L), có sự khác biệt PChE của hai nhóm và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).
- Xác định được trung vị DAP là 1318 ng/ml. Trong đó chất phát hiện nhiều nhất là DMTP là 1003,8 ng/ml. Sự khác biệt của hai nhóm là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).
- Tìm thấy mối tương quan nghịch giữa DAP với hoạt độ PChE trong huyết thanh, R là -0,129, $p < 0,001$

♦ Đánh giá tác động thuốc nhóm OP đến chất lượng tinh trùng của người dân phun thuốc:

- Xác định các thông số như mật độ, tổng số lượng tinh trùng, tinh trùng di động tiến tới, hình dạng bình thường và điểm số chất lượng tinh trùng có tỷ lệ bất thường lần lượt là (14,7%; 13,8%; 62,9%; 26,7%; 70,7%) so với tiêu chuẩn của WHO lần thứ 5, và sự khác biệt hai nhóm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).
- Tìm thấy mối tương quan thuận, mức độ tương quan yếu giữa tổng số tinh trùng di động, di động tiến tới, hình dạng bình thường, mật độ tinh trùng di động với PChE, R lần lượt là 0,185; 0,188; 0,197; 0,171; 0,197 ứng với $p < 0,05$.
- Tìm thấy mối liên quan giữa (PChE và DAP) với chất lượng tinh trùng. Cụ thể PChE đóng góp 1,181 đơn vị (KTC 95%: 1,055 – 1,322), DAP đóng góp vào 6,253 đơn vị (KTC 95%: 4,472 – 8,749) của chất lượng tinh trùng.

♦ So sánh PChE, DAP, và thông số tinh dịch đồ sau một năm thăm dò các hoạt động giáo dục sức khỏe, thực hành đúng

- Hoạt độ PChE có đáp ứng thay đổi trước-sau can thiệp (với Δ tăng sau can thiệp, KTC95%) là 543,1 (272,4 – 813,7) ($p < 0,001$)
- Nồng độ DAP sau can thiệp có đáp ứng thay đổi trước-sau can thiệp (với Δ giảm sau can thiệp, KTC95%) là -0,14 (-0,22 – -0,06) ($p < 0,001$).
- Thông số tinh dịch đồ có đáp ứng thay đổi trước-sau can thiệp về điểm số chất lượng tinh trùng (Δ tăng sau can thiệp, KTC95%) là 61,1 (7,1 – 115) ($p = 0,028$).

KIẾN NGHỊ

1. Quy trình định lượng DAP trong nước tiểu cần được tối ưu giới hạn định lượng dưới và ứng dụng quy trình trong việc sàng lọc mức độ phơi nhiễm thuốc BVTV cho tất cả các đối tượng có tiếp xúc thuốc như công nhân nhà máy, đại lý thuốc, và người nông dân tiếp xúc gián tiếp trong sản xuất nông nghiệp.
2. Cần tiến hành xây dựng khoảng tham chiếu nồng độ chất chuyển hoá DAP trong nước tiểu của quần thể dân số bình thường để từ đó có cơ sở trong việc so sánh đối chiếu với các nhóm tiếp xúc khác nhau.
3. Tác động thuốc BVTV đến chất lượng tinh trùng cần thực hiện xét nghiệm chuyên sâu ở đối tượng phơi nhiễm mức độ cao như là đo độ phân mảnh DNA tinh trùng.
4. Kết quả là minh chứng để ngành y tế dự phòng có kế hoạch thường xuyên kiểm tra sức khoẻ định kỳ cho đối tượng có nguy cơ cao để từ đó phát hiện bệnh sớm, điều trị kịp thời và can thiệp hiệu quả để phòng ngừa và nâng cao sức khoẻ cho người dân.