

## **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Tiền sản giật là tình trạng bệnh lý do thai nghén gây ra, đây là một rối loạn nghiêm trọng thường biểu hiện sau tuần thứ 20 của thai kỳ, được xác định là có tăng huyết áp, protein niệu hoặc đi kèm theo phù và có thể kèm theo các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng khác [1],[2],[3]. Tiền sản giật xảy ra ở tất cả các nước trên thế giới, cả ở các nước phát triển và đang phát triển, tỷ lệ mắc tiền sản giật ở các thai phụ khoảng 2 - 8%.

Tiền sản giật tác động nhiều đến mẹ và thai nhi, hậu quả có thể gây biến chứng nặng cho mẹ: sản giật, rau bong non, rối loạn đông máu, suy gan, suy thận,...., cho đến nay tiền sản giật vẫn là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong cho mẹ; đối với thai nhi có thể gây hậu quả: thai chậm phát triển, suy thai, ...

Hiện nay, cùng với sự tiến bộ của khoa học kỹ thuật thì các kỹ thuật sinh học phân tử không ngừng được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực y học. Việc phát hiện ra DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ đã mở ra một hướng mới đó là chẩn đoán trước sinh bằng các kỹ thuật không xâm lấn [4]. Nhiều nghiên cứu cho thấy nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương, huyết thanh thai phụ tăng tương ứng với tuổi thai, tăng cao bất thường liên quan đến các biến chứng của thai kỳ (tiền sản giật, đẻ non, thai lệch bội nhiễm sắc thể 21, ...) và được thải trừ nhanh chóng sau sinh [5],[6]. Nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ tăng cao có ý nghĩa lần đầu tiên từ tuần thai thứ 17 và lần thứ 2 vào thời điểm 3 tuần trước khi có triệu chứng lâm sàng của tiền sản giật [7]. Điều này gợi ý khả năng ứng dụng kỹ thuật định lượng DNA phôi thai tự do để sàng lọc và phát hiện sớm các thai phụ có nguy cơ tiền sản giật. Một số nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật Realtime PCR để định lượng được DNA thai từ tuần thứ 5 và 6 của thai kỳ và trên cơ sở kỹ thuật này đã được áp dụng vào chẩn đoán trước sinh không xâm lấn một cách chính xác và hiệu

quả hơn trong việc theo dõi, dự đoán các nguy cơ của cả mẹ và thai nhi trong quá trình thai nghén [8],[9],[10].

Ở Việt Nam, hiện tại chẩn đoán tiền sản giật dựa vào triệu chứng của bệnh: huyết áp cao, protein niệu, ... bên cạnh đó việc theo dõi phát hiện tiền sản giật dựa vào các triệu chứng của bệnh nhân phát hiện ra và tự đến khám: phù, nhức đầu,... Các xét nghiệm sàng lọc định lượng các dấu ấn như  $\alpha$ FP, HCG, uE3 ... nhưng tính đặc hiệu, chẩn đoán và theo dõi dọc không cao [11]. Với mục đích nghiên cứu vai trò của DNA phôi thai tự do trong tiền sản giật để giúp thầy thuốc lâm sàng có thêm một dấu ấn sinh học trong dự báo sớm, theo dõi và tiên lượng tiền sản giật nhằm nâng cao chất lượng cuộc sống, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài "**Nghiên cứu DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bằng kỹ thuật Realtime PCR nhằm dự báo sớm tiền sản giật**" với các mục tiêu sau:

1. Hoàn chỉnh và xây dựng đường chuẩn của kỹ thuật Realtime PCR để định lượng DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ.
2. Đánh giá nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bình thường và thai phụ tiền sản giật.

## **Chương 1. TỔNG QUAN**

### **1.1. TỔNG QUAN VỀ DNA PHÔI THAI TỰ DO LƯU HÀNH TRONG HUYẾT TƯƠNG THAI PHỤ**

#### **1.1.1. Nguồn gốc của DNA phôi thai tự do**

Mặc dù DNA phôi thai trong huyết tương thai phụ đã được biết đến với nhiều ứng dụng tiềm năng nhưng cơ chế sinh học lại còn nhiều điều chưa sáng tỏ. Có khả năng một trong những nguồn gốc của DNA phôi thai tuần hoàn là các tế bào thai có nhân trong máu mẹ [12]. Nghiên cứu của Sekizawa và CS (2000) thấy rằng có một lượng lớn tế bào thai có nhân chết theo chương trình và có thể giải phóng DNA phôi thai vào huyết tương thai phụ [13]. Đó cũng là lý do mà số lượng tế bào thai và nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bị tiền sản giật hoặc có nguy cơ sinh con lệch bội đều tăng cao bất thường [14],[15],[16]. Theo Lo và CS (1999), DNA phôi thai tự do được giải phóng ở các thời kỳ khác nhau không chỉ theo một cách hoặc từ một nguồn gốc [14]. Có nhiều giả thuyết về nguồn gốc mô học của DNA phôi thai tuần hoàn thai phụ, trong đó có 3 khả năng: từ những tế bào thai có nhân lưu hành trong vòng tuần hoàn mẹ, từ rau thai và sự trao đổi trực tiếp của các phân tử DNA.

#### **1.1.1.1. Nguồn gốc của DNA phôi thai tự do từ những tế bào thai có nhân lưu hành trong tuần hoàn mẹ**

Theo Rudin và CS (1997) hàng ngày có sự phân chia  $10^{11}$ – $10^{12}$  tế bào và một lượng tương đương sẽ mất đi để duy trì sự cân bằng mô, do vậy có khoảng 1–10g DNA có thể bị thải trừ mỗi ngày và có mặt trong huyết tương [17]. Còn Bianchi và CS (1997) tiến hành kỹ thuật PCR định lượng dựa trên các tế bào nguyên vẹn trong máu thai phụ đã phát hiện được khoảng 1 tế bào thai có nhân/ml máu toàn phần của thai phụ mang thai bình thường. Từ đó, tác giả

cho rằng các tế bào thai có nhân trong tuần hoàn thai phụ có thể là nguồn gốc mô học thích hợp của DNA phôi thai tự do [12]. Căn cứ vào nghiên cứu của Fournie và CS (1993) và Sekizawa và CS (2000), Bianchi và CS (2004) cho rằng DNA phôi thai tự do được giải phóng vào máu mẹ là do tác động của hệ thống miễn dịch của mẹ đối với các tế bào thai chết theo chương trình [13],[18],[19].

Các tế bào và các acid nucleic của thai trong tuần hoàn thai phụ đều tăng trong các biến chứng thai nghén như tiền sản giật và thai lệch bội, điều này cho phép nghĩ rằng giữa chúng có thể tồn tại một mối liên quan nào đó. Để tìm hiểu về mối liên quan giữa các tế bào hồng cầu có nhân của thai với nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ, Zhong và CS (2002) đã sử dụng máu toàn phần của các thai phụ mang thai nam (gồm: nhóm bình thường và nhóm có nguy cơ tiền sản giật, đẻ non), tiến hành đồng thời 2 phương pháp: lai tại chỗ huỳnh quang để đếm số tế bào thai và kỹ thuật PCR xác định nồng độ DNA phôi thai tự do [20]. Kết quả cho thấy không có mối liên quan giữa các tế bào thai và DNA phôi thai tự do trong các trường hợp này. Điều đó gợi ý rằng, các tế bào hồng cầu có nhân của thai không phải là nguồn gốc của DNA phôi thai tự do trong máu thai phụ có nguy cơ đẻ non, vì trong nhóm này lượng DNA phôi thai tự do tăng một cách có ý nghĩa mà không có sự tăng tương ứng của các tế bào hồng cầu có nhân của thai.

Angert và CS (2003) đã giả sử rằng sau khi lấy máu vào ống nghiệm, các tế bào thai chết theo chương trình sẽ tan rã hết trong ống nghiệm và giải phóng DNA của chúng; hoặc các tế bào thai bị tan rã sau khi tiếp xúc với hệ thống miễn dịch của mẹ và dẫn đến giải phóng DNA phôi thai nhiều hơn; sau đó tiến hành nghiên cứu các mẫu huyết tương thai phụ được lấy 2 lần vào 2 thời điểm khác nhau là 3 tháng đầu và 3 tháng cuối rồi định lượng DNA trên nhiễm sắc thể (NST) Y - dấu ấn của thai và DNA  $\beta$ -globin - dấu ấn của DNA của cả thai

và mẹ ở các thời điểm trong vòng 24 giờ. Kết quả là các thời điểm trong vòng 24 giờ ở cả 2 giai đoạn của thai kỳ đều không có sự tăng DNA phôi thai trong ống nghiệm [21]. Như vậy, những tế bào huyết học của thai ở trong ống nghiệm không phải là nguồn gốc duy nhất và quan trọng nhất của DNA phôi thai tự do.

#### **1.1.1.2. Nguồn gốc của DNA phôi thai tự do từ rau thai**

Rau thai là nguồn gốc hợp lý của DNA phôi thai tự do vì kích thước của nó cũng như các tế bào hoạt động phong phú. Rất nhiều nghiên cứu đã thấy rằng có mối liên hệ giữa nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn mẹ với tuổi thai [13],[22],[23]. Sekizawa và CS (2003) nghiên cứu ở 15 thai phụ (hình thức đẻ là mổ lấy thai) có cùng tuổi thai trong đó gồm 5 thai phụ tiền sản giật và 10 thai phụ bình thường, tác giả đã phân tích các cặp mẫu huyết tương của mẹ và huyết tương của con (lấy từ máu dây rốn của con), sử dụng 7 dấu ấn khác nhau trên các NST 13, 18 và 21 để phân biệt DNA phôi thai tự do với DNA mẹ. Kết quả cho thấy nồng độ trung bình của DNA phôi thai trong huyết tương ở dây rốn (trung vị 0.9%, khoảng 0.2 - 8.4%) thấp hơn đáng kể so với DNA trong huyết tương mẹ (14.3%, 2.3 - 64%) với  $p = 0,007$ ; từ đó, tác giả khẳng định rằng DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ có nguồn gốc từ rau thai [24].

Với mục đích để chứng minh giả thuyết DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương của thai phụ có nguồn gốc chủ yếu từ rau thai, nghiên cứu năm 2007 tiến hành trên hai nhóm: nhóm 1 gồm 15 thai phụ bình thường ở tuần thứ 11 của thai kỳ (11 thai phụ mang thai nam và 04 thai phụ mang thai nữ) và nhóm 2 gồm 9 thai phụ ở tuần thứ 8 của thai kỳ được chẩn đoán là mang thai không phôi (có túi thai nhưng không có phôi thai), trong thực tế, nồng độ DNA phôi thai tự do có xu hướng cao hơn tập trung ở nhóm thai phụ mang thai không phôi, có lẽ ở những thai phụ này thì quá trình các tế bào rau thai chết theo

chương trình tăng cao hơn. Kết quả này ủng hộ giả thuyết rằng rau thai là nguồn chính của các DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ [8].

### **1.1.1.3. Nguồn gốc từ sự trao đổi trực tiếp của các phân tử DNA phôi thai tự do giữa mẹ và thai**

Nghiên cứu của nhiều tác giả khác nhau cho thấy có thể phát hiện được DNA phôi thai tự do trong một số dịch cơ thể khác nhau của mẹ bao gồm dịch ối, nước tiểu, dịch não tủy [25],[26],[27]. Và nồng độ DNA phôi thai tự do trong dịch ối cao gấp 100 - 200 lần so với trong huyết tương thai phụ [28]. Với một số lượng lớn DNA phôi thai tự do trong dịch ối liệu có làm gia tăng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương của thai phụ, tuy nhiên, các nghiên cứu đã cho thấy không có sự tương quan giữa nồng độ DNA phôi thai tự do trong dịch ối và DNA phôi thai tự do trong huyết tương của thai phụ.

Zhong và CS (2006) cũng đã nghiên cứu về mối tương quan của nồng độ của DNA phôi thai tự do trong dịch ối và trong huyết tương thai phụ mang thai dị tật bằng kỹ thuật Realtime PCR, kết quả cho thấy nồng độ DNA phôi thai tự do trong nước ối trung bình là 3978 copy/ml nước ối và trong huyết tương là 96,6 copy/ml huyết tương của thai phụ, tuy nhiên, không có sự tương quan đáng kể giữa nồng độ DNA phôi thai tự do trong dịch ối và huyết tương của thai phụ. Như vậy, màng ối không góp phần vào sự hiện diện của DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ [27]. Một nghiên cứu định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương, trong dịch ối và trong khoang màng ối ở thai phụ tuần thứ 7 - 9, kết quả nồng độ DNA phôi thai tự do trong dịch ối cao nhất, trong khoang màng ối thấp hơn và trong huyết tương thai phụ là thấp nhất [29]. Một số tác giả cho rằng kích thước của DNA phôi thai tự do trong tuần hoàn thai phụ 100 - 300bp, tương đương khoảng 30 - 90kDa, càng khẳng định DNA phôi thai tự do trong dịch ối không thể trao đổi trực tiếp với tuần hoàn thai phụ.

Như vậy, sự có mặt của DNA phôi thai tự do trong dịch ối và trong tuần hoàn là quá trình trao đổi trực tiếp từ thai vào dịch ối và từ thai vào tuần hoàn mẹ. Điều này cho phép nghĩ đến sự trao đổi trực tiếp của các phân tử DNA phôi thai tự do qua rau thai hoặc qua dịch ối. Có thể cho rằng phần lớn DNA phôi thai tự do trong tuần hoàn thai phụ có nguồn gốc từ rau thai, một ngoại lệ có nguồn gốc từ các tế bào thai có nhân trong tuần hoàn thai phụ và có khả năng từ chính thai thông qua trao đổi trực tiếp.

### **1.1.2. Kích thước của DNA phôi thai tự do**

Để phân biệt DNA phôi thai tự do hay DNA có nguồn gốc từ thai phụ lưu hành trong tuần hoàn thai phụ, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành. Năm 2004, Chan KC. và CS đã nghiên cứu để xác định sự phân bố về kích thước của DNA lưu hành trong huyết tương thai phụ bằng kỹ thuật Realtime PCR sử dụng Taqman Probe với cặp mồi của gen leptin (gồm 1 mồi xuôi và 9 mồi ngược với kích thước sản phẩm sau Realtime PCR tương ứng là 105bp, 145bp, 201bp, 280bp, 356bp, 449bp, 576bp, 697bp, 798bp), đồng thời với cặp mồi của gen SRY xác định sự phân bố kích thước của DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ (gồm 1 mồi xuôi và 6 mồi ngược với kích thước sản phẩm sau Realtime PCR tương ứng là: 107bp, 137bp, 193bp, 313bp, 392bp, 524bp). Kết quả cho thấy: 57% DNA của người mẹ có kích thước > 201bp; hầu hết kích thước của DNA phôi thai tự do ngắn  $\leq$  193bp, 20% kích thước > 193bp, 0% kích thước > 313bp và ngắn hơn DNA có nguồn gốc từ của mẹ [30]. Theo nghiên cứu của Li Y. và CS, khi sử dụng cặp mồi của gen SRY thì kích thước của DNA phôi thai tự do < 300bp còn DNA có nguồn gốc từ mẹ có kích thước phân tử >1kb [31]. Nghiên cứu của Fan HC và CS (2010), khi sử dụng cặp mồi của gen SRY xác định được kích thước của DNA phôi thai tự do khoảng 130 - 150bp, nhưng không dài hơn 250bp [32].

### 1.1.3. Thời gian bán hủy $t/2$ của DNA phôi thai tự do

DNA phôi thai tự do chiếm khoảng 11 - 13% của tổng số DNA lưu hành trong tuần hoàn thai phụ. Thời gian xuất hiện DNA phôi thai tự do đầu tiên lưu hành trong tuần hoàn thai phụ tại thời điểm thai 5 - 7 tuần và nồng độ DNA phôi thai tự do tăng dần theo tuổi thai [33]. Tốc độ thay thế của DNA phôi thai tuần hoàn cũng đã được các tác giả nghiên cứu về sự thải trừ DNA phôi thai tuần hoàn sau sinh. Năm 1999, Lo và CS nghiên cứu ở các thai phụ mang thai nam, thấy rằng thời gian bán hủy  $t/2$  của DNA phôi thai tự do khoảng 16,3 phút (từ 4–30 phút) [14]. Nghiên cứu của Smid và CS (2003), nồng độ DNA thai sau sinh rất thấp và không phát hiện được DNA thai sau sinh 2 ngày [34]. Nghiên cứu gần đây của Tsui và CS (2012) có thể phát hiện được DNA thai trong nước tiểu của thai phụ bằng kỹ thuật MPS (massively parallel sequencing) nhưng cũng thải trừ hết sau sinh 2 ngày [35]. Năm 2013, Stephanie và CS thấy rằng tốc độ giải phóng DNA phôi thai tự do vào tuần hoàn thai phụ sau khi sinh xảy ra 2 giai đoạn với cơ chế động học khác nhau: giai đoạn ban đầu nhanh với thời gian bán hủy  $t/2$  khoảng 1h, trong khi giai đoạn chậm với thời gian bán hủy  $t/2$  khoảng 13h, tuy nhiên sau sinh 1-2 ngày cũng không phát hiện được DNA phôi thai tự do [36].

Do đó, với giả thuyết không có những thay đổi đột ngột sự thải trừ DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn mẹ do quá trình chuyển dạ và đẻ, các tác giả tính toán rằng để duy trì tình trạng ổn định, DNA phôi thai tự do có thể được giải phóng tiếp tục vào tuần hoàn mẹ với tốc độ trung bình 2,24–104 bản copy/phút. Với tốc độ giải phóng và thải trừ nhanh chóng, số lượng DNA phôi thai đã cung cấp một bức tranh toàn cảnh và chi tiết theo thời gian về sự sản xuất và thải trừ DNA phôi thai tự do, vì vậy sẽ có ích cho giám sát thai nghén.



#### **1.1.4. Tình hình nghiên cứu DNA phôi thai tự do ở nước ngoài và ở Việt Nam**

##### **1.1.4.1. Ở nước ngoài**

###### **a, DNA phôi thai tự do và tiền sản giật**

Hai năm sau khi phát hiện được có DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương của thai phụ, Lo và CS tiến hành nghiên cứu ở 20 thai phụ tiền sản giật (TSG), sử dụng kỹ thuật Realtime PCR định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do và chứng minh rằng nồng độ DNA phôi thai tự do trong nhóm thai phụ TSG đã tăng gấp 5 lần so với nhóm thai phụ bình thường có tuổi thai tương ứng [14]. Kết quả này tương tự như nghiên cứu của một số tác giả khác như Leung và CS (2001) khi nghiên cứu 18 thai phụ có tuần thai trung bình là 17 tuần (dao động từ 11 - 22 tuần) được định lượng nồng độ DNA phôi thai trước khi có triệu chứng của TSG là 42 copy/ml (dao động 36 – 2375 copy/ml) trong khi đó ở nhóm chứng (33 thai phụ) nồng độ DNA phôi thai tương ứng là 22 copy/ml (dao động từ 4,2 - 300 copy/ml) và Zhong và CS (2002) thấy có sự gia tăng nồng độ DNA phôi thai trong huyết tương của những thai phụ TSG [16],[20]. Một nghiên cứu được tiến hành với cỡ mẫu lớn hơn bao gồm 120 thai phụ bình thường và 120 thai phụ TSG, tác giả cũng thấy rằng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ TSG tăng cao gấp 2-5 lần so với nhóm thai phụ bình thường có cùng tuổi thai tương ứng, đồng thời ở những thai phụ tiến triển thành TSG nồng độ DNA phôi thai tự do tăng đột ngột vào thời điểm tuần 17 và tuần 28, khoảng 3 tuần trước khi có triệu chứng của TSG [37]. Năm 2004, Bianchi và CS phát hiện thấy nồng độ DNA phôi thai tự do trong các mẫu huyết tương tăng lên một cách có ý nghĩa lần đầu tiên từ tuần thai thứ 17 và lần thứ hai vào thời điểm 3 tuần trước khi có triệu chứng lâm sàng của TSG. Tác giả đưa ra giả thuyết rằng: nồng độ DNA tăng lần đầu tiên là do sự hoại tử của rau thai hoặc các tế bào chết theo chương trình, còn nồng độ DNA tăng lần thứ hai

là do các triệu chứng của TSG làm rối loạn các chức năng của mẹ kéo theo rối loạn sự bài tiết DNA phôi thai [19]. Zhong và CS (2004) định lượng được nồng độ DNA phôi thai trước khi có triệu chứng của TSG là 423 copy/ml (dao động 97 - 1642 copy/ml), nhóm chứng: 129 copy/ml (dao động từ 31 - 318 copy/ml) [38]. Trước đó, Lo và CS (1999) cũng đã chứng minh: bên cạnh nồng độ DNA phôi thai tự do tăng cao còn kèm theo tăng lưu hành của những tế bào thai có nhân trong huyết tương thai phụ TSG [14].

Nghiên cứu năm 2005, định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương của các thai phụ bình thường và thai phụ TSG bằng kỹ thuật Realtime PCR sử dụng cặp mồi của gen DYS14 thay vì cặp mồi của gen SRY như các nghiên cứu trước lại thấy rằng nồng độ DNA phôi thai trong huyết tương của nhóm thai phụ TSG tăng cao gấp 10 lần so với nhóm thai phụ bình thường [39]. Ban đầu, các tác giả cho rằng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương của thai phụ tăng cao là do sự kết hợp của rau thai bất thường dẫn tới làm gia tăng nồng độ DNA phôi thai tự do và do chức năng của gan và thận bị suy giảm dẫn tới làm giảm độ thanh thải DNA phôi thai tự do trong tuần hoàn [7],[40]. Một nghiên cứu khác đã chứng minh nồng độ của DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương của nhóm thai phụ TSG cao hơn nhóm thai phụ bình thường ở tuần 17 - 20 của thai kỳ, tuy nhiên, sự khác biệt không đáng kể về nồng độ DNA phôi thai tự do giữa hai nhóm này ở tuần từ 25 - 28 của thai kỳ và không có sự khác biệt ở tuần từ 13 - 16 của thai kỳ [37]. Theo nghiên cứu của Sifakis và CS (2009), ở những thai phụ có nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ tăng ở tuần 11- 13 của thai kỳ thì tiến triển thành TSG nặng ở giai đoạn sau của thai kỳ, tuy nhiên, đối với những thai phụ tiến triển thành TSG nhẹ thì nồng độ DNA phôi thai tự do tương đương với nhóm thai phụ bình thường [9]. Seval M.M. và CS (2015) dùng kỹ thuật Realtime PCR để định lượng DNA phôi thai tự do của 16 thai phụ có thai từ

tuần thứ 28 đến 32 của thai kỳ trong đó có 8 thai phụ bình thường và 8 thai phụ TSG, kết quả cho thấy nồng độ DNA phôi thai ở nhóm thai phụ TSG tăng cao hơn so với nhóm thai phụ bình thường [41].

Như vậy, việc phát hiện và định lượng được các gen bằng kỹ thuật Realtime PCR là một vấn đề quan trọng trong nghiên cứu và trong thiết lập qui trình chẩn đoán lâm sàng. Nồng độ DNA phôi thai tự do tăng có liên quan đến các giai đoạn của quá trình thai nghén và tăng cao trước khi có triệu chứng lâm sàng của TSG nên có giá trị dự báo sớm TSG.

### **b, Một số ứng dụng lâm sàng khác của DNA phôi thai tự do.**

#### **DNA phôi thai tự do và sàng lọc thai lệch bội**

Chẩn đoán không xâm lấn phát hiện thai lệch bội được các nhà khoa học rất quan tâm, đó là do nguy cơ sảy thai mà các quy trình chẩn đoán có xâm lấn (chọc dịch ối, sinh thiết tua rau, ...) có thể gây ra. Dùng các tế bào trong máu toàn phần của thai phụ, Bianchi và CS thấy rằng DNA được giải phóng từ những tế bào thai nguyên vẹn trong máu thai phụ tăng gấp 6 lần khi thai bị lệch bội NST 21 [12]. Và nồng độ DNA phôi thai ở các thai phụ mang thai lệch bội NST 21 và thai nam lệch bội lần lượt là 48,2 copy/ml và 16,3 copy/ml [19]. Số liệu tương ứng của Lo và CS (1999) lần lượt: 46 copy/ml và 23,3 copy/ml [14].

Năm 2003, Wataganara và CS (2003) định lượng DNA phôi thai từ các mẫu huyết thanh được bảo quản đông lạnh của 5 thai phụ mang thai nam bị lệch bội NST 18; 5 thai phụ mang thai nam bị lệch bội NST 13 và 5 thai phụ bình thường để làm chứng (đã được chọn lựa tương ứng về tuổi thai, giới tính thai và thời gian bảo quản). Kết quả cho thấy nồng độ DNA phôi thai huyết thanh trong các trường hợp lệch bội NST 13 là 97,5 copy/ml (dao động 29,2–187,0 copy/ml), lệch bội NST 18 là 31,5 copy/ml (dao động 18,6–77,6 copy/ml) và mẫu chứng là 40,3 copy/ml (dao động 3,7–127,4 copy/ml). Như vậy, nồng độ DNA phôi thai trong các trường hợp lệch bội NST 13 tăng cao trong khi ở

các trường hợp lệch bội NST 18 không khác so với các mẫu chứng. Đồng thời, sàng lọc huyết thanh mẹ trong 3 tháng giữa không phát hiện được thai có nguy cơ lệch bội NST 13 [42]. Vì vậy, định lượng DNA phôi thai tự do nếu được bổ sung vào sàng lọc huyết thanh mẹ cơ bản có thể nâng cao giá trị phát hiện các thai có nguy cơ bị lệch bội NST 13.

### **DNA phôi thai tự do và thai chậm phát triển trong tử cung**

Thai chậm phát triển trong tử cung (IUGR - Insufficiency in Intrauterine Growth Restriction) là một rối loạn phức tạp trong thai kỳ với nhiều nguyên nhân khác nhau. Nghiên cứu của Sekizawa và CS (2003) định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ ở 2 nhóm: nhóm thai phụ mang thai có thai chậm phát triển trong tử cung và nhóm thai phụ mang thai bình thường có cùng tuổi thai, kết quả cho thấy không có sự khác biệt nồng độ DNA phôi thai tự do giữa 2 nhóm này [43]. Một nghiên cứu tiếp theo vào năm 2006 của Smith và CS lại chứng minh rằng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ ở nhóm thai phụ mang thai có thai chậm phát triển trong tử cung tăng cao hơn so với nhóm thai phụ bình thường mà nguyên nhân một phần là do suy rau thai [44]. Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của một số tác giả khác khi nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn [45],[46]. Như vậy, việc định lượng DNA phôi thai tự do trong tuần hoàn thai phụ cũng là một dấu ấn có giá trị gợi ý chẩn đoán những trường hợp thai phụ mang thai mà thai chậm phát triển trong tử cung.

### **DNA phôi thai tự do và đẻ non**

Nghiên cứu năm 2013 gồm 60 thai phụ mang thai tuần từ 28 - 32 của thai kỳ trong đó 30 thai phụ có nguy cơ đẻ non và 30 thai phụ bình thường, định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bằng kỹ thuật Realtime PCR, kết quả cho thấy nồng độ DNA phôi thai tự do của nhóm thai phụ đẻ non tăng gấp 6 lần so với nhóm thai phụ bình thường với  $p < 0,05$ , điều

này có nghĩa: khi nồng độ DNA phôi thai tự do tăng cao bất thường ở tuần từ 28 - 32 của thai kỳ có liên quan với tăng nguy cơ đẻ non ở các thai phụ [47]. Quezada và CS (2014) đã định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong tuần hoàn của thai phụ tại tuần 10 - 19 của thai kỳ, cho thấy việc định lượng DNA phôi thai ở tuần 11 - 13 của thai kỳ không có giá trị dự đoán đẻ non ở thai phụ [48]. Tuy nhiên, có một nghiên cứu làm sáng tỏ về một cơ chế hợp lý giữa đẻ non và nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ, trong nghiên cứu này Scharfe-Nugent và CS (2012) cho rằng DNA phôi thai tự do đóng vai trò gây viêm thông qua TLR-9, nó kích hoạt yếu tố hạt nhân kB thông qua suy thoái I $\kappa$ B nên làm tăng yếu tố tiền viêm là IL-6 trong máu ngoại vi [49].

### **Phát hiện bệnh di truyền liên kết với nhiễm sắc thể X**

Ứng dụng lâm sàng sớm nhất của DNA phôi thai tự do là phát hiện các thai nam có nguy cơ mắc bệnh di truyền liên kết với NST X bằng kỹ thuật không xâm lấn dựa trên việc phát hiện trình tự của gen SRY

Điều trị bằng dexamethason trước khi sinh đã được đề xuất từ năm 1984 để ngăn chặn nam hóa bộ phận sinh dục ở nữ trong trường hợp thai nhi bị tăng sản thượng thận bẩm sinh. Nghiên cứu hồi cứu từ 2002 - 2011 của Tardy Guidolle V. và CS quản lý 258 thai nhi (134 nam và 124 nữ) có nguy cơ mắc bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh, kết quả cho thấy việc xác định được giới tính thai nhi thông qua định lượng DNA phôi thai tự do có trong huyết tương thai phụ có thể cho phép chỉ định điều trị chấm dứt sớm việc điều trị bằng dexamethason đối với những thai phụ mang thai nam và xác định việc chỉ định điều trị bằng dexamethason đối với thai phụ mang thai nữ [50].

Thalassemia là bệnh thiếu máu tan máu di truyền gây ra do giảm hoặc mất hẳn sự tổng hợp của một loại chuỗi globin. Năm 2012, Sirichitayakul và CS, định lượng DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương của thai phụ từ những cặp vợ chồng được chẩn đoán là  $\alpha$ -thalassemia-1, kết quả thấy rằng

sự thay đổi nồng độ DNA phôi thai tự do có giá trị chẩn đoán trước sinh đồng hợp tử  $\alpha$ -thalassemia-1 [51].

#### **1.1.4.2. Ở Việt Nam**

Ở Việt Nam các nghiên cứu về DNA phôi thai tự do để chẩn đoán trước sinh còn hạn chế:

Năm 2007, Nguyễn Thanh Thúy và CS báo cáo về kết quả bước đầu xác định DNA phôi thai trong máu mẹ bằng kỹ thuật nested PCR [52].

Năm 2008, Nguyễn Thanh Thúy và CS đã phát hiện DNA thai từ huyết thanh mẹ bằng kỹ thuật nested PCR - hướng tới một marker mới cho sàng lọc gen [53].

Năm 2010, Nguyễn Thanh Thúy và CS dùng PCR lồng phát hiện DNA phôi thai từ huyết thanh mẹ và ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh [54].

Năm 2014, Triệu Tiến Sang và CS đã bước đầu xây dựng được quy trình chiết tách DNA tự do ứng dụng trong sàng lọc bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh, sàng lọc bệnh teo cơ Duchenne và sự bất đồng nhóm máu Rh giữa mẹ và thai nhi [55].

Tuy nhiên, chưa có tác giả nào nghiên cứu nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ là bao nhiêu ở các quý của thai kỳ? Tăng trong tiền sản giật như thế nào? Chưa có mốc để so sánh cho thai phụ ở Việt Nam. Vì vậy, nghiên cứu vai trò của DNA phôi thai tự do trong TSG để giúp thầy thuốc lâm sàng có thêm một dấu ấn sinh học trong dự báo sớm, theo dõi và tiên lượng TSG nhằm giảm thiểu các biến chứng nặng nề ở thai phụ và thai nhi, giảm chi phí bệnh tật cho xã hội và nâng cao chất lượng cuộc sống là điều cần thiết.

## **1.2. TỔNG QUAN VỀ TIỀN SẢN GIẬT**

### **1.2.1. Khái niệm tiền sản giật**

Tiền sản giật là tình trạng bệnh lý do thai nghén gây ra ở nửa sau của thai kỳ bắt đầu từ tuần thứ 20 của quá trình mang thai. Bệnh thường được biểu hiện

ở hội chứng gồm 3 triệu chứng chính là tăng huyết áp, protein niệu và phù [3],[56].

## 1.2.2. Yếu tố nguy cơ và cơ chế bệnh sinh của tiền sản giật

### 1.2.2.1. Các yếu tố nguy cơ

Trên toàn thế giới, tỷ lệ mắc TSG ở các thai phụ mang thai khoảng 2-8% của tất cả các lần mang thai. Tiền sản giật vẫn là nguyên nhân hàng đầu gây bệnh tật và tử vong mẹ và trẻ sơ sinh trên toàn thế giới [57]. Nguy cơ mắc TSG tương tự nhau ở cả phụ nữ chưa từng sinh đẻ và đã sinh con [58]. Ngoài ra, ở những thai phụ có tiền sử TSG ở lần mang thai trước thì có nguy cơ cao bị TSG trong lần mang thai sau.

Một số bệnh lý làm tăng nguy cơ TSG: tăng huyết áp mạn tính, đái tháo đường, bệnh thận, bệnh béo phì và tình trạng tăng đông máu, ví dụ hội chứng kháng phospholipid, ... Tuổi của thai phụ cũng là một yếu tố nguy cơ đối với TSG [59]. Những trường hợp có tăng khối lượng của bánh rau như đa thai và chửa trứng cũng làm cho thai phụ có khả năng bị TSG tăng lên. Ở đây chưa thấy có mối liên hệ rõ ràng giữa quan hệ huyết thống và tỷ lệ mắc hoặc mức độ nặng của TSG [60]. Tuy nhiên, đã có những nghiên cứu thấy rằng nguy cơ TSG tăng ở những thai phụ có thai chậm phát triển trong tử cung và có tiền sử gia đình TSG, kể cả mẹ chồng của thai phụ [61],[62]. Mặc dù những yếu tố nguy cơ dịch tễ học chưa được hiểu rõ nhưng chúng cũng góp phần tham gia vào cơ chế bệnh sinh của TSG.

**Bảng 1.1. Một số yếu tố nguy cơ của tiền sản giật [63]**

<b>Yếu tố nguy cơ</b>	<b>OR hoặc RR (95%CI)</b>
Hội chứng kháng phospholipid	9.7 (4.3–21.7)
Bệnh thận	7.8 (2.2–28.2)
Tiền sử tiền sản giật	7.2 (5.8–8.8)
Bệnh lupus ban đỏ hệ thống	5.7 (2.0–16.2)

<b>Yếu tố nguy cơ</b>	<b>OR hoặc RR (95%CI)</b>
Sinh lần đầu	5.4 (2.8–10.3)
Tăng huyết áp mạn tính	3.8 (3.4–4.3)
Đái tháo đường	3.6 (2.5–5.0)
Sống ở vùng núi cao so với mặt nước biển	3.6 (1.1–11.9)
Tiền sử gia đình mắc các bệnh lý tim mạch (bệnh tim hoặc đột quỵ ở 2 người thân trở lên)	3.2 (1.4–7.7)
Béo phì	2.5 (1.7–3.7)
Tiền sử gia đình (mẹ hoặc chị/em gái bị TSG)	2.3–2.6 (1.8–3.6)
Tuổi thai phụ > 40	1.68 (1.23–2.29) (chưa sinh lần nào) 1.96 (1.34–2.87) (Đa thai)

#### **1.2.2.2. Cơ chế bệnh sinh**

Tiền sản giật là một hội chứng đa cơ quan được đặc trưng bởi co mạch, thay đổi chuyển hóa, rối loạn chức năng nội mô, hoạt hóa đông máu và làm tăng các đáp ứng viêm. Mặc dù cơ chế gây bệnh chính xác vẫn chưa được hiểu rõ nhưng có những bằng chứng cho thấy TSG chỉ xảy ra khi có sự hiện diện của rau thai: có trường hợp thai phụ TSG khi loại bỏ bào thai các triệu chứng của TSG vẫn tồn tại cho đến khi rau thai được bong ra ngoài; có trường hợp sản giật sau sinh có liên quan đến sót rau trong tử cung và triệu chứng được cải thiện khi nhanh chóng nạo buồng tử cung [64]. Theo các nghiên cứu của Sargent và CS (2006) và Gammill và Roberts (2007), cơ chế bệnh sinh TSG được cho là mô hình rối loạn với 2 giai đoạn: giai đoạn 1 là rau thai bị giảm tưới máu và giai đoạn 2 là biểu hiện đa hệ thống ở mẹ khi rau thai không được tưới máu đầy đủ [65],[66].



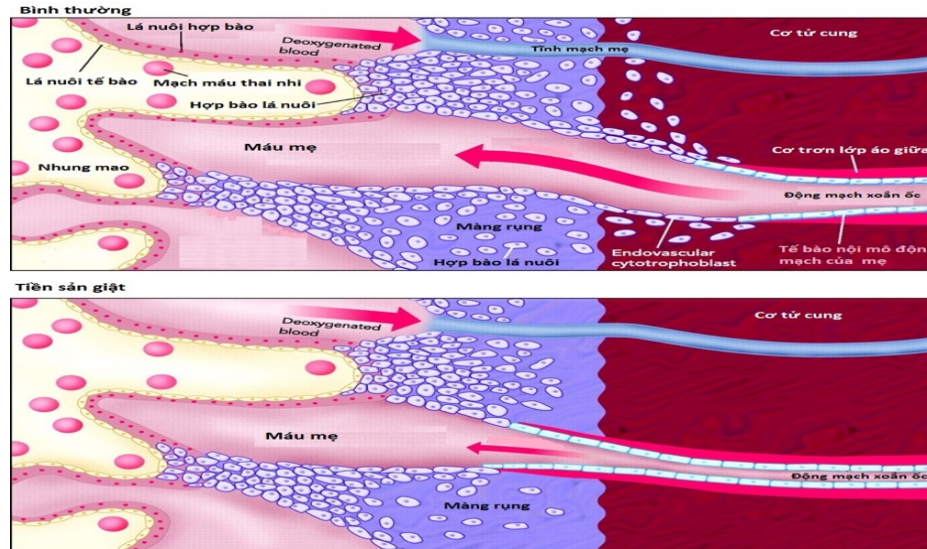
### **Giai đoạn 1. Sự biến đổi của bánh rau khi bị giảm tưới máu**

Bình thường, khi có thai hệ thống tuần hoàn tử cung chịu nhiều thay đổi quan trọng về mặt giải phẫu và chức năng để đảm bảo cung cấp máu cho sự hình thành và phát triển của phôi thai: tăng số lượng các mạch máu ở trong lớp cơ tử cung, tăng kích thước các mạch máu nằm dọc theo lớp cơ tử cung. Quan trọng nhất là phần tận cùng của các động mạch xoắn ốc bị thay đổi cấu trúc do tác dụng của sự xâm lấn của tế bào lá nuôi sau khi trứng làm tổ. Các tế bào lá nuôi phá hủy lớp áo cơ chun giãn của động mạch xoắn ốc ở cơ tử cung và lớp màng rụng, thay thế chúng bằng một lớp sợi xơ, những tế bào lá nuôi xâm lấn thay thế các lớp của động mạch xoắn ốc của người mẹ vì vậy làm cho thành mạch mềm mại và trở thành động mạch tử cung - rau, đường kính của động mạch có thể tăng lên đến 1000  $\mu\text{m}$  và không nhạy cảm với những chất có tác dụng co giãn mạch, có khả năng cung cấp oxy và các chất dinh dưỡng qua rau thai để duy trì thai nhi đang phát triển. Như vậy, ở thai phụ có sự phát triển mạch máu từ hai phía: phía người mẹ là mạch máu trong niêm mạc tử cung và phía thai nhi là mạch máu trong các gai rau, do đó sự tân tạo mạch máu rất quan trọng cho sự hình thành và phát triển của thai nhi trong thai kỳ.

Sự giảm tưới máu cho rau thai là nguyên nhân dẫn tới TSG, điều này đã được hỗ trợ bởi các phát hiện trên lâm sàng, tiến triển của bệnh và thực nghiệm, ví dụ: dùng siêu âm doppler động mạch tử cung phát hiện thấy có hiện tượng tăng đề kháng ở những nhánh xa của động mạch tử cung [67]. Những bệnh liên quan đến vi mạch máu như tăng huyết áp, đái tháo đường cũng làm tăng nguy cơ TSG. Ngoài ra, nghiên cứu trên thực nghiệm ở một số loài khi giảm lưu lượng máu qua rau thai cũng sẽ tạo nên một hội chứng giống như TSG [68].

Nguyên nhân phổ biến của giảm tưới máu rau thai là do bất thường trong quá trình xâm lấn của lá nuôi. Các động mạch xoắn ốc vẫn còn giữ nguyên lớp

áo cơ chun giãn hoặc quá trình này chỉ xảy ra ở đoạn mạch máu nằm ở dưới lớp màng rụng, điều này làm giảm tưới máu cho bánh rau dẫn đến thiếu máu.

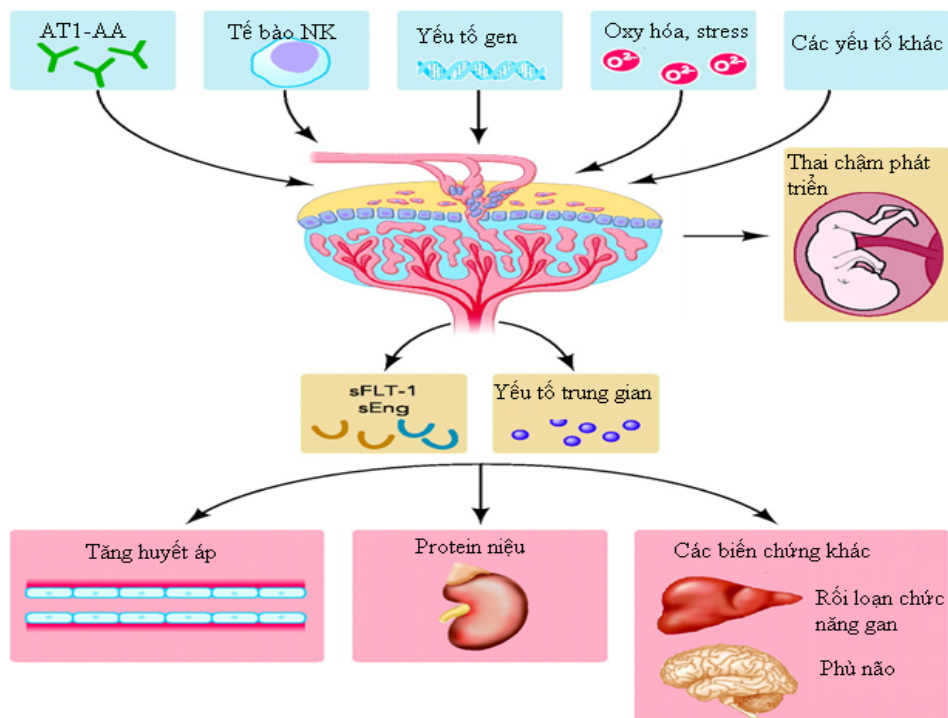


**Hình 1.1. Động mạch xoắn ốc ở thai phụ bình thường và thai phụ tiền sản giật [69]**

## Giai đoạn 2. Biểu hiện đa hệ thống ở mẹ

Nghiên cứu cơ chế bệnh sinh và biến đổi bệnh lý ở phụ nữ khi mang thai, các tác giả thấy ở những thai phụ TSG các thay đổi rõ nét về bệnh lý và sinh lý bệnh đặc trưng xuất hiện rất sớm trước khi có các triệu chứng lâm sàng của TSG, ở những thai phụ này có biểu hiện của co mạch thứ cấp dẫn tới tăng huyết áp, hoạt hóa các yếu tố đông máu do đó làm tăng huyết khối trong lòng mạch và mất nước nội bào từ đó dẫn tới giảm lưu lượng tuần hoàn [70],[71],[72]. Khi nghiên cứu các cơ quan bị tổn thương ở thai phụ TSG thấy có nhiều tổn thương: xuất huyết và hoại tử ở các cơ quan (não, gan, thận, ..), cho thấy ở đây có sự giảm tưới máu cho các cơ quan và tổn thương tế bào nội mô của mao mạch cầu thận nếu kèm theo tăng huyết áp [73],[74]. Bằng chứng tổn thương tế bào nội mô đã được minh chứng bởi các hình thái tổn thương đặc trưng nhất trong TSG, do đó, các nghiên cứu thấy rằng rối loạn chức năng của các tế bào nội mô là yếu tố quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của TSG [75],[76].

Như vậy, cơ chế bệnh sinh của TSG ban đầu là do rối loạn quá trình thay đổi của tuần hoàn tử cung - rau trong thai nghén. Nguyên nhân là do xâm nhập bất thường của tế bào lá nuôi dẫn tới giảm cấp máu cho các gai rau. Sau đó thiếu oxy của bánh rau, rối loạn các chất oxy hóa dẫn tới rối loạn chức năng của hợp bào lá nuôi. Tiếp theo là rối loạn chức năng của nội mạc mạch của người mẹ liên quan đến các chất được giải phóng ra từ bánh rau vào tuần hoàn người mẹ như: các gốc tự do, lipid oxy hóa, các cytokin (IL-6, ....), chính những chất này tạo ra các dấu hiệu lâm sàng ở người mẹ.



**Hình 1.2. Tóm tắt cơ chế bệnh sinh của tiền sản giật**

Nguồn: <http://physiologyonline.physiology.org/content/24/3/147>

### 1.2.3. Một số triệu chứng điển hình của tiền sản giật

#### 1.2.3.1. Triệu chứng lâm sàng

##### Tăng huyết áp (THA)

Tăng huyết áp là triệu chứng cơ bản của TSG, nó liên quan đến việc phân loại và tiên lượng cho cả mẹ và con. Phân độ theo JNC 7 (Joint National

Committee 7) năm 2003 thì THA được xác định khi huyết áp tâm thu (HATT)  $\geq 140\text{mmHg}$  và/hoặc huyết áp tâm trương (HATTr)  $\geq 90\text{mmHg}$ .

### **Phù và tăng cân**

Phù trong TSG biểu hiện liên tục và ngày càng tăng, là loại phù trắng, mềm, ấn lõm, phù không giảm cả khi nằm nghỉ, có nhiều mức độ phù khác nhau: phù nhẹ ở chi đến phù toàn thân, phù đa màng. Đánh giá phù hay không ở thai phụ trong quá trình thai nghén thì ngoài việc khám lâm sàng cần phải cân để theo dõi trọng lượng cơ thể, nếu tăng  $> 500\text{gam}/1$  tuần hoặc  $2250\text{ gam}/1$  tháng thì được coi là phù trong khi mang thai [77].

**Các dấu hiệu khác:** thiếu máu (da xanh, niêm mạc nhợt), triệu chứng thần kinh (đau đầu, rối loạn tri giác), triệu chứng tiêu hóa (đau hạ sườn phải, nôn, buồn nôn), rối loạn thị giác (nhìn mờ, ..), ...

### **1.2.3.2. Xét nghiệm cận lâm sàng**

#### **Protein niệu**

Đây là dấu hiệu quan trọng trong TSG, xuất hiện muộn hơn tăng huyết áp. Protein niệu  $\geq 0,3\text{g}/1$  ở mẫu 24h hoặc  $\geq 0,5\text{g}/1$  ở mẫu ngẫu nhiên là có giá trị chẩn đoán.

#### **Bất thường các xét nghiệm thăm dò:**

- Siêu âm thai (đánh giá sự phát triển của thai, độ trưởng thành của bánh rau), siêu âm Doppler động mạch tử cung (giảm tưới máu tử cung - rau có thể quan sát thấy trước khi có các triệu chứng lâm sàng), ...

- Một số dấu ấn sinh học: PIGF, sFlt-1, tỷ số sFlt-1/PIGF, DNA phôi thai tự do, endoglin hòa tan,... có vai trò trong dự báo sớm TSG trước khi có các triệu chứng lâm sàng [37],[78],[79].

### **1.2.4. Phân loại và chẩn đoán tiền sản giật**

Theo Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị các bệnh sản phụ khoa năm 2015 của Bộ Y tế [80], TSG được phân loại và chẩn đoán như sau:

**Bảng 1.2. Phân loại tiền sản giật**

<b>Triệu chứng</b>	<b>Chẩn đoán</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Huyết áp (HA) <math>\geq</math> 140/90 mmHg sau tuần 20 của thai kỳ.</li> <li>- Protein niệu <math>\geq</math> 0,3g/24 giờ hay que thử nhanh (+).</li> </ul>	Tiền sản giật nhẹ
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Huyết áp <math>\geq</math> 160/110 mm Hg.</li> <li>- Protein niệu <math>\geq</math> 0,5g/24 giờ hay que thử 3+ (2 mẫu thử ngẫu nhiên).</li> <li>- Thiếu niệu, nước tiểu &lt; 500 ml/ 24 giờ.</li> <li>- Creatinin/huyết tương &gt; 1.3 mg/dL.</li> <li>- Tiểu cầu &lt; 100,000/mm<sup>3</sup>.</li> <li>- Tăng men gan ALT hay AST (gấp đôi ngưỡng trên giá trị bình thường).</li> <li>- Acid uric tăng cao</li> <li>- Thai chậm phát triển.</li> <li>- Nhức đầu hay nhìn mờ.</li> <li>- Đau vùng thượng vị hoặc hạ sườn phải.</li> </ul>	Tiền sản giật nặng.

**1.2.5. Tiên lượng**

Tiên lượng cho mẹ phụ thuộc vào thời gian xuất hiện TSG càng sớm trong thai kỳ bệnh càng nặng, tuổi mẹ càng cao bệnh càng nặng.

Tiên lượng cho con: con có thể tử vong do thai kém phát triển, suy thai, thai non tháng do chuyển dạ sớm hay do quyết định chấm dứt thai kỳ.

**1.2.6. Các biến chứng của tiền sản giật****1.2.6.1. Biến chứng với mẹ***Tử vong mẹ*

Theo nghiên cứu của các tác giả cho thấy rằng các nguyên nhân gây tử vong mẹ là do các biến chứng của sản giật, chảy máu, do vỡ bao gan trong hội

chứng HELLP, phù phổi, tan huyết và đông máu rải rác trong lòng mạch, suy thận cấp và biến chứng mắt [81],[82],[83],[84].

Hội chứng HELLP (Hemolysis - Elevated liver enzyme - Low platelet count) là biến thể nặng của TSG bao gồm các triệu chứng tan huyết, suy giảm chức năng gan, giảm tiểu cầu. Đây là một trong những tình trạng bệnh lý nguy hiểm đối với cả mẹ và thai nhi. Chẩn đoán xác định hội chứng HELLP dựa vào các triệu chứng lâm sàng: tăng huyết áp, protein niệu, phù và kèm theo các dấu hiệu cận lâm sàng theo tiêu chuẩn xét nghiệm chẩn đoán hội chứng HELLP của đại học Tennessee, Memphis, Mỹ: vết mờ trên tiêu bản máu, bilirubin toàn phần  $> 20,52 \mu\text{mol/L}$  ( $>1,2\text{mg/dl}$ ), lactic dehydrogenase  $> 700 \text{ U/L}$ , AST  $> 70\text{U/L}$  và tiểu cầu  $< 100\text{G/L}$  [85].

Tại Việt Nam theo một báo cáo về sản giật từ 1991 đến 1995 tại Viện Bảo vệ Bà mẹ Trẻ sơ sinh có 83 thai phụ bị sản giật và chỉ có một số trường hợp bị tử vong chiếm 1,2% [86]. Các nghiên cứu khác cho thấy sản giật kết hợp với tan huyết và đông máu rải rác trong lòng mạch, suy thận cấp, phù phổi cấp là những nguyên nhân chính của tử vong mẹ do TSG.

*Sản giật:* đây là biến chứng nguy hiểm của TSG, thường là do phù não, mạch máu bị co thắt gây tăng huyết áp, có thể xảy ra trong khi có thai, trong chuyển dạ và sau đẻ, là 1 trong 5 tai biến sản khoa và hậu quả để lại rất nặng nề, thai phụ và thai nhi có thể chết ngay trong cơn sản giật nếu không được xử trí kịp thời.

*Rau bong non:* rau bong non, thể nặng nhất là phong huyết tử cung rau hay là hội chứng khối huyết tụ sau rau không những chảy máu do bong rau mà còn có nhồi huyết và chảy máu ở cơ tử cung và các phủ tạng khác: buồng trứng, tụy, thận, phổi... những trường hợp nặng, thai nhi sẽ chết, tình trạng mẹ bị đe dọa nghiêm trọng [87].

*Suy giảm chức năng gan và rối loạn đông máu*

Suy giảm chức năng gan thường hay gặp ở thai phụ TSG đặc biệt là hội chứng HELLP.

*Một số biến chứng khác:*

Suy tim và phù phổi cấp: thai phụ TSG thường kèm theo các rối loạn chức năng thất trái và biến chứng phù phổi cấp do tăng gánh hậu gánh.

Suy thận thường gặp ở những thai phụ có bệnh thận tiềm tàng từ trước không được phát hiện hoặc đối với các trường hợp TSG nặng đặc biệt là trong hội chứng HELLP.

#### **1.2.6.2. Biến chứng với con**

*Tử vong sơ sinh ngay sau đẻ:* tại Việt Nam theo Phan Trường Duyệt và Ngô Văn Tài (1999) tỷ lệ tử vong sơ sinh ngay sau đẻ ở sản phụ TSG là 13,8% [88]. Theo Lê Thị Mai (2004) tỷ lệ này là 6,4% [87].

*Nhẹ cân, chậm phát triển trong tử cung:* trẻ sơ sinh chậm phát triển trong tử cung là những trẻ sinh ra có trọng lượng dưới đường bách phân vị thứ 10 ở cùng tuổi thai tương ứng. Tại Việt Nam, nghiên cứu năm 2010 cho thấy tỷ lệ trẻ đủ tháng nhẹ cân là 30,8% [89].

*Đẻ non:* là hiện tượng gián đoạn thai nghén khi thai có thể sống được (hiện nay theo chuẩn quốc gia là tuổi thai từ 22 đến 37 tuần). Tại Việt Nam, nghiên cứu của Phan Trường Duyệt và Ngô Văn Tài cho thấy tỷ lệ sơ sinh nhẹ cân dưới 2500g chiếm vào khoảng 52% và sơ sinh thiếu tháng chiếm khoảng 24% các trường hợp thai phụ TSG [88]. Nghiên cứu của Ngô Văn Tài ở 320 thai phụ TSG từ năm 1997 - 2000 thì thấy tỷ lệ đẻ non là 36,3% và sơ sinh cân nặng dưới 2500g là 51,5% [90].

*Thai chết lưu trong tử cung:*

Đây là một biến chứng nặng nề của TSG gây nên cho trẻ sơ sinh. Theo nghiên cứu của Sibai B.M. và CS những thai phụ có hội chứng HELLP thì tỷ lệ thai chết trong tử cung là 19,3%; tỷ lệ này tăng lên 41,2% nếu như tuổi thai

nhỏ hơn 30 tuần [91]. Tại Việt Nam, nghiên cứu của Ngô Văn Tài năm 2001 cho thấy tỷ lệ thai chết lưu ở những thai phụ bị TSG là 5,3% [90].

### **1.2.7. Một số dấu ấn sinh học được sử dụng trong chẩn đoán, theo dõi tiền sản giật**

Hiện nay, ngoài dấu ấn sinh học là DNA phôi thai tự do còn một số dấu ấn sinh học đã được nghiên cứu và ứng dụng trong lâm sàng để giúp dự báo sớm, chẩn đoán và theo dõi TSG.

#### **1.2.7.1. PIGF và sFlt1**

PIGF (Placental Growth Factor - yếu tố phát triển rau thai) là một protein thuộc nhóm yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch máu (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF). PIGF đóng vai trò quan trọng đến sự hình thành mạch và xâm lấn lá nuôi của các động mạch xoắn ốc ở thai phụ đặc biệt là trong quá trình hình thành phôi [92]. Nồng độ giảm PIGF giảm đáng kể trong thời gian 5 tuần trước khi khởi phát của bệnh là dấu ấn quan trọng để dự báo sớm tiền sản giật [69],[92],[93].

sFlt-1 (Soluble FMS like tyrosine kinase 1) là một protein có vai trò kháng tân tạo mạch máu. Nghiên cứu thực nghiệm của Burke S.D. và CS (2016) đã chứng minh khi nồng độ của sFlt1 ở chuột TSG tăng cao sẽ làm suy giảm quá trình tổng hợp nitric oxide của tế bào nội mô và thúc đẩy quá trình oxy hóa trong các mạch máu hậu quả làm tăng sự nhạy cảm của mạch máu với angiotensin II và tăng huyết áp. Như vậy, rối loạn chức năng nội mạc làm nồng độ sFlt1 tăng cao có thể là nguyên nhân ban đầu dẫn tới độ nhạy với yếu tố co mạch tăng lên, đây là dấu hiệu đặc trưng của TSG [94]. Một số nghiên cứu đã khẳng định về nồng độ của sFlt-1 tăng cao trong huyết tương thai phụ TSG và có mối liên hệ tỷ lệ thuận giữa nồng độ sFlt-1 và mức độ của TSG [95],[96],[79].



### 1.2.7.2. Pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A)

PAPP-A là protein gồm 1628 aa, có nguồn gốc từ hợp bào lá nuôi, là yếu tố tăng trưởng giống insulin protein protease. Các hệ thống yếu tố tăng trưởng giống insulin được cho là đóng một vai trò quan trọng trong sự tăng trưởng và phát triển của nhau thai. Khi nồng độ của PAPP-A trong huyết tương thấp có liên quan đến sự tiến triển của TSG [97],[98]. Nồng độ của PAPP-A khi bằng hoặc giảm hơn 5% so với bình thường, tương ứng với tình trạng của thai phụ là có thai chậm phát triển trong tử cung, TSG, sinh non và thai chết lưu [99]

### 1.2.7.3. Endoglin hòa tan (Soluble Endoglin - sEng)

Endoglin hòa tan là một glycoprotein xuyên màng, là yếu tố kháng tạo mạch máu, là đồng thụ thể đối với yếu tố tăng trưởng chuyển dạng  $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$  - TGF- $\beta$ ), có nhiều trên màng tế bào của nội mạch máu và trên nhung mao của rau thai [93],[100]. Chức năng của endoglin là truyền tín hiệu TGF- $\beta$  và liên quan đến yếu tố sinh mạch và điều hoà trương lực mạch máu và do đó ảnh hưởng đến sản xuất oxit nitric, giãn mạch, và sự hình thành mao mạch bởi các tế bào nội mô trong ống nghiệm [101],[102]. Nồng độ endoglin tăng cao ở những thai phụ TSG và tăng cao nhất ở thai phụ TSG có hội chứng HELLP (Hemolyse - Elevated liver - low platelets – tan huyết, tăng enzyme gan, giảm tiểu cầu) [103].

### 1.2.7.4. PP-13

PP-13 thuộc nhóm là galectin, một nhóm protein gắn carbohydrat được gọi là b-galactoside lectin trong hợp bào lá nuôi [104],[105]. Ở thai phụ bình thường, nồng độ PP-13 trong huyết tương tăng dần lên theo các quý của thai kỳ nhưng lại giảm bất thường ở tuần thai 11 - 13 của những thai phụ tiến triển TSG [106],[107],[108]. Nghiên cứu của De Muro và CS (2016) định lượng PP-13 ở 62 thai phụ trong đó có 24 thai phụ TSG, protein niệu, cao huyết áp và 38 thai phụ bình thường ở tuần 11 - 13 của thai kỳ, kết quả cho thấy nồng độ PP-13

giảm đáng kể so với nhóm chứng với  $p=0,022$  [109]. PP-13 có giá trị dự báo TSG với độ nhạy tương ứng là 79% với độ đặc hiệu là 90% [110]. Hiện tại, đã có bộ kit thương mại PP-13 (Diagnosis Technologies, Haifa) đã được phát triển để sàng lọc TSG trong 3 tháng đầu tiên của thai kỳ.

Tuy nhiên, không có một xét nghiệm đặc hiệu và duy nhất đủ để chẩn đoán và dự báo sớm tiền sản giật được sử dụng lâm sàng [111]. Xét nghiệm kết hợp của hai hay nhiều dấu ấn sẽ phản ánh một quá trình sinh lý bệnh khác nhau sẽ giúp tăng giá trị dự báo sớm TSG [112]. Các nghiên cứu vẫn tiếp tục tìm kiếm sự kết hợp của các yếu tố nguy cơ của mẹ và các yếu tố nguy cơ của con giúp dự báo sớm TSG bằng kỹ thuật không xâm lấn.

### **1.3. KỸ THUẬT REALTIME PCR ĐỊNH LƯỢNG DNA**

#### **1.3.1. Kỹ thuật PCR**

Năm 1985, Kary Mullis đã phát minh ra kỹ thuật PCR (Polymerase chain reaction) đã mở ra triển vọng phát triển nhanh chóng các kỹ thuật sinh học phân tử [113].

*Nguyên lý của kỹ thuật PCR:* dựa trên đặc tính của DNA polymerase cho phép tổng hợp một đoạn DNA bổ sung với DNA khuôn nhờ đoạn mồi tương ứng. Điều quan trọng là phải tổng hợp được cặp mồi có khả năng lai trong giới hạn của nó và đảm bảo cho việc khuếch đại đoạn DNA mong muốn. Muốn thực hiện được điều đó thì phải biết trình tự nucleotid của đoạn DNA cần khuếch đại này. Số lượng đoạn DNA được khuếch đại trong kỹ thuật này tăng lên theo lũy thừa.

*Các giai đoạn của phản ứng.* Mỗi chu kỳ gồm 3 giai đoạn: giai đoạn biến tính: chuỗi DNA tháo xoắn duỗi ra thành 2 sợi đơn ở nhiệt độ cao; giai đoạn gắn mồi: các mồi đặc hiệu sẽ lai cặp theo nguyên tắc bổ sung vào hai đầu của đoạn DNA đích, giai đoạn kéo dài chuỗi: Taq polymerase điều khiển sự gắn tiếp các nucleotid vào DNA mồi dựa DNA ban đầu làm khuôn. Như vậy, sau n

chu kỳ nhiệt có thể nhận được  $2^n$  bản sao của chuỗi DNA đó. Lượng DNA này đủ để phát hiện bằng điện di trên gel agarose hay lai tạo với các đoạn dò đã được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ hoặc enzym.

*Đọc kết quả:* sau khi thực hiện phản ứng PCR, cần tiến hành điện di trên gel agarose để xác định chất lượng các đoạn DNA.

### **Ưu điểm và nhược điểm của kỹ thuật PCR**

*Ưu điểm.* PCR là một kỹ thuật tương đối đơn giản, có thể phát hiện một đoạn DNA và khuếch đại trình tự này.

- Thời gian thực hiện nhanh, chỉ cần sau vài giờ là có thể khuếch đại được một trình tự đáng quan tâm.
- Thực hiện đơn giản và ít tốn kém (nó được thực hiện trong ống nghiệm plastic nhỏ gồm thành phần tối thiểu được thực hiện đồng thời).
- Yêu cầu về độ tinh sạch của mẫu không cao (vết máu khô, ...)
- Đọc kết quả sau PCR bằng điện di trên gel agarose dựa trên kích thước của sản phẩm PCR và dựa vào cường độ phát sáng của vạch đó so với vạch DNA chuẩn có thể bán định lượng được nồng độ DNA của mẫu thử.

#### *Nhược điểm*

- Sản phẩm PCR thu được từ điểm kết thúc của phản ứng, vì vậy, chỉ phát hiện được điểm cuối. PCR bán định lượng chỉ đọc và định lượng được kết quả số bản sao của DNA đích sau khi hoàn tất khuếch đại, nhưng trong PCR số lượng bản sao cuối cùng không phản ánh được một cách chính xác số lượng DNA đích trong mẫu thử vì đa số các trường hợp số lượng bản sao trong ống phản ứng PCR là số lượng cực đại khi PCR đạt được giai đoạn bình nguyên.
- Độ nhạy thấp, lượng DNA đưa vào phải đủ lớn.
- Ở giai đoạn sau PCR khi hoàn tất khuếch đại đoạn DNA đích, phải tiếp tục điện di sản phẩm PCR trên gel agarose để kiểm tra xem có vạch sản phẩm khuếch đại đúng kích thước mong muốn hay không. Đọc kết quả dựa trên sự

phân biệt kích thước, mà có thể không chính xác và độ phân giải của gel agarose thấp chính vì vậy khó có thể phát hiện được sự thay đổi của sản phẩm sau khi khuếch đại. Đồng thời, kết quả không thể hiện bằng số.

- Khả năng ngoại nhiễm lớn, có thể nhiễm chéo từ mẫu sang mẫu, ví dụ từ mẫu (-) thành (+), ngoại nhiễm các sản phẩm khuếch đại.
- Sử dụng nhuộm gel nhờ Ethidium bromide (đây là chất dễ gây ung thư).

### **1.3.2. Kỹ thuật Realtime PCR**

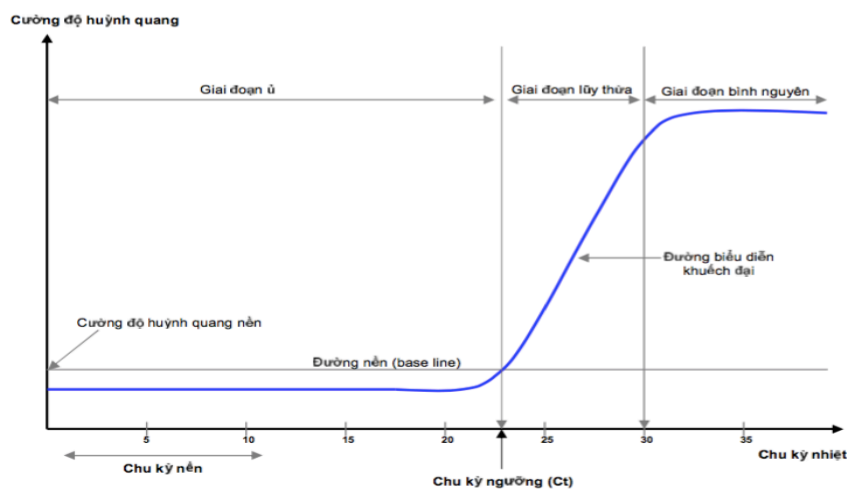
Kỹ thuật Realtime PCR lần đầu tiên được giới thiệu vào năm 1992 bởi Higuchi và CS [114],[115]. Kỹ thuật Realtime PCR dựa trên nền tảng của kỹ thuật PCR nhưng kết quả khuếch đại DNA đích hiển thị được ngay sau mỗi chu kỳ nhiệt của phản ứng [113],[116],[117].

#### **1.3.2.1. Nguyên tắc kỹ thuật Realtime PCR**

Chất huỳnh quang được thêm vào hỗn hợp của phản ứng PCR (mix PCR), chất huỳnh quang này sẽ được chèn vào sợi đôi của DNA hoặc bắt cặp bổ sung với một trình tự đặc hiệu trên DNA đích, nếu trong ống phản ứng này có sự hiện diện sản phẩm khuếch đại của PCR từ DNA đích được nhân bản đủ số lượng để làm cho ống phản ứng phát huỳnh quang khi nhận được nguồn sáng kích thích và sẽ không thể phát được huỳnh quang nếu không có sản phẩm khuếch đại trong ống. Nếu trong ống phản ứng số lượng DNA đích nhiều thì sẽ cần ít chu kỳ nhiệt hơn để đạt đến số lượng bản sao đủ để ống phản ứng cho được tín hiệu huỳnh quang mà máy sẽ ghi nhận được, còn nếu số lượng DNA đích ít hơn thì cần nhiều chu kỳ nhiệt hơn. Tính toán số copy của DNA đích ban đầu có trong ống phản ứng phải dựa vào đường biểu diễn chuẩn (được tạo nên bởi các mẫu chuẩn đã biết trước nồng độ), xác định mối quan hệ giữa chu kỳ ngưỡng với số lượng copy DNA đích ban đầu có trong ống phản ứng [113],[117],[118].

#### **1.3.2.2. Biểu đồ chuẩn của kỹ thuật Realtime PCR**

Phản ứng được thực hiện trên máy Realtime PCR diễn ra qua 2 giai đoạn: giai đoạn ủ và giai đoạn lũy thừa về cường độ huỳnh quang. Giai đoạn ủ: DNA đích đã nhân bản thành các bản sao nhưng do số lượng còn ít nên ánh sáng huỳnh quang phát ra chưa đủ cường độ để máy ghi nhận. Khi số lượng bản sao của DNA đích đạt đến một ngưỡng nhất định thì máy sẽ bắt đầu đo được mức độ huỳnh quang phát ra, từ lúc này cường độ huỳnh quang trong ống phản ứng sẽ tăng gấp đôi sau mỗi chu kỳ nhiệt do số lượng bản sao của DNA đích tăng gấp đôi sau mỗi chu kỳ đây là giai đoạn lũy thừa về cường độ huỳnh quang. Sự tăng trưởng này sẽ chậm dần và đạt đến bình nguyên khi các bản sao của DNA đích không còn gia tăng số lượng theo cấp số 2 nữa do cạn dần dNTP và enzym Taq polymerase không hoạt động hiệu quả nữa, đây là giai đoạn bình nguyên [116],[118].

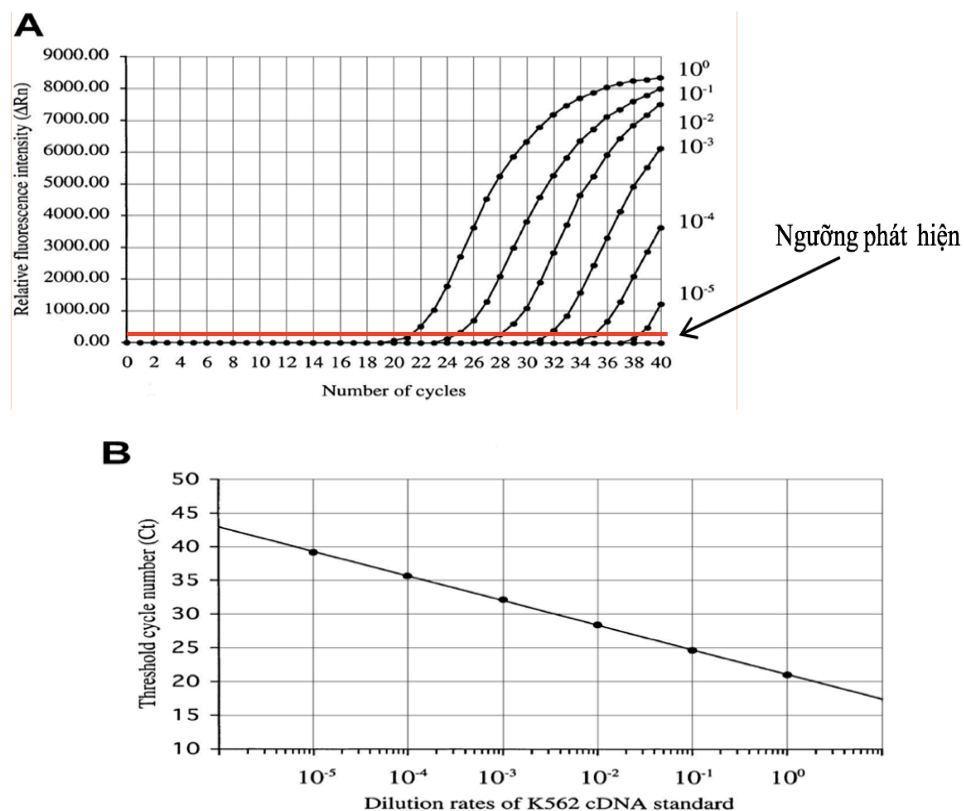


**Hình 1.3. Minh họa biểu đồ đường biểu diễn khuếch đại ghi nhận cường độ huỳnh quang phát ra từ ống phản ứng khi nhận được ánh sáng kích thích vào mỗi chu kỳ nhiệt [113]**

Phân tích một đường biểu diễn khuếch đại của một ống phản ứng sau khi hoàn tất, thông số quan trọng nhất là chu kỳ ngưỡng của một phản ứng Realtime PCR xuất hiện sớm hay muộn (Ct cao hay thấp). Chu kỳ ngưỡng là chu kỳ nhiệt mà tại thời điểm này thiết bị Realtime PCR ghi nhận được tín hiệu huỳnh quang

phát ra từ ống phản ứng bắt đầu vượt qua cường độ huỳnh quang nền. Chu kỳ ngưỡng tùy thuộc vào số lượng bản DNA đích ban đầu có trong ống phản ứng. Đây là một đặc điểm vượt trội của Realtime PCR so với PCR, dựa vào đặc điểm này mà có thể xác định được số copy của tác nhân đích có trong mẫu thử.

Tuy nhiên, để Realtime PCR có thể xác định được chính xác số lượng bản đích ban đầu có trong mẫu thử thì cần phải tiến hành cùng lúc với các mẫu chuẩn đã biết trước số lượng DNA đích ban đầu. Đường biểu diễn thể hiện mối quan hệ giữa chu kỳ ngưỡng với số lượng DNA đích ban đầu có trong các mẫu chuẩn được gọi là đường biểu diễn chuẩn (standard curve). Đây là một đường thẳng tuyến tính đi qua các điểm tọa độ xác định bởi số lượng bản DNA đích ban đầu của từng mẫu chuẩn và chu kỳ ngưỡng tương ứng [113],[116].



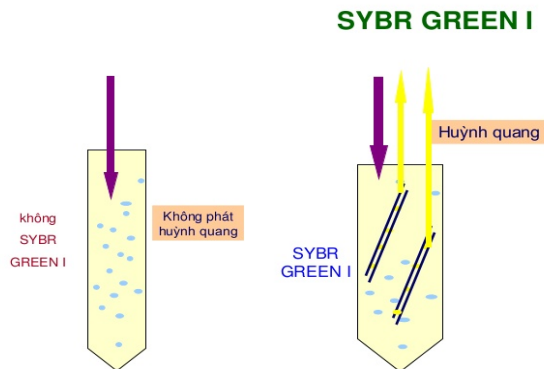
**Hình 1.4. Minh họa biểu đồ khuếch đại thể hiện các đường biểu diễn khuếch đại của mẫu chuẩn và mối quan hệ giữa số lượng bản DNA đích có trong các mẫu chuẩn và chu kỳ ngưỡng tương ứng**

Nguồn: <http://www.bloodjournal.org/content/101/5/1698?sso-checked=true>

### 1.3.2.3. Một số kỹ thuật Realtime PCR thường được sử dụng

#### Kỹ thuật Realtime PCR dùng màu huỳnh quang chèn SYBR green I

SYBR green I thường được sử dụng vì màu huỳnh quang nền rất thấp, khả năng chèn vào sợi đôi DNA cao nhưng không làm cho sợi đôi DNA gắn chặt vào nhau khi bị biến tính.



**Hình 1.5. Tóm tắt cơ chế hoạt động khi sử dụng chất huỳnh quang SYBR green I trong Realtime PCR [113]**

#### *Ưu và nhược điểm khi sử dụng màu huỳnh quang chèn SYBR green I trong Realtime PCR*

##### *Ưu điểm*

Màu huỳnh quang chèn vào sợi đôi DNA có ái lực rất cao khi có sự mặt của sợi đôi DNA và ái lực này là do khả năng chèn của màu vào giữa sợi đôi DNA làm cho sợi đôi DNA này phát được ánh sáng huỳnh quang khi nhận được nguồn sáng kích thích.

##### *Nhược điểm*

Khó phân biệt được sản phẩm đặc hiệu hay không đặc hiệu do SYBR green I là màu chèn cho bất cứ sợi đôi DNA nào nên nó có thể chèn vào sợi đôi DNA không phải khuếch đại đặc hiệu từ DNA đích.

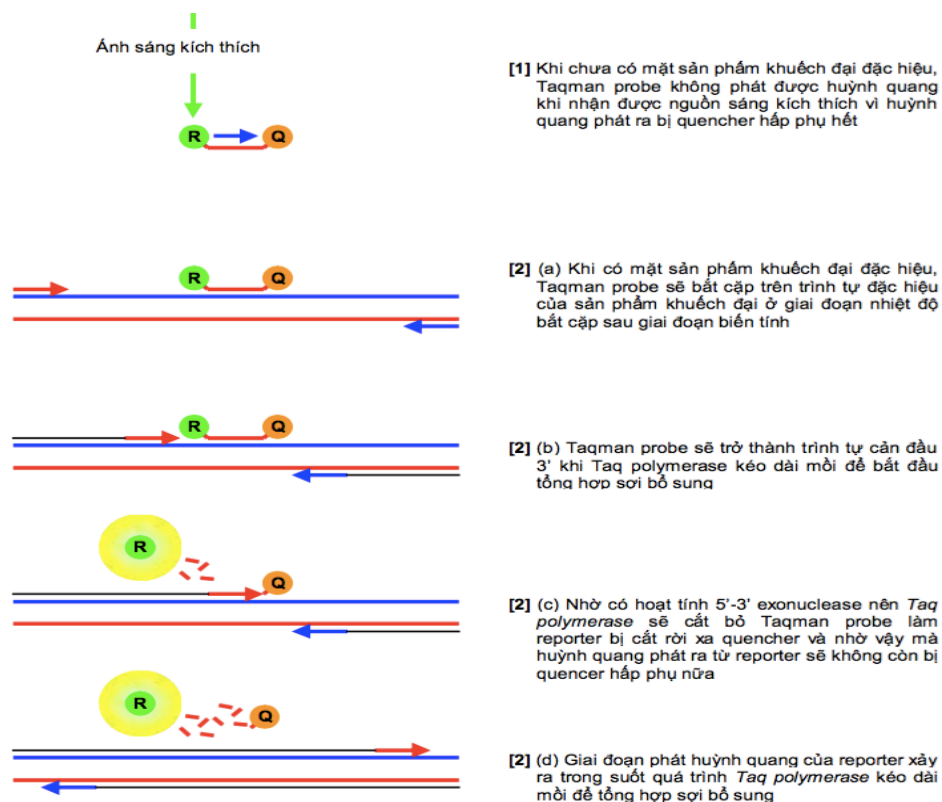
SYBR green I tín hiệu phát huỳnh quang không cao và có thể ức chế PCR, biểu đồ chuẩn khó đạt, sản phẩm khuếch đại có trình tự khác biệt hay/và chiều dài khác biệt cũng rất thấp.

### Kỹ thuật Realtime PCR sử dụng probe làm chất phát huỳnh quang

Probe là những đoạn oligonucleotid sợi đơn có trình tự có thể bắt cặp bổ sung với sản phẩm khuếch đại đặc hiệu từ DNA đích và sự bắt cặp này sẽ phát huỳnh quang khi nhận được nguồn sáng kích thích.

#### *Realtime PCR sử dụng Taqman Probe*

Taqman Probe là những đoạn oligonucleotid sợi đơn có trình tự có thể bắt cặp bổ sung với một trình tự đặc hiệu trên DNA đích, dài khoảng 24 - 30 bases, có đầu 5' gắn chất phát huỳnh quang (reporter) và đầu 3' gắn chất hấp thụ tương ứng (quencher) để hấp thụ được ánh sáng huỳnh quang phát ra từ reporter.



Hình 1.6. Tóm tắt cơ chế hoạt động của Taqman Probe trong Realtime PCR [113]



## ***Ưu và nhược điểm khi sử dụng Taqman Probe trong Realtime PCR***

### ***Ưu điểm***

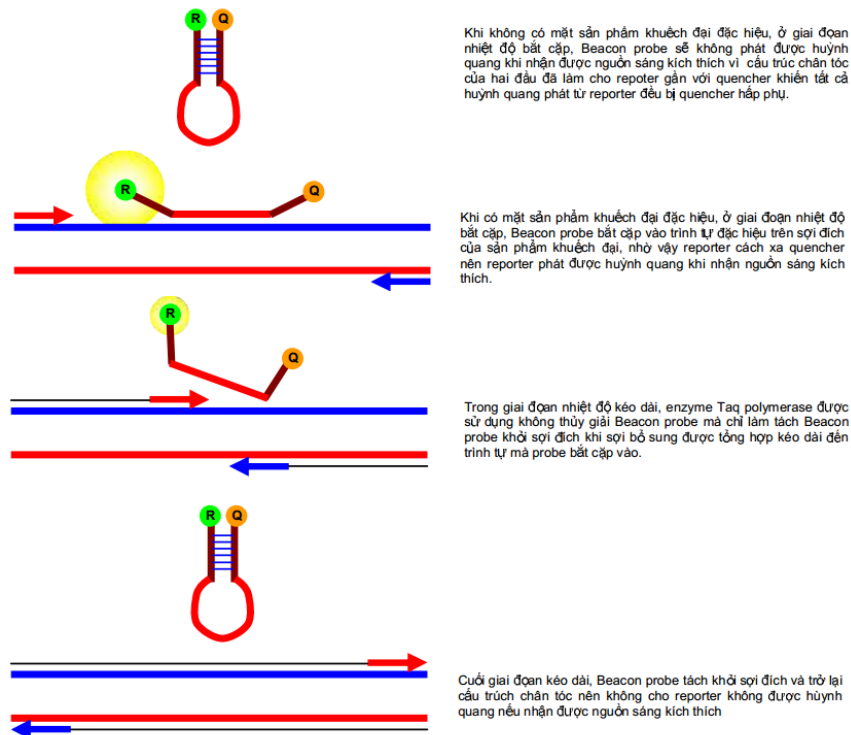
Taqman Probe có trình tự bổ sung với một trình tự đặc hiệu trên DNA đích.

Có thể sử dụng Taqman Probe trong Realtime PCR được thiết kế multiplex.

*Nhược điểm:* Giá thành cao.

### ***Realtime PCR sử dụng Beacon Probe***

Beacon Probe là probe có trình tự dài khoảng 25 - 40 bases, có đầu 5' gắn với reporter và đầu 3' gắn với quencher. Probe có trình tự 15-39 ở giữa là bổ sung với 1 trình tự đặc hiệu trên sợi đơn của DNA đích, còn 2 đầu còn lại của probe có trình tự 5 - 6 bases bổ sung với nhau làm cho probe tạo thành cấu trúc hình kẹp tóc.



**Hình 1.7. Tóm tắt cơ chế hoạt động của Beacon probe trong Realtime PCR [113]**

## ***Ưu và nhược điểm khi sử dụng Beacon Probe trong Realtime PCR***

### ***Ưu điểm:***

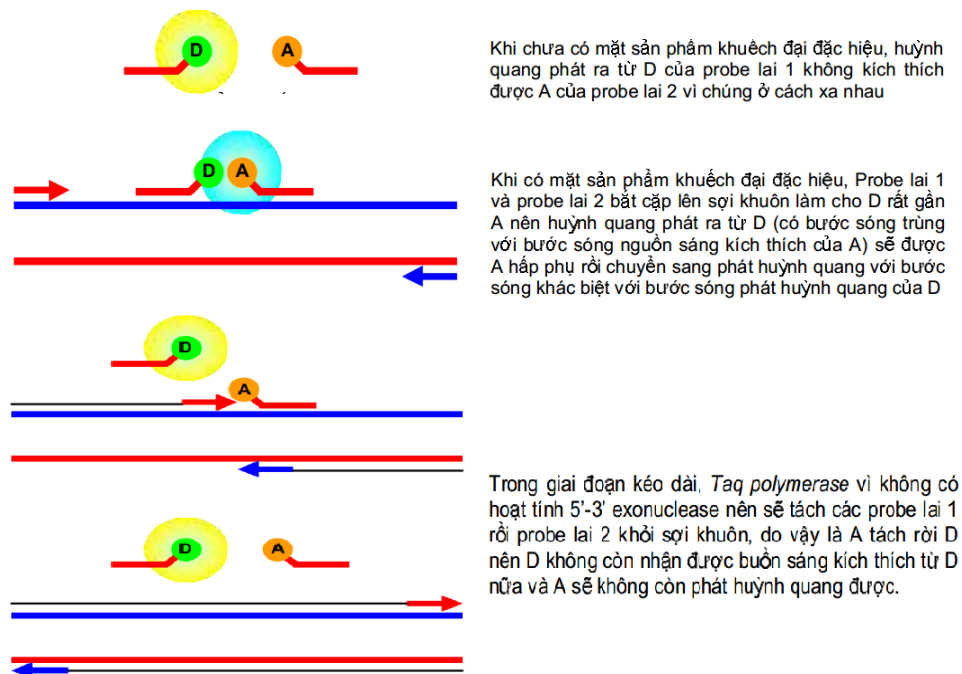
- Rất đặc hiệu.
- Rất tốt để thực hiện multiplex phát hiện cùng lúc nhiều tác nhân đích.

### ***Nhược điểm:***

- Beacon tương đối khó thiết kế vì phải chú ý để có sự bắt cặp đủ mạnh làm cho probe có cấu trúc kẹp tóc.
- Sự bắt cặp của trình tự ở hai đầu cũng không được quá mạnh để không ngăn cản probe bắt cặp vào sợi đích khi có mặt của sợi đích.
- Giá thành cao.

### ***Realtime PCR sử dụng probe lai***

Trong kỹ thuật này dùng 2 probe: probe lai 1 có đầu 3' gắn một chất phát huỳnh quang D (donnor) và probe lai 2 có đầu 5' gắn một chất phát huỳnh quang A (acceptor) [113],[116].



**Hình 1.8. Tóm tắt cơ chế hoạt động của probe lai trong Realtime PCR [113]**

### *Ưu điểm khi sử dụng Probe lai trong Realtime PCR*

Ứng dụng để định lượng tác nhân đích có trong mẫu và định kiểu gen của tác nhân đích hay là định được sự khác biệt chỉ một nucleotid (SNP) của tác nhân đích.

#### **1.3.2.4. Ưu điểm và nhược điểm của kỹ thuật Realtime PCR**

**Ưu điểm.** Kỹ thuật Realtime PCR có những ưu điểm so với PCR bán định lượng như sau:

- PCR bán định lượng chỉ xác định được điểm cuối (cao nguyên) trong khi Realtime PCR thu thập dữ liệu trong giai đoạn tăng trưởng theo cấp số nhân; sự gia tăng tín hiệu huỳnh quang tỷ lệ thuận với số lượng các bản sao DNA được tạo thành, độ chính xác cao; tăng rộng phạm vi phát hiện, có khả năng phát hiện xuống ít nhất là một sự thay đổi 2 lần; không phải xử lý sau khi kết thúc PCR.
- Thời gian phát hiện sản phẩm nhanh, cho phép theo dõi tiến trình phản ứng và biết được lượng DNA đã tạo thành ở từng thời điểm.
- Phân tích kết quả phản ứng PCR mà không cần bước điện di trên gel.
- Phân tích kết quả thông qua tín hiệu huỳnh quang phát ra theo thời gian tại mỗi chu kỳ phản ứng PCR bằng máy tính.
- Tiến hành được nhiều mẫu/ngày.
- Hạn chế tạp nhiễm.
- Độ lặp lại cao trong cùng lần thử nghiệm, giữa các phòng thí nghiệm khác nhau.

Do đó, kỹ thuật Realtime PCR có thể được áp dụng cho các ứng dụng PCR thông thường cũng như các ứng dụng mới. Với khả năng thu thập dữ liệu trong giai đoạn tăng trưởng theo cấp số nhân, nên kỹ thuật này ứng dụng được trên nhiều lĩnh vực: định lượng DNA, RNA; phát hiện tác nhân gây bệnh, kiểu gen,... Realtime PCR là một công cụ mạnh mẽ cho việc định lượng biểu hiện

gen kết hợp cả độ nhạy cao và độ đặc hiệu với hiệu quả phát hiện tín hiệu [36],[116],[119].

### **Nhược điểm**

- Sự gia tăng của DNA trong mỗi chu kỳ sẽ phản ánh một sự gia tăng tỷ lệ thuận với sự phát sáng của huỳnh quang, tuy nhiên, chất huỳnh quang có thể liên kết với các sản phẩm không đặc hiệu hoặc dimer primer, vì vậy, việc thiết kế primer cho Realtime PCR phải rất cẩn thận và phải sử dụng các điều kiện PCR tối ưu để có thể giảm thiểu độ không đặc hiệu này.

- Việc sử dụng các probe cho phép xác định tính đa hình thái và các đột biến. Tuy nhiên, đây là kỹ thuật thực hiện phức tạp, giá thành cao hơn so với các kỹ thuật PCR định lượng khác.

### **1.3.2.5. Ứng dụng của kỹ thuật Realtime PCR**

#### **Định lượng tác nhân đích có trong mẫu thử**

Sử dụng kỹ thuật Realtime PCR có thể biết được số lượng bản DNA đích ban đầu dựa vào sự xuất hiện huỳnh quang của ống phản ứng sớm hay muộn, tức là chu kỳ ngưỡng lớn hay nhỏ. Tùy thuộc vào mục đích cần định lượng mà sử dụng định lượng tuyệt đối hay định lượng tương đối [113].

*Định lượng tuyệt đối.* Phương pháp này đòi hỏi phải biết rõ lượng (thể tích, trọng lượng, ...) của mẫu thử. Thực hiện Realtime PCR của mẫu thử cùng lúc với các mẫu chuẩn đã biết trước số lượng rồi tính ra số copy DNA của tác nhân đích.

*Định lượng tương đối.* Áp dụng phương pháp này khi muốn định lượng được tác nhân đích nhưng không thể cân đo đong đếm được mẫu thử để có được số liệu chính xác, ví dụ: gen tách ra từ mô ung thư, khối u ...

#### **Phát hiện khác biệt SNP và xác định kiểu di truyền**

Sản phẩm khuếch đại của các trình tự đích có thể khác biệt chỉ một nucleotid, gọi là SNP, hay là có thể khác biệt một số nucleotid của một trình tự.

Realtime PCR hoàn toàn có thể ứng dụng để phát hiện khác biệt SNP và xác định kiểu di truyền [113].

**Tóm lại,** việc phát hiện sự có mặt của DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn của thai phụ đã mở ra hướng chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật không xâm lấn. Với sự hiểu biết về DNA phôi thai tự do và các kỹ thuật định lượng DNA thì việc định lượng được DNA phôi thai tự do càng dễ dàng, nhanh chóng và đỡ tốn kém. Kết quả của các nghiên cứu cho thấy nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ tăng lên rõ ràng trước khi khởi phát các triệu chứng lâm sàng của các biến chứng của thai kỳ. DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ nên được coi như là một dấu ấn quan trọng trong sàng lọc trước sinh không xâm lấn để giúp tiên lượng các biến chứng nghiêm trọng liên quan đến thai nghén.

## **Chương 2.**

### **ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

#### **2.1. Đối tượng nghiên cứu**

- Đối tượng nghiên cứu là những thai phụ mang thai từ tuần thứ 12 đến khám tại Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội, Phòng khám Vạn Phúc và Bệnh viện Phụ Sản Trung ương, thời gian từ tháng 1 năm 2013 đến tháng 6 năm 2015, bao gồm 2 nhóm: nhóm thai phụ bình thường và nhóm thai phụ tiền sản giật.

- Chất liệu nghiên cứu: 5ml máu tĩnh mạch được lấy vào ống có chứa EDTA, ly tâm tách huyết tương và bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$  đến khi sử dụng.

#### **2.1.1 Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng nghiên cứu**

- *Nhóm thai phụ bình thường:*

- Không có tiền sử sảy thai, thai lưu, không nạo hút, tiền sử tiền sản giật, sản giật.
- Không có ý định phá thai.
- Trong quá trình mang thai đến lúc sinh con không xuất hiện tiền sản giật.
- Có thể theo dõi được sản phụ cho đến khi sinh và con sinh ra bình thường.

Chúng tôi sử dụng nhóm thai phụ bình thường để chuẩn kỹ thuật và định lượng DNA phôi thai tự do làm nhóm chứng.

- *Nhóm thai phụ tiền sản giật:* bao gồm các thai phụ được chẩn đoán tiền sản giật theo Hướng dẫn chẩn đoán của Bộ Y tế (2015), có ít nhất 2 triệu chứng sau:

- Có tăng huyết áp HATT  $\geq 140\text{mmHg}$ , HATTr  $\geq 90\text{mmHg}$ .
- Protein niệu  $\geq 0,5\text{ g/l}$  ở mẫu nước tiểu ngẫu nhiên hoặc  $0,3\text{ g/l}$  ở mẫu nước tiểu trong 24h.

### **2.1.2 Tiêu chuẩn loại trừ**

Thai phụ có mắc các bệnh từ trước, bao gồm: đa thai, đa ối, thai dị dạng; các thai phụ có các bệnh mắc kèm: bệnh tim, bệnh thận, bệnh tăng huyết áp, bệnh đái tháo đường, bệnh Basedow, bệnh gan.

## **2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu**

### **Cỡ mẫu cho nhóm thai phụ bình thường**

Đối với nhóm thai phụ bình thường, chúng tôi thu thập mẫu máu với cỡ mẫu tối thiểu cho mỗi lứa tuổi của thai kỳ, bao gồm:

30 mẫu máu của thai phụ bình thường có tuổi thai từ tuần 12-15 (quý 1)

30 mẫu máu của thai phụ bình thường có tuổi thai từ tuần 16-25 (quý 2)

30 mẫu máu của thai phụ bình thường có tuổi thai từ tuần 31-35 (quý 3)

Trong thời gian nghiên cứu, chúng tôi thu thập được 101 thai phụ bình thường (41 thai phụ có thai tuần 12 - 15, 30 thai phụ có thai tuần 16 - 25 và 30 thai phụ có thai tuần 31 - 35) làm đối tượng nghiên cứu.

### **Cỡ mẫu cho nhóm thai phụ tiền sản giật**

Đối với nhóm thai phụ tiền sản giật, chúng tôi thu thập mẫu máu với cỡ mẫu tối thiểu là 30 thai phụ được chẩn đoán tiền sản giật có thai tuần 22 - 40 làm đối tượng nghiên cứu.

Trong thời gian nghiên cứu, chúng tôi thu thập được 50 thai phụ tiền sản giật (4 thai phụ có thai tuần 22 - 25 và 46 thai phụ có thai tuần 26 - 40) làm đối tượng nghiên cứu.

## **2.3. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.3.1. Thiết kế nghiên cứu**

Nghiên cứu mô tả cắt ngang. Kết hợp với đối chiếu thực tế (biểu hiện lâm sàng của thai phụ, tình trạng của trẻ khi sinh ra, ...)

### 2.3.2. Các bước tiến hành nghiên cứu

- Thai phụ đến khám được phỏng vấn để thu thập thông tin về đặc trưng cá nhân, tiền sử sản phụ khoa và tiền sử mắc các bệnh trong tiêu chuẩn loại trừ đã nêu ở trên.

- Thu thập các thông tin để đánh giá về các triệu chứng lâm sàng của tiền sản giật như: phù, tăng huyết áp và các biến chứng của mẹ và của thai nhi.

- Thu thập các thông tin để đánh giá về các chỉ số huyết học và hóa sinh cơ bản dựa trên các xét nghiệm của thai phụ.

- Kết hợp lấy máu thai phụ để định lượng DNA phôi thai tự do:

\* Đối với nhóm thai phụ bình thường: lấy máu và định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong máu thai phụ tại các thời điểm thai phụ đến khám (bắt đầu từ tuần thứ 12 của thai kỳ).

\* Đối với nhóm thai phụ tiền sản giật: lấy máu và định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong máu thai phụ bắt đầu tại thời điểm thai phụ đến khám và được chẩn đoán là tiền sản giật.

\* Hoàn chỉnh và xây dựng đường chuẩn của kỹ thuật Realtime PCR sử dụng Taqman Probe để định lượng DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ. Quy trình như sau:

Chiết tách DNA phôi thai và tiến hành nested PCR (PCR lồng):

- PCR kiểm tra DNA (House's keeping): PCR lồng với cặp mồi  $X_1X_3$ ;  $X_2X_3$  (gen trên NST X).

- PCR kiểm tra có mặt đoạn gen cần định lượng: PCR lồng với cặp mồi  $Y_{1.5}Y_{1.6}$ ;  $Y_{1.7}Y_{1.8}$  (gen trên NST Y) để kiểm tra DNA chiết tách và chỉ lựa chọn những mẫu nghiên cứu cho sản phẩm dương tính ở PCR lồng lần này để tiến hành định lượng DNA.

Chọn đoạn trình tự cần quan tâm trên gen SRY (minigene), thiết kế mồi và đầu dò.



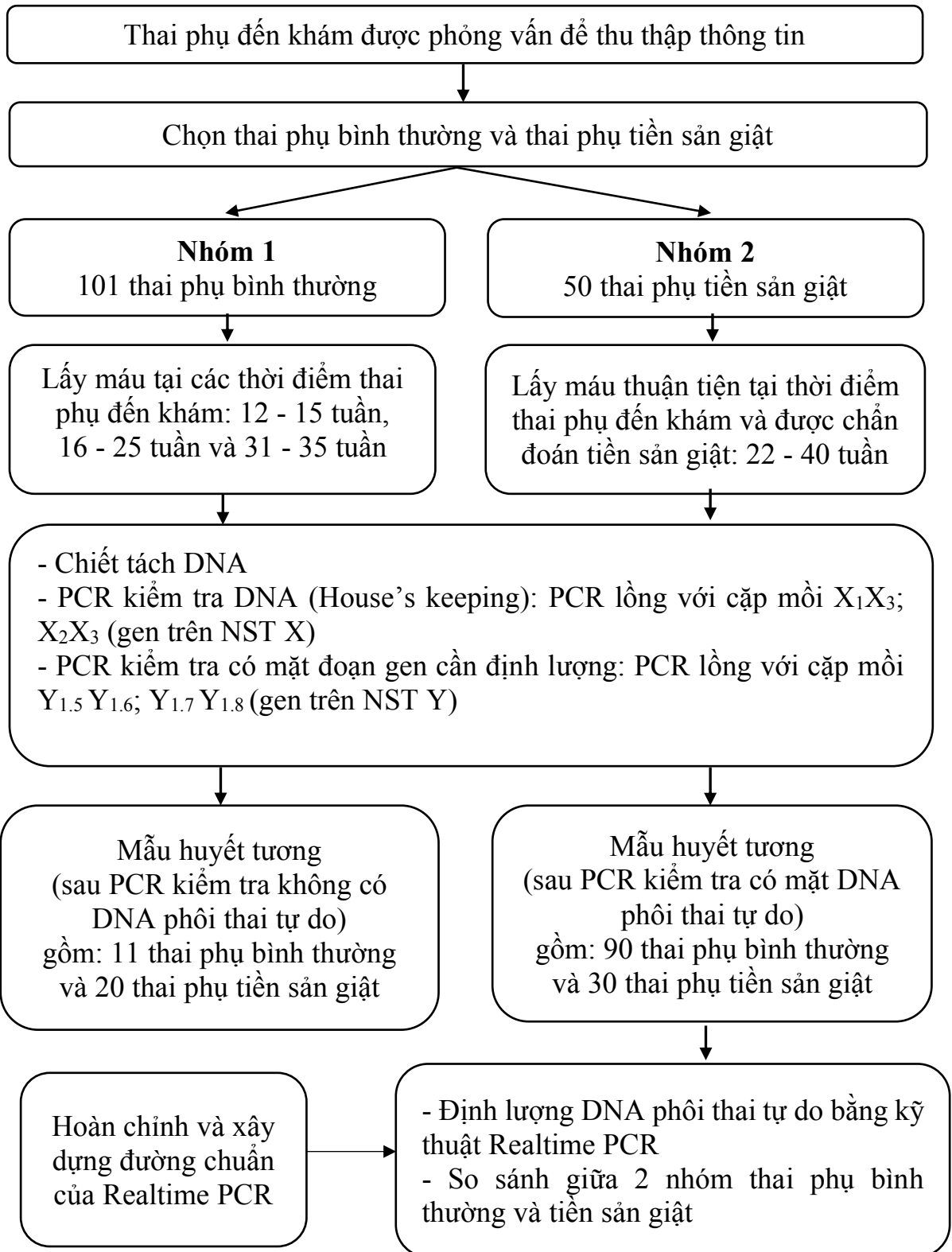
Kiểm tra sơ bộ nồng độ của mẫu chuẩn sau pha loãng bằng PCR với cặp mồi SRY - 245R, SRY - 109F.

\* Tiến hành định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bình thường, thai phụ tiền sản giật bằng kỹ thuật Realtime PCR và xử lý số liệu.

- Xét nghiệm một số yếu tố liên quan đến tiền sản giật: protein niệu, acid uric, các men gan AST và ALT nhằm đánh giá mức độ suy thận và suy gan.

- Theo dõi dọc nếu có biến chứng.

## SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU



### **2.3.3. Các chỉ số cần xác định trong nghiên cứu.**

Các chỉ số lâm sàng:

Tuổi của thai phụ và tuổi thai.

Huyết áp của thai phụ.

Phù.

Các chỉ số cận lâm sàng:

Nhóm chỉ số huyết học cơ bản: số lượng hồng cầu, hematocrit, hemoglobin, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu.

Nhóm chỉ số hóa sinh cơ bản: ALT, AST, ure, creatinin, acid uric; protein niệu.

Nồng độ DNA phôi thai tự do.

### **2.3.4. Kỹ thuật xác định các chỉ số trong nghiên cứu**

#### **2.3.4.1. Một số đặc điểm của thai phụ**

*Tuổi của thai phụ và tuổi thai.*

Tuổi của thai phụ được tính dựa trên giấy khai sinh hoặc chứng minh thư nhân dân. Tuổi thai được xác định dựa trên kết quả siêu âm thai.

*Huyết áp của thai phụ*

Huyết áp của thai phụ được đo bằng huyết áp kế cơ, đo ở tư thế nằm, đo sau khi thai phụ đã nghỉ ngơi ít nhất 15 phút. Khi HATT  $\geq$  140mmHg và/hoặc HATTr  $\geq$  90mmHg thì được coi là tăng huyết áp. Trường hợp biết được huyết áp trước khi có thai, nếu HATT tăng thêm 30mmHg và HATTr tăng thêm 15mmHg được coi là tăng huyết áp.

*Một số chỉ số huyết học và hóa sinh cơ bản:*

Các chỉ số huyết học cơ bản được thực hiện bằng máy đếm tổng trở (máy Abbott RUBY), giá trị bình thường ở nữ là: số lượng hồng cầu:  $3,9-5,8 \times 10^{12}/L$ ; hematocrit: 0,35 - 0,52 L/L; hemoglobin: 120-160 g/L; số lượng bạch cầu:  $4 - 10 \times 10^9/L$ ; số lượng tiểu cầu:  $150 - 450 \times 10^9/L$ .

Các chỉ số hóa sinh cơ bản được thực hiện bằng máy phân tích hóa sinh tự động (Olympus AU640) và xét nghiệm nước tiểu được thực hiện trên máy phân tích nước tiểu (Cobas U411). Giá trị hóa sinh máu bình thường ở nữ: AST  $\leq 37$  U/L/37°; ALT  $< 41$  U/L/37°; acid uric  $< 420$   $\mu\text{mol/L}$ ; creatinin  $< 115$   $\mu\text{mol/L}$ ; ure  $< 8,3$  mmol/L. Xét nghiệm nước tiểu bình thường: protein niệu âm tính.

Các chỉ số huyết học và hóa sinh cơ bản được thu thập dựa trên kết quả xét nghiệm khi thai phụ đến khám thai định kỳ tại Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội, Bệnh viện Phụ Sản Trung ương và Phòng khám Vạn Phúc.

#### **2.3.4.2. Chiết tách DNA phôi thai từ huyết tương thai phụ theo quy trình của Randen I. và CS (2003)**

Lấy máu tĩnh mạch của thai phụ, ly tâm tách huyết tương ở 3000g/phút/10 phút. Bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$  trong eppendorff 1,5ml.

Sau đó tiến hành chiết tách DNA từ huyết tương bằng kit QIAgen Blood Mini Kit (QIAgen, Hilden, Germany) theo quy trình của Randen I. và CS(2003) [120].

- Lấy 20  $\mu\text{l}$  proteinase K cho vào các eppendorff.
- Lấy 200  $\mu\text{l}$  huyết tương cho vào ống eppendorff đã có proteinase K, lắc đều bằng tay.
- Cho thêm 200  $\mu\text{l}$  AL, lắc đều bằng tay, sau đó ủ ở  $56^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút. Lấy ra ly tâm nhẹ.
- Thêm vào 200  $\mu\text{l}$  ethanol tuyệt đối, lắc đều bằng tay.
- Chuyển dịch nổi sang cột, chia làm hai lần bằng đầu côn, ly tâm 6000g/phút/1phút.
- Loại bỏ dịch và lấy cặn cho vào tube mới.
- Thêm 500  $\mu\text{l}$  AW1, ly tâm 6000g/phút/1 phút.
- Lấy lại cặn và đổ dịch nổi trong ống đi.

- Thêm 500  $\mu$ l AW2, ly tâm 20000g/phút/3 phút.
- Lấy lại cặn và làm rỗng tube đổ dịch đi.
- Cho cặn ly tâm 20000 g/phút/1 phút.
- Lấy cặn cho vào ống eppendoff, sau đó cho 200  $\mu$ l AE, để 15 phút ở nhiệt độ phòng.

Ly tâm 6000g/phút/1 phút, sau đó bỏ cặn và lấy dịch hoà tan cất ở  $-20^{\circ}\text{C}$ .

DNA thu được sẽ được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 260/280 nm. Nếu  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1,8 - 2,2$  thì DNA được coi là tinh sạch.

### 2.3.4.3. Tiến hành PCR lồng kiểm tra DNA phôi thai tự do sau chiết tách

\* *Kiểm tra phát hiện có DNA trong huyết tương thai phụ:*

a, Thành phần phản ứng PCR:

- Mix PCR 2X (Promega);
- Các cặp mồi  $X_1X_3$ ,  $X_2X_3$  (gen trên NST X) (Promega);

**Bảng 2.1. Trình tự mồi của phản ứng PCR xác định gen của NST X**

(House's keeping)

Tên	Chức năng	Trình tự	Kích thước sản phẩm PCR(bp)
$X_1$	Mồi xuôi	5'- CCC TGA TGA AGA ACT TGT ATC TC-3'	301 và 261
$X_2$	Mồi xuôi	5'- TCG CCT TTC TCA AAT TCC AAG -3'	
$X_3$	Mồi ngược	5'-GAA ATT ACA CAC ATA GGT GGC ACT-3'	

Các cặp mồi được tổng hợp bởi Integrated ADN Technologies (IDT) theo trình tự khuyến cáo của các nghiên cứu đã được công bố quốc tế.

- Nước cất PCR;
- DNA:

DNA của mẫu chứng (chứng âm: blank, thai phụ bình thường mang thai nữ, thai phụ bình thường mang thai nam);

DNA của mẫu nghiên cứu (thai phụ bình thường và thai phụ TSG)

b, Thực hiện PCR lồng để kiểm tra sự có mặt của DNA có trong huyết tương thai phụ:

- PCR lần 1: với cặp mồi X<sub>1</sub>X<sub>3</sub> cho sản phẩm 301bp

- PCR lần 2: sản phẩm của PCR lần 1 chạy tiếp với cặp mồi X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> cho sản phẩm 261bp.

Điều kiện phản ứng và điện di kiểm tra sản phẩm:

94°C – 3 phút	}	1 chu kỳ
55°C – 1 phút		
72°C – 1 phút		
94°C – 1 phút	}	40 chu kỳ
55°C – 1 phút		
72°C – 1 phút		
94°C – 1 phút	}	1 chu kỳ
55°C – 1 phút		
72°C – 6 phút		
4°C – ∞		

Điện di kiểm tra sản phẩm bằng thạch Agarose 1,5% trong đệm TBE (Promega) pH=8. Đọc kết quả bằng đèn UV sau khi nhuộm Ethidium Bromide.

Đánh giá kết quả: nếu chọn cặp mồi thích hợp cho việc kiểm tra thì các mẫu đều có sản phẩm PCR, đều có DNA trong huyết tương thai phụ, do đây là cặp mồi mã cho gen trên NST X là gen có mặt ở tất cả các thai phụ.

**\* Kiểm tra phát hiện có mặt đoạn gen đặc hiệu cần cho PCR định lượng trong huyết tương thai phụ:**

a, Thành phần phản ứng PCR:

- Mix PCR 2X (Promega);
- Các cặp mồi Y<sub>1.5</sub> Y<sub>1.6</sub>, Y<sub>1.7</sub>Y<sub>1.8</sub> (gen trên NST Y) (Promega);

**Bảng 2.2. Trình tự mồi của phản ứng PCR xác định gen của NST Y**

Tên	Chức năng	Trình tự	Kích thước sản phẩm PCR(bp)
Y <sub>1.5</sub>	Mồi xuôi	5'- CTA GAC CGC AGA GGC GCC CAT - 3'	239
Y <sub>1.6</sub>	Mồi ngược	5'- TAG TAC CCA CGC CTG CTC CGG - 3'	
Y <sub>1.7</sub>	Mồi xuôi	5'- CAT CGA GAG CGT CCC TGG CTT - 3'	198
Y <sub>1.8</sub>	Mồi ngược	5'- CTT TCC ACA GCC ACA TTT GTC - 3'	

Các cặp mồi được tổng hợp bởi Integrated ADN Technologies (IDT) theo trình tự khuyến cáo của các nghiên cứu đã được công bố quốc tế [4],[33].

- Nước cất PCR;
- DNA:

DNA của mẫu chứng (chứng âm: thai phụ đã sinh con và biết được giới tính của thai nhi, thai phụ bình thường mang thai nữ, thai phụ bình thường mang thai nam);

DNA của mẫu nghiên cứu (thai phụ bình thường và thai phụ TSG)

b, Thực hiện PCR lồng để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen đặc hiệu cần định lượng có trong huyết tương thai phụ:

PCR lần 1: với cặp mồi Y<sub>1.5</sub>Y<sub>1.6</sub> cho sản phẩm là 239 bp

PCR lần 2: sản phẩm của PCR lần 1 chạy tiếp PCR lần 2 với cặp mồi Y<sub>1.7</sub>Y<sub>1.8</sub> cho sản phẩm là 198 bp.

- Điều kiện phản ứng và điện di kiểm tra sản phẩm:

94°C – 3 phút	} 1 chu kỳ
55°C – 1 phút	
72°C – 1 phút	

94°C – 1 phút	}	40 chu kỳ
55°C – 1 phút		
72°C – 1 phút		
94°C – 1 phút	}	1 chu kỳ
55°C – 1 phút		
72°C – 6 phút		
4°C – ∞		

Điện di kiểm tra sản phẩm bằng thạch Agarose 1,5% trong đệm TBE (Promega) pH=8. Đọc kết quả bằng đèn UV sau khi nhuộm Ethidium Bromide.

Đánh giá kết quả: nếu chọn cặp mồi thích hợp cho việc kiểm tra thì chỉ những mẫu của thai phụ mang thai nam thì mới có sản phẩm PCR.

#### **2.3.4.4. Tiến hành tạo minigene nồng độ $10^{12}$ copy/ml và xây dựng đường chuẩn theo bậc thang nồng độ từ minigene tạo được**

Các bước để tiến hành:

Bước 1. Chọn đoạn trình tự cần quan tâm của gen SRY

Bước 2. Chuyển đoạn gen trên vào plasmid, sau đó cho vào vi khuẩn *E.coli*, nuôi cấy *E.coli* và thu hoạch sản phẩm là DNA plasmid. Chiết tách DNA plasmid (Quiagen)

Bước 3. Tách chiết kiểm tra trình tự đoạn gen SRY từ plasmid (minigene).

Bước 4. Tiến hành pha loãng minigene theo các nồng độ từ  $10^{12}$  đến  $10^0$  copy/ml, tính toán nồng độ pha loãng từ nanogram sang copy theo định luật Avogadro.

#### ***Thiết kế mồi và probe trên đoạn gen chuẩn bị cho Realtime PCR***

Mồi và đầu dò được thiết kế bởi phần mềm Primer - BLAST và cơ sở dữ liệu được nằm trong cơ sở dữ liệu của Ngân hàng dữ liệu Gen, được tổng hợp



bởi Integrated ADN Technologies (IDT) theo trình tự khuyến cáo của các nghiên cứu đã được công bố quốc tế [22],[121].

**Bảng 2.3. Trình tự môi và mẫu dò của phản ứng Realtime PCR xác định gen SRY của NST Y**

Tên	Chức năng	Trình tự	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
SRY-109F	Môi xuôi	5'- TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC - 3'	137
SRY-245R	Môi ngược	5'- CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T - 3'	
Probe	Đầu dò	5'- AGC AGT AGA GCA GTC AGG GAG GCA GA - 3'	

#### 2.3.4.5. Kiểm tra mẫu chuẩn bằng kỹ thuật PCR

Sử dụng kỹ thuật PCR để kiểm tra sơ bộ nồng độ của mẫu chuẩn:

- Nguyên liệu: mẫu chuẩn pha loãng ở các nồng độ từ  $10^{10}$  đến  $10^1$  copy/ml

- Thành phần:

Mix PCR 2X (Promega)

Các cặp môi SRY-109F và SRY-245R (Promega).

DNA của mẫu chuẩn pha loãng ở các nồng độ từ  $10^{10}$  đến  $10^1$  copy/ml

Nước cất.

- Điều kiện phản ứng và điện di kiểm tra sản phẩm:

94°C – 1 phút	} 40 chu kỳ
55°C – 1 phút	
72°C – 1 phút	
4°C – ∞	

Điện di kiểm tra sản phẩm bằng thạch Agarose 1,5% trong đệm TBE (Promega) pH=8. Đọc kết quả bằng đèn UV sau khi nhuộm Ethidium Bromide.

#### **2.3.4.6. Xây dựng đường chuẩn của Realtime PCR định lượng DNA phôi thai tự do**

Trước khi tiến hành định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bằng kỹ thuật Realtime PCR, tiến hành kỹ thuật Realtime PCR với các mẫu chuẩn đã được pha loãng để xây dựng đường biểu diễn chuẩn (biểu đồ chuẩn).

- Thành phần phản ứng:

Mix PCR 2X (Promega);

Các cặp mồi SRY-109F và SRY-245R (Promega);

Probe (Promega);

H<sub>2</sub>O;

Mẫu chuẩn (minigene) đã được pha loãng ở các nồng độ từ 10<sup>10</sup> đến 10<sup>0</sup> copy/ml.

- Điều kiện phản ứng Realtime PCR:

94°C - 3 phút

94°C - 1 phút

55°C - 1 phút

72°C - 6 phút

} x 40 chu kỳ

4°C-α.

- Đọc kết quả: đánh giá biểu đồ chuẩn có đạt tối ưu dựa vào 2 thông số: hệ số tương quan  $R^2 \geq 0,99$  và hiệu quả khuếch đại E%: 90 - 105%.

#### **2.3.4.7. Định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bằng kỹ thuật Realtime PCR**

- Nguyên liệu:

Mẫu chuẩn đã được pha loãng ở các nồng độ từ  $10^{10}$  đến  $10^0$  copy/ml [116],[113]

Mẫu blank (nước cất)

DNA phôi thai tự do trong huyết tương của thai phụ bình thường và thai phụ tiền sản giật.

- Thành phần phản ứng:

Mix PCR 2X (Promega);

Các cặp mồi SRY-109F và SRY-245R (Promega);

Probe (Promega);

H<sub>2</sub>O

- Điều kiện phản ứng Realtime PCR:

94°C - 3 phút

94°C – 1 phút

55°C – 1 phút

72°C – 6 phút

} x 40 chu kỳ

4°C-α.

- Đọc kết quả: Phần mềm CFX Manager™ chuyên dụng của máy Realtime PCR (BioRad) sẽ tính toán được số copy của DNA phôi thai tự do của mẫu thử.

#### **2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu:**

- Địa điểm nghiên cứu:

Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội,

Phòng khám Vạn Phúc

Bệnh viện Phụ Sản Trung ương

Bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn dịch Trường Đại học Y Hà Nội

Phòng Viêm gan virus - Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

- Thời gian nghiên cứu: Tháng 1/2013 đến tháng 06/2015.

## 2.5. Trang thiết bị và máy móc phục vụ nghiên cứu.

- Máy PCR (BCE).
- Máy Realtime PCR: CFX 96 (Bio Rad) và 7500 Fast (Thermofisher)
- Máy điện di (Bio Rad).
- Máy ly tâm (Eppendorf).
- Máy đo quang (Bio Rad).
- Tủ lạnh thường (-20°C) bảo quản mix và mẫu phân tích (thời gian lưu mẫu < 6h). Tủ lạnh âm sâu (-80°C) để lưu trữ mẫu.
- Máy đo huyết áp cơ, cân trẻ sơ sinh.

## 2.6. Phương pháp phân tích số liệu

### *Thu thập số liệu nghiên cứu:*

Các phiếu bệnh án được thu thập và kiểm tra trước khi nhập liệu và sau khi nhập liệu. Các phiếu bệnh án không rõ ràng hoặc không phù hợp phải được hoàn thiện lại hoặc loại bỏ.

**Cách mã hóa:** Số liệu được nhập vào máy tính trên phần mềm Epi Info 3.0, các thông tin được mã hóa và đồng thời kiểm tra tính logic.

### *Xử lý số liệu:*

Các số liệu thu thập được của nghiên cứu được xử lý theo các thuật toán thống kê Y học trên máy tính bằng phần mềm SPSS 16.0 để tính toán các thông số: trung bình, độ lệch chuẩn đối với các biến định lượng. Sử dụng phần mềm CFX Manager™ chuyên dụng của máy Realtime PCR (BioRad) đã tích hợp sẵn để tính toán nồng độ DNA phôi thai tự do sau chiết tách. Các biến số định tính được trình bày theo tỷ lệ phần trăm (%). Số liệu được trình bày bằng bảng và vẽ biểu đồ minh họa, số liệu được biểu diễn ở dạng  $\bar{X} \pm SD$  ( $\bar{X}$ : giá trị trung bình và SD: độ lệch chuẩn) và dạng  $\bar{X}$  với khoảng dao động (min - max)

Test kiểm định: do số liệu phân bố không chuẩn, Mann-whitney test được áp dụng nhằm đánh giá sự khác biệt về các biến số định lượng giữa hai nhóm

bình thường và có tiền sản giật. Chi-squared test và Fisher's exact test được sử dụng đánh giá sự khác biệt giữa các biến số định tính giữa hai nhóm thai phụ. Nhằm xác định một số yếu tố liên quan, mô hình hồi quy tuyến tính đa biến được áp dụng. Do biến đầu ra phân bố không chuẩn, chúng tôi tiến hành chuyển dạng biến số sang dạng logarithm nhằm thỏa mãn điều kiện của mô hình.

$p < 0,05$  được xem xét có ý nghĩa thống kê.

## **2.7. Đạo đức nghiên cứu:**

- Trung thực trong nghiên cứu.
- Bảo đảm giữ bí mật các thông tin cá nhân về bệnh tình của bệnh nhân và các thông tin trong hồ sơ nghiên cứu.
- Cung cấp đầy đủ, trung thực các thông tin liên quan tới nguy cơ có thể xảy ra đối với bệnh nhân trong nghiên cứu.
- Bảo đảm quyền lợi của người bệnh khi tham gia nghiên cứu.
- Tôn trọng các ý nguyện của người bệnh khi muốn dừng tham gia nghiên cứu.

### Chương 3.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trong thời gian nghiên cứu, chúng tôi đã thu thập được 101 thai phụ bình thường và 50 thai phụ tiền sản giật làm đối tượng nghiên cứu.

### 3.1. Một số đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

#### 3.1.1. Đặc điểm về tuổi và huyết áp

**Bảng 3.1. Một số đặc điểm tuổi, huyết áp của đối tượng nghiên cứu**

Nhóm thai phụ Đặc điểm	Bình thường (n = 101)	Tiền sản giật (n = 50)	p
Tuổi thai phụ	29,4 ± 5,0	30,8 ± 5,2	> 0,05
HATT (mmHg)	113,1 ± 8,4	157,4 ± 22,0	< 0,01
HATTr (mmHg)	69,9 ± 6,3	101,0 ± 14,7	< 0,01

*Nhận xét:*

Độ tuổi trung bình của nhóm thai phụ bình thường là 29,4 ± 5,0; của nhóm thai phụ tiền sản giật là 30,8 ± 5,2, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm thai phụ với  $p > 0,05$ .

Chỉ số về huyết áp tâm thu và huyết áp tâm trương ở nhóm thai phụ tiền sản giật tăng cao so với nhóm thai phụ bình thường, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

#### 3.1.2. Tuổi thai của đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu thu thập được gồm 101 thai phụ bình thường trong đó: 41 thai phụ có thai tuần 12 - 15, 30 thai phụ có thai tuần 16 - 25 và 30 thai phụ có thai tuần 31 - 35 và 50 thai phụ tiền sản giật trong đó: 4 thai phụ có thai tuần 22 - 25 và 46 thai phụ có thai tuần 26 - 40.

**Bảng 3.2. Thống kê tuổi thai của đối tượng nghiên cứu**

Tuần thai \ Nhóm thai phụ	Bình thường	Tiền sản giật	p
	(n = 101)	(n = 50)	
Quý 1	12,7 ± 0,7		
Quý 2	21,2 ± 2,2	23,5 ± 1,5	
Quý 3	31,9 ± 0,9	33,6 ± 3,3	> 0,05

*Nhận xét:*

Không có sự khác biệt giữa nhóm thai phụ bình thường và thai phụ tiền sản giật về tuổi thai ở quý 3 của thai kỳ với  $p > 0,05$

### 3.1.3. Đặc điểm về tỷ lệ phù

**Bảng 3.3. Tình trạng phù của đối tượng nghiên cứu**

Triệu chứng phù \ Nhóm thai phụ		Bình thường		Tiền sản giật		p
		n	%	n	%	
Phù	Có	0	0,0	37	74,0	<0,01
	Không	101	100,0	13	26,0	
Tổng		101	100,0	50	100,0	

*Nhận xét:*

74,0% thai phụ tiền sản giật có triệu chứng phù, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê so với nhóm thai phụ bình thường với  $p < 0,01$ .

### 3.1.4. Một số đặc điểm về huyết học

**Bảng 3.4. Một số đặc điểm huyết học của đối tượng nghiên cứu**

<b>Chỉ số</b> \ <b>Nhóm thai phụ</b>	<b>Bình thường</b> $\bar{X} \pm SD$	<b>Tiền sản giật</b> $\bar{X} \pm SD$	<b>P</b>
Số lượng hồng cầu ( $10^{12}/L$ )	$3,91 \pm 0,38$	$4,17 \pm 0,49$	$<0,01$
Hematocrit (L/L)	$0,35 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,04$	$< 0,05$
Hemoglobin (g/L)	$113,3 \pm 12,0$	$122,4 \pm 14,2$	$<0,01$
Số lượng bạch cầu ( $10^9/L$ )	$8,9 \pm 1,6$	$10,9 \pm 2,8$	$<0,01$
Số lượng tiểu cầu ( $10^9/L$ )	$235,3 \pm 51,7$	$213,2 \pm 2,8$	0,816

*Nhận xét:*

Các chỉ số về số lượng hồng cầu, hematocrit, hemoglobin và số lượng tiểu cầu của cả nhóm thai phụ bình thường và thai phụ tiền sản giật đều nằm trong giới hạn bình thường, trừ chỉ số hemoglobin ở nhóm thai phụ bình thường thấp hơn bình thường và số lượng bạch cầu của nhóm thai phụ tiền sản giật cao hơn bình thường. Có sự khác biệt về số lượng hồng cầu, hematocrit, hemoglobin và số lượng bạch cầu có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .



**Bảng 3.5. Đặc điểm số lượng hồng cầu, hematocrit, hemoglobin của đối tượng nghiên cứu**

Chỉ số	Nhóm thai phụ	Max	Min	Giảm		Bình thường		p
				n	%	n	%	
Số lượng hồng cầu ( $10^{12}/L$ )	Bình thường	4,9	3,0	44	43,6	57	56,4	< 0,05
	TSG	5,3	3,0	11	22,0	39	78,0	
Hemoglobin (g/L)	Bình thường	138	78	63	62,4	38	37,6	< 0,01
	TSG	148	88	19	38,0	31	62,0	
Hematocrit (L/L)	Bình thường	0,45	0,21	40	39,6	61	60,4	>0,05
	TSG	0,44	0,20	13	26,0	37	74,0	

*Nhận xét:*

Ở nhóm thai phụ bình thường: 44/101 (43,6%) thai phụ có số lượng hồng cầu giảm; 63/101 (62,4%) thai phụ giảm hemoglobin và 40/101 (39,6%) thai phụ giảm hematocrit.

Ở nhóm thai phụ tiền sản giật: 11/50 (22,0%) thai phụ có số lượng hồng cầu giảm; 19/50 (38,0%) thai phụ giảm hemoglobin và 13/50 (26,0%) thai phụ giảm hematocrit.

### 3.1.5. Một số đặc điểm về hóa sinh máu cơ bản

**Bảng 3.6. Đặc điểm về hóa sinh máu của đối tượng nghiên cứu**

Chỉ số	Nhóm thai phụ		p
	Bình thường	Tiền sản giật	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
ALT (U/L)	18,8 ± 6,0	32,4 ± 19,8	<0,01
AST (U/L)	17,6 ± 9,2	21,5 ± 14,7	0,131
Ure (mmol/l)	2,9 ± 0,7	5,6 ± 2,9	<0,01
Creatinin (umol/l)	49,3 ± 7,4	67,2 ± 20,1	<0,01
Acid uric (umol/l)	238,7 ± 35,8	427,2 ± 130,2	<0,01

*Nhận xét:*

Các chỉ số ALT, AST, ure, creatin của cả hai nhóm đều nằm trong giới hạn bình thường. Chỉ số acid uric ở nhóm thai phụ tiền sản giật tăng cao hơn bình thường. Có sự khác biệt về chỉ số ALT, ure, creatinin và acid uric giữa 2 nhóm thai phụ có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

### 3.1.6. Phân bố mức protein niệu

**Bảng 3.7. Phân bố mức độ protein niệu của thai phụ**

Protein niệu	Nhóm thai phụ		Tiền sản giật		p
	Bình thường		Tiền sản giật		
	n	%	n	%	
Không có	101	100,0	18	36,0	<0,01
Nhẹ (0,3 – 2,9g/l)	0	0,0	14	28,0	
Nặng ( $\geq 3g/l$ )	0	0,0	18	36,0	
Tổng	101	100,0	50	100,0	

*Nhận xét:* 32/50 thai phụ tiền sản giật chiếm 64,0% có xuất hiện protein niệu trong đó 18/50 thai phụ (36,0%) protein niệu ở mức độ nặng, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

### 3.1.7. Một số đặc điểm của trẻ sơ sinh ở các sản phụ bình thường và tiền sản giật

#### Trọng lượng thai lúc đẻ

**Bảng 3.8. Trọng lượng thai lúc đẻ**

Nhóm thai phụ Trọng lượng thai lúc đẻ (gram)	Bình thường		Tiền sản giật		p
	n	%	n	%	
< 1500	0	0,0	10	20,0	<0,01
1500 - < 2000	0	0,0	28	56,0	
>2000	101	100,0	12	24,0	
<b>Tổng</b>	101	100,0	50	100,0	

*Nhận xét:* Ở nhóm thai phụ tiền sản giật, trẻ sơ sinh có cân nặng dưới 2000gram chiếm chủ yếu, trong đó 56,0% trẻ có trọng lượng 1500 - < 2000gram

#### Hình thức đẻ

**Bảng 3.9. Hình thức đẻ**

Nhóm thai phụ Hình thức đẻ	Bình thường		Tiền sản giật		p
	n	%	n	%	
Đẻ thường	101	100,0	10	20,0	< 0,01
Mổ lấy thai	0	0,0	40	80,0	
<b>Tổng</b>	101	100,0	50	100,0	

*Nhận xét:* 40/30 thai phụ tiền sản giật chiếm 80,0% khi sinh bằng hình thức mổ lấy thai

### 3.2. Hoàn chỉnh và xây dựng đường chuẩn của kỹ thuật Realtime PCR để định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ.

#### 3.2.1. Chiết tách DNA

Chiết tách DNA của toàn bộ mẫu nghiên cứu theo quy trình Randen I. và CS (2003) sử dụng QIAgene Blood Mini Kit. Sau khi chiết tách DNA, tiến hành đo OD bằng máy quang phổ, pha loãng DNA chiết tách ở nồng độ 5ng/ $\mu$ l, và khi đo OD  $_{260/280} = 1,8 - 2,2$ . Kết quả như sau:

**Bảng 3.10. Bảng đo độ tinh sạch DNA chiết tách của đối tượng nghiên cứu**

Nhóm thai phụ	Đo OD <sub>260/OD</sub> <sub>280</sub> ( $\bar{X} \pm SD$ )
Bình thường (n= 101)	1,98 $\pm$ 0,12
Tiền sản giật (n = 50)	1,95 $\pm$ 0,15

*Nhận xét:*

Đo OD  $_{260/280}$  của các mẫu DNA chiết tách từ huyết tương của thai phụ bình thường: 1,98  $\pm$  0,12; tiền sản giật: 1,95  $\pm$  0,15

#### 3.2.2. Thực hiện kỹ thuật PCR lồng để phát hiện DNA sau chiết tách

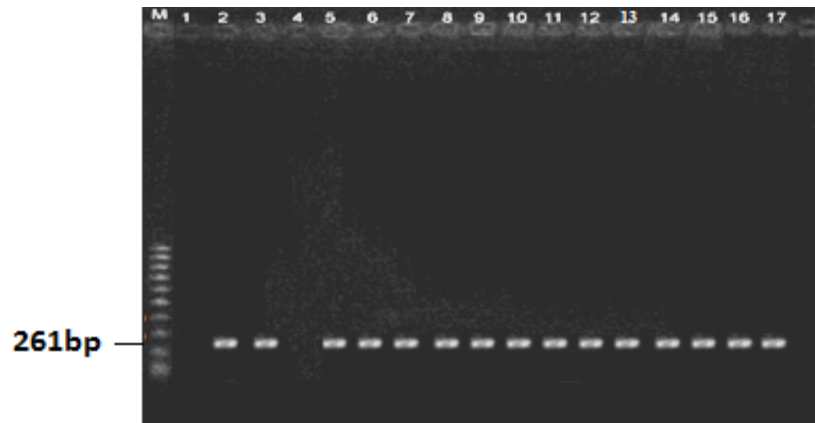
Chúng tôi thực hiện kỹ thuật PCR lồng với cặp mồi X<sub>1</sub>X<sub>3</sub> và X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> (gen trên NST X) để kiểm tra sự có mặt của các đoạn DNA trong huyết tương thai phụ sau khi chiết tách vì các cặp mồi này mã cho gen nằm trên NST X nên có mặt ở tất cả các đối tượng. Thực hiện PCR lần 1 với cặp mồi X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>, sau đó lấy sản phẩm của PCR lần 1 thực hiện tiếp PCR lần 2 với cặp mồi X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>. Kết quả thu được như sau:

**Bảng 3.11. Kết quả kiểm tra và phát hiện DNA sau chiết tách bằng PCR lồng với cặp mồi  $X_1X_3$  và  $X_2X_3$**

Cặp mồi	Kích thước sản phẩm	Kết quả PCR			
		1 (chứng nam)	2 (chứng nữ)	Thai nam (n=3)	Thai nữ (n=3)
$X_1X_3$ và $X_2X_3$	301bp 261bp (gen trên NST X)	+	+	+	+

*Nhận xét:*

Khi tiến hành PCR lồng với 2 cặp mồi  $X_1X_3$  và  $X_2X_3$  có sản phẩm là 261bp thì tất cả các mẫu chứng và thử đều có sản phẩm.



**Hình 3.1. Hình ảnh điện di sản phẩm sau PCR lồng với cặp mồi  $X_1X_3$  và  $X_2X_3$**

*M: Thang DNA 100*

*Giếng 1: Chứng âm mồi đặc hiệu*

*Giếng 2: Chứng dương (thai nam) mồi đặc hiệu, sản phẩm 261bp*

*Giếng 3: Chứng dương (thai nữ) với mồi đặc hiệu, sản phẩm 261bp*

*Giếng 4: Chứng nước cất*

*Giếng 5 – 10 (thai phụ bình thường): Khuếch đại với mồi đặc hiệu, sản phẩm 261bp*

*Giếng 11 – 17 (thai phụ TSG): Khuếch đại với mồi đặc hiệu, sản phẩm 261bp*

### 3.2.3. Thực hiện kỹ thuật PCR lồng để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen cần định lượng trong huyết tương thai phụ

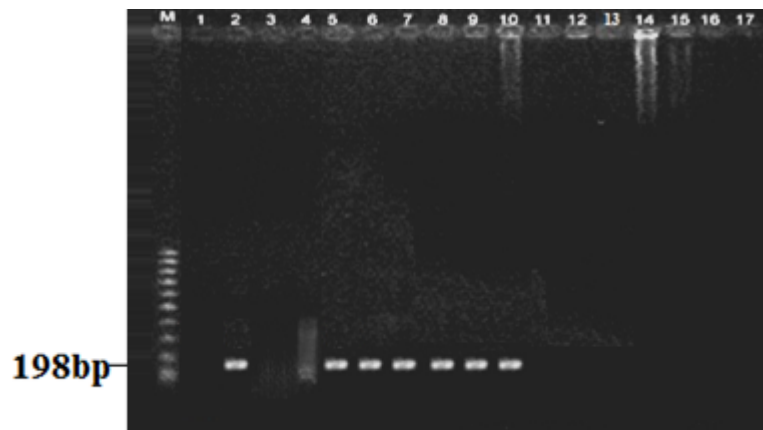
Nhóm nghiên cứu lấy DNA của các mẫu có sản phẩm sau PCR lồng ở trên, tiếp tục thực hiện kỹ thuật PCR lồng với cặp mồi của gen SRY (gen trên NST Y) để phát hiện DNA phôi thai tự do đặc hiệu. Thực hiện PCR lần 1 với cặp mồi Y<sub>1.5</sub>Y<sub>1.6</sub>, sau đó lấy sản phẩm của PCR lần 1 thực hiện tiếp PCR lần 2 với cặp mồi Y<sub>1.7</sub>Y<sub>1.8</sub>. Kết quả thu được như sau:

**Bảng 3.12. Kết quả kiểm tra và phát hiện DNA của gen SRY sau chiết tách bằng PCR lồng với cặp mồi Y<sub>1.5</sub>Y<sub>1.6</sub> và Y<sub>1.7</sub>Y<sub>1.8</sub>**

Cặp mồi	Kích thước sản phẩm	Kết quả PCR			
		1 (chứng nam)	2 (chứng nữ)	Thai nam (n=3)	Thai nữ (n=3)
Y <sub>1.5</sub> Y <sub>1.6</sub> và Y <sub>1.7</sub> Y <sub>1.8</sub>	239bp 198bp (gen trên NST Y)	+	-	+	-

*Nhận xét:*

Đối với hai cặp mồi Y<sub>1.5</sub>Y<sub>1.6</sub> và Y<sub>1.7</sub>Y<sub>1.8</sub> cho sản phẩm 198 bp thì chỉ mẫu chứng nam và mẫu thử mang thai nam có sản phẩm.



**Hình 3.2. Hình ảnh điện di sản phẩm sau PCR lồng với cặp mồi Y<sub>1.5</sub>Y<sub>1.6</sub> và Y<sub>1.7</sub>Y<sub>1.8</sub>**

*M: Thang DNA 100*

*Giếng 1: Chứng âm môi đặc hiệu*

*Giếng 2: Chứng dương: Khuếch đại môi đặc hiệu, sản phẩm 198bp*

*Giếng 3: Chứng âm: Khuếch đại môi đặc hiệu, không có gen đích nên không có sản phẩm*

*Giếng 4: Chứng nước cất.*

*Giếng 5 - 10: Khuếch đại môi đặc hiệu, sản phẩm 198bp*

*Giếng 11 - 17: Khuếch đại môi đặc hiệu, không có gen đích nên không có sản phẩm*

Tiến hành kỹ thuật PCR lồng để kiểm tra tất cả các sản phẩm DNA sau khi chiết tách. Thực hiện PCR lồng lần 1 để kiểm tra sự có mặt của các đoạn DNA trong huyết tương thai phụ sau khi chiết tách. Thực hiện PCR lồng lần 2 để phát hiện DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ đặc hiệu của gen SRY. Khi các mẫu nghiên cứu cho sản phẩm dương tính ở PCR lồng lần 2 này, chúng tôi mới lấy DNA của các mẫu này để tiến hành thực hiện kỹ thuật Realtime PCR để định lượng DNA phôi thai tự do, còn các mẫu nghiên cứu mà cho sản phẩm âm tính ở PCR lồng lần 2 này chúng tôi sẽ loại trừ ra khỏi mẫu nghiên cứu.

### **3.2.4. Hoàn chỉnh và xây dựng đường chuẩn của kỹ thuật Realtime PCR để định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ.**

### 3.2.4.1. Kết quả tạo minigene nồng độ $10^{12}$ copy/ml để xây dựng đường chuẩn cho nghiên cứu

- Xác định trình tự của gen SRY lấy từ cơ sở dữ liệu được nằm trong cơ sở dữ liệu của Ngân hàng dữ liệu Gen, được tổng hợp bởi Integrated ADN Technologies (IDT) theo trình tự khuyến cáo của các nghiên cứu đã được công bố quốc tế [121].

- Kết quả đã tạo được minigene như sau:

Gene Name: pIDTSMART-AMP : MiniGene 25-500 bp

Gene Size: 137 bp

Plasmid Weight: 1,317,326.5 g/mole

#### Sequence Detail

```

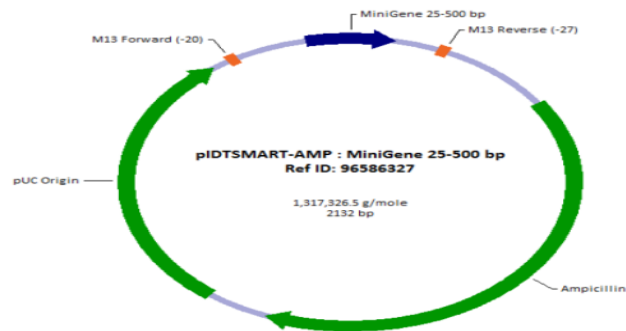
00001 CCCGTGTAAG ACGACGGCCA GTTTATCTAG TCAGCTTGAT TCTAGCTGAT CGTGGACCGG AAGGTGAGCC AGTGAGTTGA
00081 TTGCAGTCCA GTTACGCTGG AGTCTGAGGC TCGTCCCTGAA TGATATGCGG CCTCTGGCGA TTAAGTCAAA TTCGCATTTT
00161 TCAGGACAGC AGTAGAGCAG TCAGGGAGGC AGATCAGCAG GGCAAGTAGT CAACGTTACT GAATTACCAT GTTTTGCTTG
00241 AGAATGAATA CATTGTCAGG GTACTAGGGG GCGCGGTGAT CTTACGGCAT TATACGTATG ATCGGTCCAC GATCAGCTAG
00321 ATTATCTAGT CAGCTTGATG TCATAGCTGT TTCCTGAGGC TCAACTACTGA CCATTAAAT CATACCTGAC CTCCATAGCA
00401 GAAAGTCAAA AGCCTCCGAC CGGAGGCTTT TGACTTGATC GGCACGTAAG AGGTTCCAAC TTTCACCATA ATGAAATAAG
00481 ATCACTACCG GCGGTATTTT TTGAGTTATC GAGATTTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAAT GAGTATTCAA CATTTCGGTG
00561 TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTAAAAGT AAAAGATGCT
00641 GAAGATCAGT TGGGTGCACG AGTGGGTTAC ATCGAATCGG ATCTCAACAG CCGTAAGATC CTTGAGAGTT TACGCCCCGA
00721 AGAACGTTTT CCAATGATGA GCACTTTTAA AGTTCCTGTA TGTGGCGCGG TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC
00801 AACTCGGTCCG CCGCATACAC TATTCTCAGA ATGACTTGTT TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT CACGGATGGC
00881 ATGACAGTAA GAGAATTATG CAGTGTCTGC ATAACCATGA GTGATAACAC TCGGCCAAC TTACTTCTGG CAACGATCGG
00961 AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTGTCA CAACATGGGG GATCATGTAA CTCGCCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA
01041 ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC TGTAGCAATG GCAACAACGT TCGCCAAAC ATTAACCTGGC
01121 GAACTACTTA CTCTAGCTTC CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGATCAC TTCTGCCTC
01201 GGCCCTCCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA GCCCGTGAGC GTGGGTCTCG CCGTATCATT GCAGCACTGG
01281 GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGCATCGTAG TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA TGGATGAACG AAATAGACAG
01361 ATCGTGTAGA TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAAT GAGGGCCCAA ATGTAATCAC CTGGCTCACC TTCGGGTGGG
01441 CCTTTCTTGA GGACCTAAAT GTAATCACCT GGCTCACCTT CCGGTGGGCC TTTCTGCGTT GCTGGCGTTT TTCATAGGC
01521 TCCGCCCCC TGACGAGCAT CAAAAAATC GATGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCGA CAGGACTATA AAGATACCAG
01601 GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCCT TCTCCTGTTT CGACCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTCTCC
01681 TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGGTGTAGT CTTTCGCTCC AAGCTGGGCT
01761 GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC
01841 GACTTATCGC CACTGCGCAG AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCCTGAA
01921 GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAAG AACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TCGGAAAAAG
02001 AGTTGGTAGC TCTTGATCCG GCAAACAAAC CACCCTGGT AGCGGTGGTT TTTTGTGTTG CAAGCAGCAG ATTACGCGCA
02081 GAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA TTTTCTACCG AAGAAAGGCC CA

```

Vị trí của đoạn minigene: từ vị trí nucleotid 135 đến nucleotid 271.

- Bước tiếp theo là đặt đoạn gen này vào plasmid, để nhân lên plasmid có đoạn DNA cần quan tâm chuyển plasmid này vào vi khuẩn *E.coli* bằng sốc nhiệt. Cuối cùng, tạo nên *E.coli* trong có chứa plasmid TOPO có mang 1 bản sao của đoạn DNA cần quan tâm (quá trình này được đặt tổng hợp tại hãng IDT - Integrated DNA Technologies).

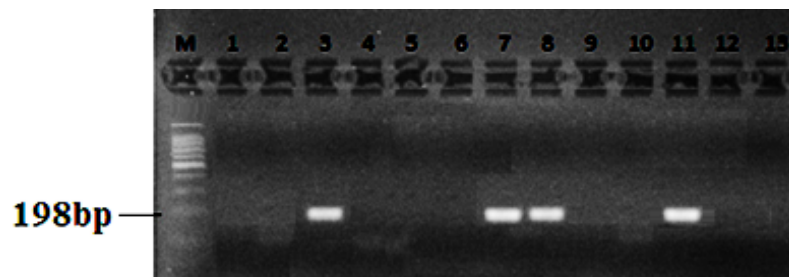




**Hình 3.3. *E.coli* trong có chứa plasmid TOPO**

- Tiến hành pha loãng minigene theo các nồng độ từ  $10^{12}$  đến  $10^0$  copy/ml, tính toán nồng độ pha loãng từ nanogram sang copies theo định luật Avogadro.

Trước khi tiến hành pha loãng minigene theo các nồng độ từ  $10^{12}$  đến  $10^0$  copy/ml, nhóm nghiên cứu sử dụng kỹ thuật PCR lồng để kiểm tra xem đã có đoạn minigene của gen SRY có trong plasmid với cặp mồi Y<sub>1.5</sub>Y<sub>1.6</sub> và Y<sub>1.7</sub>Y<sub>1.8</sub>. Kết quả thu được như sau:



**Hình 3.4. Hình ảnh điện di sản phẩm sau PCR kiểm tra DNA của gen SRY có trong plasmid**

*M: Thang DNA 100*

*Giếng 1: Chứng nước cất*

*Giếng 2,4: Chứng dương khuếch đại mồi đặc hiệu, không có gen đích nên không có sản phẩm*

*Giếng 3: Chứng dương khuếch đại mồi đặc hiệu, sản phẩm 198bp*

*Giếng 5,6,9,10: Khuếch đại mồi đặc hiệu, không có gen đích nên không có sản phẩm*

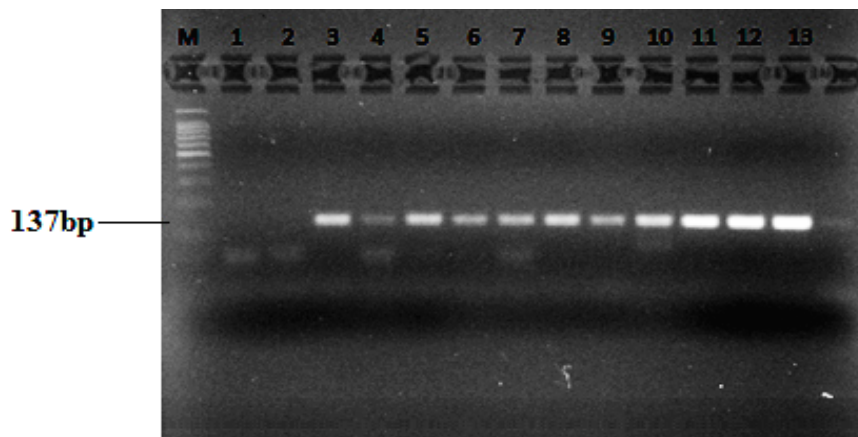
*Giếng 7,11: Khuếch đại mồi đặc hiệu, sản phẩm 198bp*

*Giếng 8 (mẫu chuẩn DNA  $10^{11}$ ): Khuếch đại mồi đặc hiệu, sản phẩm 198bp*

Như vậy, sản phẩm đảm bảo đã có đoạn minigene của gen SRY có trong plasmid. Kiểm tra lại nồng độ của DNA bằng máy nanodrop, sau đó tiến hành pha loãng minigene theo các nồng độ từ  $10^{12}$  đến  $10^0$  copy/ml

### 3.2.4.2. Xây dựng đường chuẩn theo các mẫu chuẩn đã được pha loãng a, Thực hiện kỹ thuật PCR để kiểm tra sơ bộ nồng độ của mẫu chuẩn

Sau khi sử dụng kỹ thuật PCR kiểm tra sơ bộ nồng độ DNA trong các mẫu chuẩn theo bậc thang nồng độ đã được pha loãng với cặp mồi SRY-245R và SRY-109F. Kết quả thu được như sau:



**Hình 3.5. Hình ảnh điện di sản phẩm sau PCR với cặp mồi SRY - 245R và SRY-109F**

*M: Thang DNA 100*

*Giếng 1: Chứng âm, khuếch đại mồi đặc hiệu*

*Giếng 2: Chứng nước cất*

*Giếng 3: Chứng dương khuếch đại mồi đặc hiệu, sản phẩm 137bp*

*Giếng 4 (thai nam): Khuếch đại mồi đặc hiệu, sản phẩm 137bp*

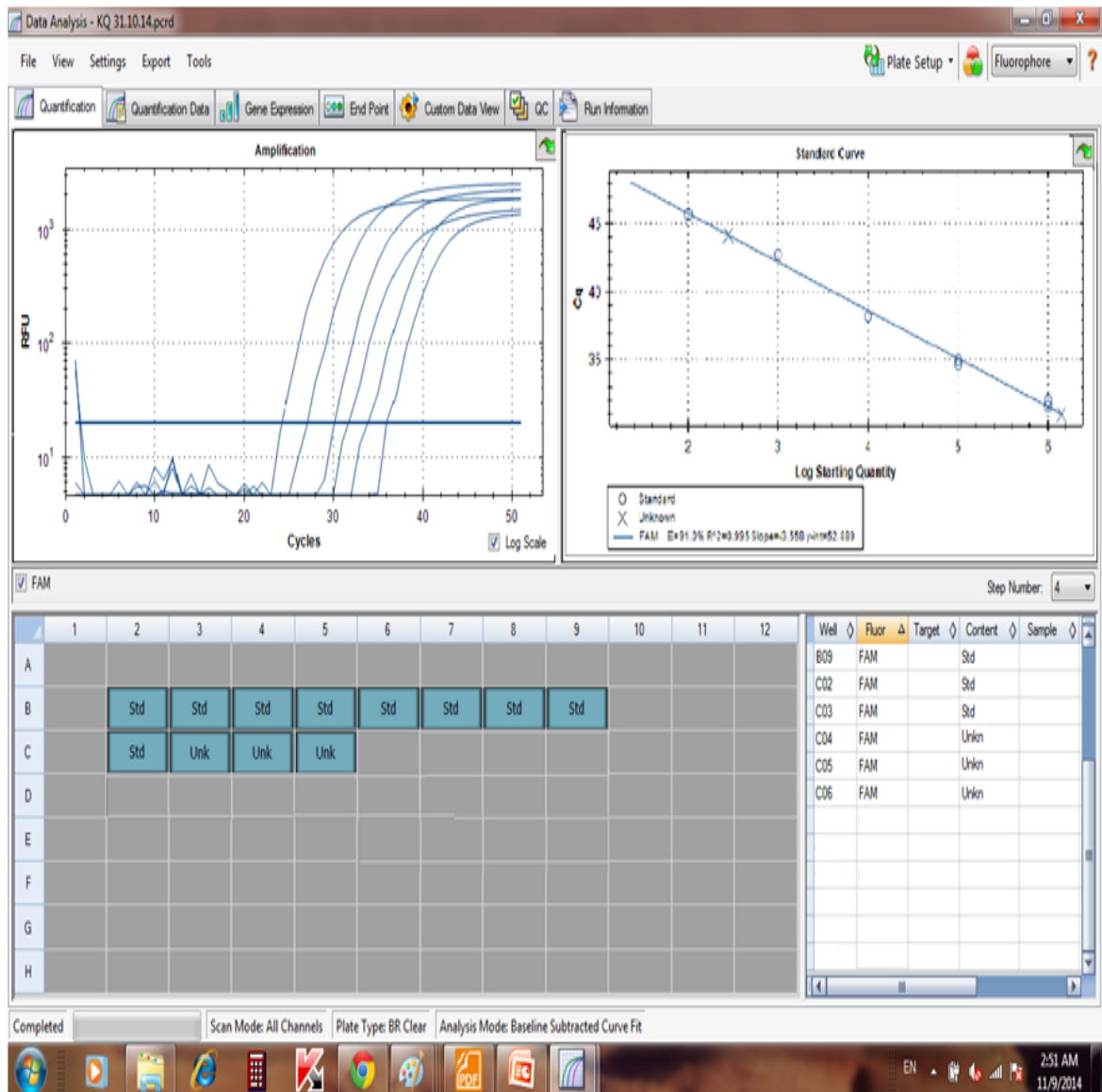
*Giếng 5 - 13 (mẫu chuẩn nồng độ từ  $10^1$  -  $10^0$  copy/ml): Khuếch đại mồi đặc hiệu, sản phẩm 137bp*

*Nhận xét:*

Sử dụng PCR để bán định lượng mẫu chuẩn sử dụng cặp mồi SRY-245R và SRY-109F để kiểm tra, cho sản phẩm 137bp và đậm độ của các băng mẫu chuẩn tăng dần theo nồng độ DNA.

## b, Thực hiện Realtime PCR với bậc thang chuẩn đã thực hiện được

Để kiểm tra các mẫu chuẩn trong bậc thang nồng độ đã được pha loãng nhóm nghiên cứu tiến hành kỹ thuật Realtime PCR tại Bộ môn Miễn dịch - Sinh lý bệnh Trường Đại học Y Hà Nội (thực hiện trên máy Realtime CFX96 (BioRad)). Kết quả thu được như sau:

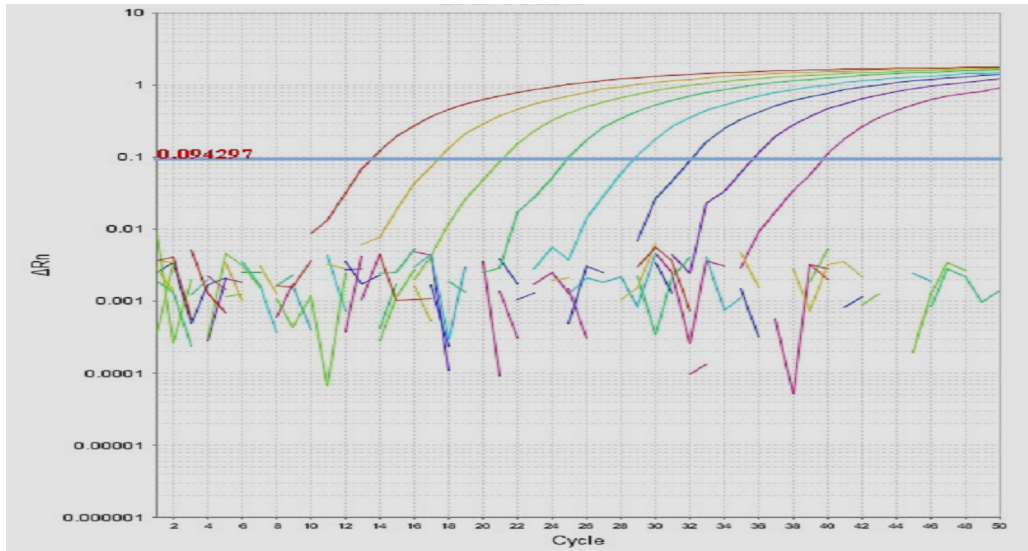


**Hình 3.6. Đường chuẩn của gen SRY cho tín hiệu tốt**

**với E = 96,3% và R<sup>2</sup> = 0,991**

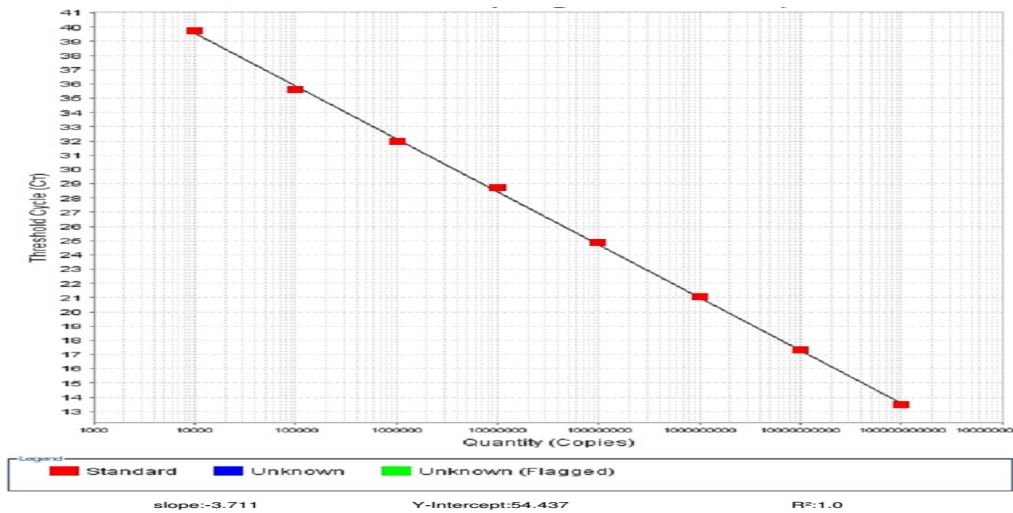
Đồng thời, để kiểm tra lại độ tin cậy của bậc thang chuẩn đã thực hiện được, nhóm nghiên cứu tiến hành đối chiếu đường chuẩn của kỹ thuật Realtime

PCR với labo của Phòng Viêm gan Virus tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (thực hiện trên máy Realtime PCR 7500 Fast (Thermofisher). Kết quả thu được như sau:



Trục tung:  $\Delta Rn$

Trục hoành: chu kỳ



Trục tung: Chu kỳ

Trục hoành: nồng độ DNA

**Hình 3.7. Đường chuẩn của gen SRY cho tín hiệu tốt**

với  $E = 90\%$  và  $R^2 = 1$

### 3.3. Định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bằng kỹ thuật Realtime PCR

#### 3.3.1. Định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bình thường

Sau khi chiết tách DNA từ huyết tương của thai phụ, chúng tôi kiểm tra độ tinh khiết và nồng độ DNA: tiến hành đo OD<sub>260/280</sub> của 101 mẫu DNA đã chiết tách từ huyết tương của thai phụ bình thường để đảm bảo độ tinh sạch của DNA sau chiết tách.

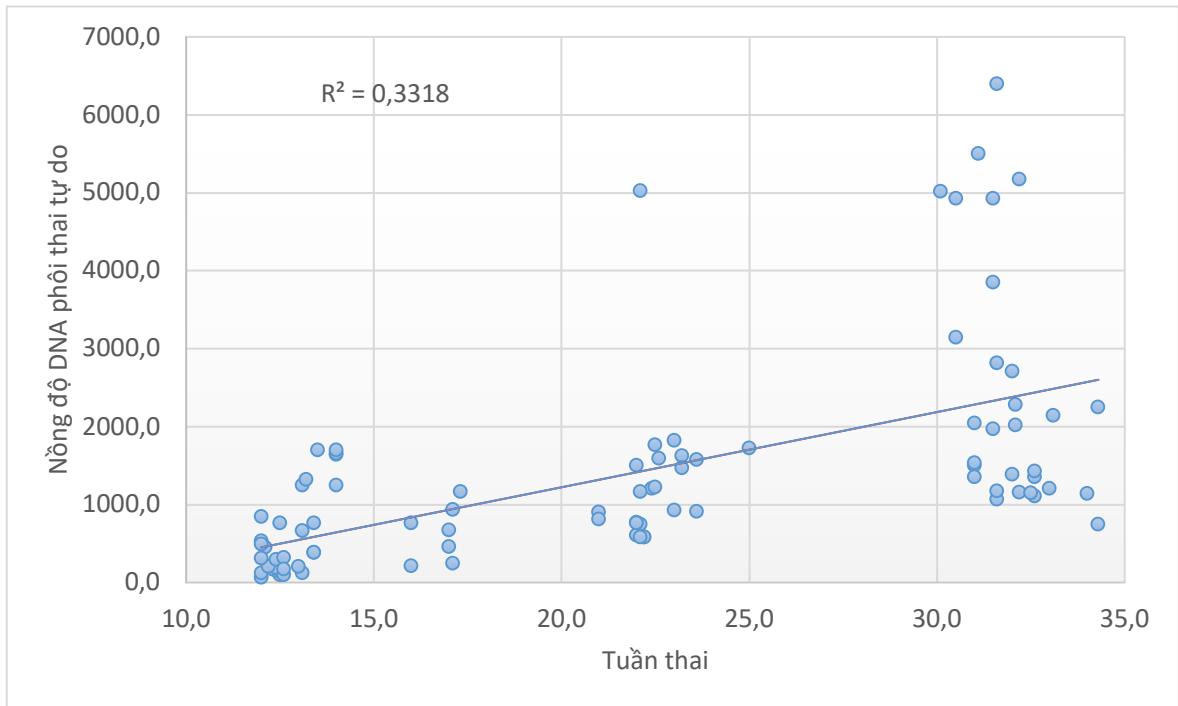
Sau đó, chúng tôi tiến hành chạy PCR lồng với cặp mồi của gen SRY trên 101 thai phụ bình thường, loại trừ 11 mẫu âm tính sau PCR lồng của nhóm thai phụ có thai tuần 12 - 15 còn lại 90 mẫu DNA của thai phụ bình thường (bao gồm: 30 mẫu của quý 1, 30 mẫu của quý 2 và 30 mẫu của quý 3) để tiến hành định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do bằng kỹ thuật Realtime PCR.

**Bảng 3.13. Nồng độ DNA phôi thai tự do trung bình ở các quý của nhóm thai phụ bình thường**

<b>Nồng độ DNA phôi thai</b> <b>Tuổi thai</b>	<b><math>\bar{X}</math></b> <b>(copy/ml)</b>	<b>Khoảng dao động</b> <b>(min – max)</b>	<b>p<sub>2-1</sub></b>	<b>p<sub>3-1</sub></b>	<b>p<sub>3-2</sub></b>
Quý 1 (n = 30)	574,79	60,55 – 1698,52	<0,01	<0,01	<0,05
Quý 2 (n = 30)	1587,11	248,31 – 4838,92			
Quý 3 (n = 30)	2196,62	742,98 – 6397,98			

*Nhận xét:*

Nồng độ DNA phôi thai tự do trung bình của nhóm thai phụ bình thường tăng dần theo các quý của thai kỳ với  $p < 0,05$ .



**Biểu đồ 3.1. Mối liên quan giữa tuần thai và nồng độ DNA phôi thai tự do ở nhóm thai phụ bình thường**

*Nhận xét:*

Nồng độ DNA phôi thai tự do của nhóm thai phụ bình thường có xu hướng tăng dần theo tuổi thai tương ứng, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

### **3.3.2. Định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ tiền sản giật**

Sau khi chiết tách DNA từ huyết tương của thai phụ tiền sản giật, chúng tôi kiểm tra độ tinh khiết và nồng độ DNA: tiến hành đo  $OD_{260/280}$  của 50 mẫu DNA đã chiết tách để đảm bảo độ tinh sạch của DNA sau chiết tách.

Sau đó, chúng tôi tiến hành kỹ thuật PCR lồng với cặp mồi của gen SRY trên 50 mẫu DNA của thai phụ tiền sản giật, loại trừ 20 mẫu âm tính sau PCR lồng, số mẫu dương tính là 30 chúng tôi tiến hành định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương của thai phụ tiền sản giật bằng kỹ thuật Realtime PCR. Đồng thời ở 30 thai phụ TSG này nhóm nghiên cứu tìm mối

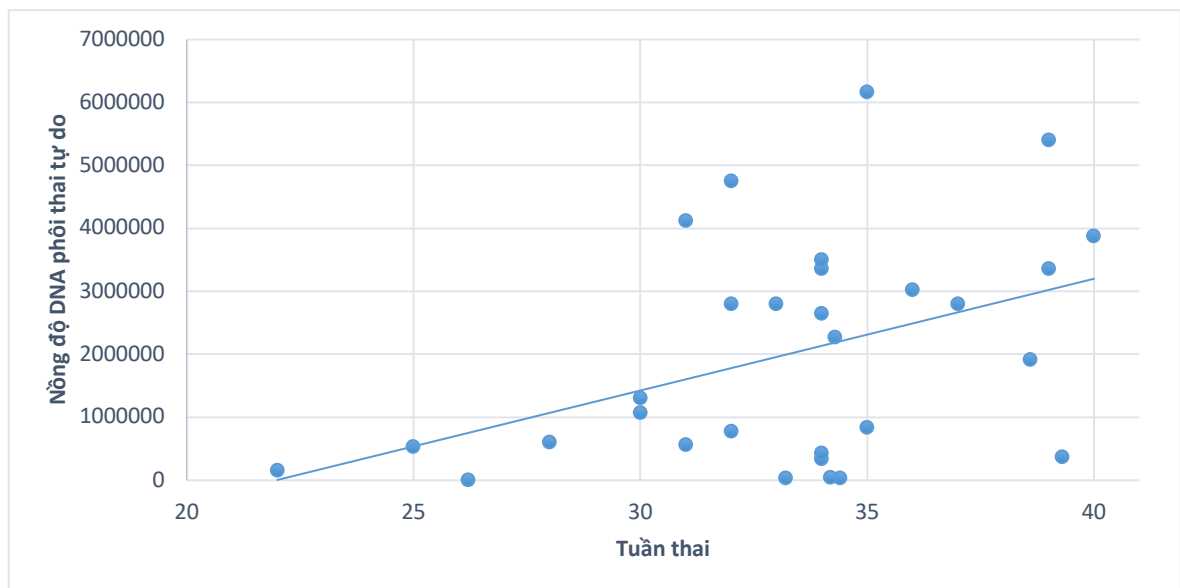
tương quan giữa nồng độ DNA phôi thai tự do và một số triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng của TSG.

**Bảng 3.14. Nồng độ DNA phôi thai tự do trung bình ở các quý của nhóm thai phụ tiền sản giật**

<b>Nồng độ DNA phôi thai</b> <b>Tuổi thai</b>	<b><math>\bar{X}</math> (copy/ml)</b>	<b>Khoảng dao động (min – max)</b>
Quý 2 (n = 3)	4882,79	1591,45 – 7677,00
Quý 3 (n = 27)	28701,26	5678,57 – 61666,14

*Nhận xét:*

Nồng độ DNA phôi thai tự do trung bình của nhóm thai phụ tiền sản giật tăng cao theo các quý của thai kỳ.



**Biểu đồ 3.2. Mối liên quan giữa tuổi thai và nồng độ DNA phôi thai tự do ở nhóm thai phụ tiền sản giật**

*Nhận xét:*

Nồng độ DNA phôi thai tự do của nhóm thai phụ tiền sản giật có xu hướng tăng dần theo tuổi thai tương ứng.

**Bảng 3.15. Mối tương quan giữa nồng độ DNA phôi thai với một số yếu tố của thai phụ tiền sản giật**

Yếu tố	Coef.	SE	P>t	95%CI	95%CI
Tuổi mẹ	-77850.9	60276.3	0.2	-195990.4	40288.6
Tuần thai	202260.0	50372.7	<b>0.0</b>	103531.4	300988.6
Phù	991847.5	534329.9	0.1	-55419.9	2039115.0
Protein niệu	-116047.9	64698.4	0.1	-242854.5	10758.6
HATT	-28309.6	10986.5	<b>0.0</b>	-49842.8	-6776.4
HATTr	8567.6	23901.4	0.7	-38278.3	55413.4
Tiểu cầu	965.4	4307.7	0.8	-7477.5	9408.4
Acid uric	3299.6	1398.5	<b>0.0</b>	558.5	6040.7
Hằng số	-723664.5	2524765.0	0.8	-5672113.0	4224784.0

*Nhận xét*

Kết quả mô hình hồi quy tuyến tính đa biến cho thấy, yếu tố tuổi thai, huyết áp tâm thu và acid uric có mối liên quan tỷ lệ thuận với nồng độ DNA. Cụ thể, tuổi thai, huyết áp tâm thu và acid uric càng cao thì nồng độ DNA càng cao, mối liên quan có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .



**Bảng 3.16. Mối tương quan giữa nồng độ DNA phôi thai với tuần thai, phù, HATT và HATTTr ở thai phụ tiền sản giật**

Yếu tố	Coef.	SE	P>t	95%CI	95%CI
Tuần thai	189166.2	52407.23	<b>0</b>	86449.89	291882.4
Phù	1103230	538066.9	<b>0.04</b>	48638.69	2157822
HATT	-28745.6	12565.96	<b>0.022</b>	-53374.37	-4116.728
HATTTr	8494.774	25264.33	0.737	-41022.4	58011.95
Hằng số	1788717	2524374	0.479	-3158966	6736400

*Nhận xét*

Kết quả mô hình hồi quy tuyến tính đa biến cho thấy, yếu tố tuổi thai, huyết áp tâm thu và phù có mối liên quan tỷ lệ thuận với nồng độ DNA. Cụ thể, tuổi thai, huyết áp tâm thu càng cao và phù càng tăng thì nồng độ DNA càng cao, mối liên quan có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

**Bảng 3.17. Mối tương quan giữa nồng độ DNA phôi thai với tuần thai, phù và protein niệu ở thai phụ tiền sản giật**

Yếu tố	Coef.	SE	P>t	95%CI	95%CI
Tuần thai	172510.9	48749.18	<b>0.000</b>	76964.29	268057.5
Phù	1010281	594482.5	0.089	-154883.6	2175445
Protein niệu	-164878	62807.75	<b>0.009</b>	-287978.8	-41776.92
Hằng số	-1474883	2562401	0.565	-6497096	3547330

*Nhận xét*

Kết quả mô hình hồi quy tuyến tính đa biến cho thấy, yếu tố tuổi thai và protein niệu có mối liên quan tỷ lệ thuận với nồng độ DNA. Cụ thể, tuổi thai, càng cao và protein niệu càng tăng thì nồng độ DNA càng cao, mối liên quan có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

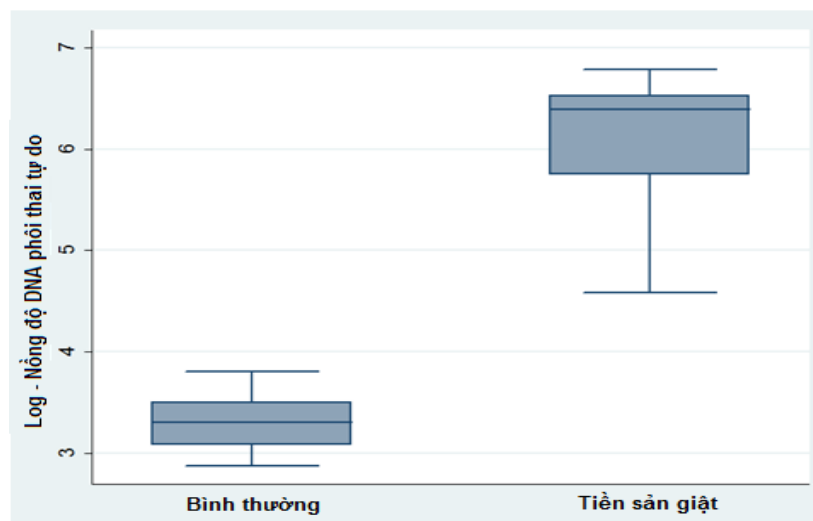
### 3.3.3. Xác định sự thay đổi nồng độ DNA phôi thai trong huyết tương thai phụ bình thường và thai phụ tiền sản giật.

**Bảng 3.18. Nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương của nhóm thai phụ bình thường và thai phụ tiền sản giật ở quý 3 của thai kỳ**

Nhóm thai phụ	Nồng độ DNA phôi thai			p
	n	$\bar{X}$	Khoảng dao động (min-max)	
Bình thường	30	2196,62	742,98 – 6397,98	< 0,01
Tiền sản giật	27	28701,26	5678,57 – 61666,14	

*Nhận xét:*

Nồng độ DNA phôi thai ở nhóm thai phụ tiền sản giật cao gấp 14 lần so với nhóm thai phụ bình thường có cùng tuổi thai tương ứng, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .



**Biểu đồ 3.3. Nồng độ DNA phôi thai tự do (log) trong huyết tương thai phụ bình thường và tiền sản giật ở quý 3 của thai kỳ**

*Nhận xét:*

Nồng độ DNA phôi thai tự do ở nhóm thai phụ tiền sản giật tăng cao so với nhóm thai phụ bình thường có tuổi thai tương ứng.

## Chương 4. BÀN LUẬN

Chăm sóc sức khỏe sinh sản là một trong những mục tiêu quan trọng của ngành Y tế của tất cả các nước trên thế giới. Mặc dù với sự phát triển của y học, đặc biệt là sự quan tâm đầu tư cho công tác chăm sóc sức khỏe bà mẹ và trẻ em ngày càng được chú trọng, nhưng hiện nay thai nghén vẫn còn là một yếu tố nguy cơ rất lớn có thể ảnh hưởng đến tính mạng và sức khỏe của người phụ nữ. Trong đó, tiền sản giật là một trong những bệnh lý nguy hiểm hàng đầu gây ra bệnh tật và tử vong cho người mẹ và thai nhi [2]. Đây là một rối loạn nghiêm trọng thường phát triển sau tuần thứ 20 của thai kỳ, được biểu hiện bởi huyết áp cao ( $\geq 140/90$ mmHg) và protein niệu ( $\geq 300$ mg/l/24h). Người ta ước tính rằng nếu tiền sản giật được phát hiện và điều trị đầy đủ thì mỗi năm có thể cứu sống được 50.000 thai phụ.

Năm 1989, Lo và CS đã công bố sự có mặt của NST Y của phôi thai trong máu ngoại vi của mẹ khi mang thai; đến năm 1990, Lo và CS công bố thành công trong việc sử dụng kỹ thuật nested PCR có thể phát hiện được NST Y của thai trong máu ngoại vi của mẹ. Sau đó, năm 1997 tác giả lại phát hiện được sự lưu hành của các mảnh DNA phôi thai tự do ngay trong huyết tương và huyết thanh của những thai phụ mang thai nam [4]. Với số lượng thấp của những tế bào thai được tìm thấy trong tuần hoàn mẹ (khoảng 1 tế bào thai/1 ml máu mẹ) đã làm giới hạn việc áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử cho việc phân tích gen học từ các tế bào chiết tách từ máu mẹ [28]. Hiện nay cùng với sự tiến bộ của khoa học kỹ thuật thì các kỹ thuật sinh học phân tử không ngừng được ứng dụng rộng rãi trong tất cả các lĩnh vực: y học, dược học,... Các nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật: PCR (Polymerase Chain Reaction), nested PCR, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), Realtime PCR, ... để phát hiện DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ. Đối với các kỹ thuật

PCR thông thường mới dừng lại ở mức có khuếch đại được đoạn DNA cần thiết hay không hay xác định đột biến nếu có thông qua việc xuất hiện hay biến mất của vị trí nucleotide hay đoạn DNA trong đoạn gen được khuếch đại do enzym cắt tác động, do đó, vẫn chưa trả lời được: “Số lượng đoạn DNA quan tâm chính xác là bao nhiêu”. Kỹ thuật Realtime PCR là kỹ thuật PCR mà kết quả khuếch đại DNA đích hiển thị được ngay sau mỗi chu trình nhiệt, Lo Y.M và CS (1998), Costa JM. và CS (2001), Honda H. và CS (2002), Rijndir (2003), Galbiati (2005) đã nghiên cứu áp dụng kỹ thuật Realtime PCR để định lượng DNA thai từ tuần thứ 5 và 6 của thai kỳ, kỹ thuật này trả lời cho câu hỏi chính xác “có bao nhiêu DNA cần quan tâm và lượng DNA này thay đổi như thế nào trong quá trình tiến triển của bệnh” [22],[33],[122]. Vì vậy, nghiên cứu về kỹ thuật Realtime PCR và ứng dụng của nó đặc biệt trong định lượng DNA phôi thai là điều cần thiết.

#### **4.1. Một số đặc điểm của đối tượng nghiên cứu**

Trong nghiên cứu này các thai phụ đến khám, theo dõi và điều trị tại Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội, Bệnh viện Phụ Sản Trung ương và Phòng khám Vạn Phúc. Chúng tôi đã thu thập được là 101 thai phụ bình thường và 50 thai phụ TSG, các đối tượng nghiên cứu được lựa chọn đúng theo các tiêu chuẩn đã được đưa ra trong phần đối tượng và phương pháp nghiên cứu.

Sau đó lựa chọn trong đối tượng đã thu thập được, tiến hành định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ, sự thay đổi nồng độ DNA phôi thai tự do giúp phát hiện sớm và sàng lọc các thai phụ có nguy cơ tiền sản giật [76]. Điều này rất quan trọng trong việc theo dõi và quản lý thai nghén.

Về một số đặc điểm của đối tượng nghiên cứu:

Những đặc điểm lâm sàng của nhóm thai phụ bình thường như tuổi, huyết áp và các xét nghiệm huyết học và hóa sinh cơ bản đều nằm trong giới hạn bình thường và không có thai phụ nào tiến triển tiền sản giật (kết quả bảng 3.1; bảng

3.3, bảng 3.4, bảng 3.5, bảng 3.6 và bảng 3.7). Như vậy sự lựa chọn đối tượng nghiên cứu thuộc nhóm chứng của chúng tôi đã đảm bảo là lựa chọn những thai phụ bình thường. Đồng thời không có sự khác biệt về tuần thai ở quý 3 giữa nhóm thai phụ bình thường và thai phụ TSG (kết quả bảng 3.2).

Các chỉ số về huyết học: số lượng hồng cầu, hematocrit, hemoglobin, số lượng tiểu cầu và các chỉ số về hóa sinh máu cơ bản: ALT, AST, ure, creatinin của cả 2 nhóm thai phụ bình thường và thai phụ tiền sản giật đều nằm trong giới hạn bình thường. Đối với thai phụ TSG: chỉ số về huyết áp tâm thu, huyết áp tâm trương, triệu chứng phù, số lượng bạch cầu, chỉ số acid uric, protein niệu đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm bình thường với  $p < 0,01$  (theo kết quả bảng 3.1, bảng 3.3, bảng 3.4, bảng 3.5, bảng 3.6 và bảng 3.7). Điều này hoàn toàn phù hợp, do nhóm nghiên cứu đã lựa chọn những thai phụ đã được chẩn đoán là tiền sản giật và đây là các triệu chứng lâm sàng, xét nghiệm điển hình của TSG. Theo kết quả bảng 3.5 cho thấy tình trạng thiếu máu gặp ở cả thai phụ tiền sản giật và thai phụ bình thường. Bình thường khi có thai đòi hỏi sự tăng lưu lượng máu trong tuần hoàn tử cung - rau tăng lên làm khối lượng máu tăng lên nhưng tăng nhiều về mặt huyết tương hơn là huyết cầu do đó làm số lượng hồng cầu trong máu hơi giảm, tỷ lệ huyết sắc tố và hematocrit giảm làm thai phụ có xu hướng thiếu máu nhược sắc, có phải chăng là ở thai phụ TSG do lưu lượng máu tử cung - rau giảm dẫn tới thiếu máu rau thai làm rối loạn chức năng nội mạch, rối loạn chức năng đông máu làm NO giảm gây co mạch nên phải kích thích tủy xương làm tăng sinh hồng cầu.

Về một số đặc điểm của trẻ sơ sinh ở các sản phụ bình thường và tiền sản giật: kết quả bảng 3.8 và bảng 3.9 cho thấy ở nhóm thai phụ TSG khi sinh chủ yếu bằng hình thức mổ lấy thai chiếm 80%; 76% con sinh ra sống và có cân nặng  $< 2000$ gram.

## **4.2. Hoàn chỉnh và xây dựng đường chuẩn của kỹ thuật Realtime PCR định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ**

### **4.2.1. Hoàn chỉnh kỹ thuật chiết tách DNA phôi thai tự do theo quy trình của Randen I. và CS**

Năm 1997, Lo và CS phát hiện được DNA tự do trong huyết tương và huyết thanh thai phụ [4]. Nhưng do số lượng thấp của những tế bào thai được tìm thấy trong tuần hoàn mẹ (khoảng 1 tế bào thai/1 ml máu mẹ) đã làm giới hạn việc áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử cho việc phân tích gen học từ các tế bào chiết tách từ máu mẹ dẫn đến hạn chế sự phát triển và ứng dụng chúng vào chẩn đoán trước sinh thường quy.

Có nhiều phương pháp được sử dụng để chiết tách DNA và lựa chọn phương pháp tách chiết phù hợp cho mẫu thử là một yếu tố rất quyết định để giúp thành công trong các xét nghiệm PCR hay Realtime PCR. Một số quy trình chiết tách DNA phôi thai tự do từ máu mẹ: quy trình của Lo Y.M. và CS (1997), quy trình của Randen I. và CS (2003) và quy trình của Benachi A. và CS (2005) [4],[120],[123]. Tuy nhiên, chúng tôi tiến hành chiết tách DNA phôi thai tự do theo quy trình của Randen I. và CS (2003) vì quy trình này sử dụng QIAgen Blood Mini Kit (QIAgen, Hilden, Germany) giá thành phù hợp và vẫn đảm bảo được sản phẩm DNA phôi thai tự do thu được sau chiết tách, đồng thời có cải tiến quy trình này để áp dụng trong nghiên cứu:

Việc đánh giá sự chiết tách và tinh khiết DNA được tiến hành trên sự tăng tổng lượng huyết tương (200-800 $\mu$ l) đã xác nhận rằng 400 $\mu$ l huyết tương cho phép thu được số lượng DNA cao hơn so với 200 $\mu$ l huyết tương như nhà sản xuất đã đưa ra, lượng huyết tương cao hơn (600 – 800 $\mu$ l) cho phép thu số lượng DNA cao hơn.

Trong bước cuối cùng đã được tối ưu hóa, rửa kỹ sau bổ sung huyết tương vào cột bằng cách dùng 1ml dung dịch đệm AW1 và AW2 để thu hồi

DNA dễ dàng. Do vậy, phải điều chỉnh lượng huyết tương và lượng AE làm thoi DNA từ cột sao cho lượng DNA chiết tách từ huyết tương thai phụ đạt nồng độ và độ tinh khiết tối ưu của lượng DNA chiết tách từ huyết tương thai phụ chuẩn bị cho PCR.

Yêu cầu sản phẩm sau khi chiết tách DNA để dùng cho PCR và Realtime PCR: mẫu DNA không được dài quá, thường khuếch đại tốt nhất đối với đoạn DNA dài khoảng < 300bp. DNA thu nhận được sau chiết tách phải tinh sạch, loại bỏ được tạp nhiễm và các phân tử DNA thu được ở trạng thái nguyên vẹn tối đa.

Từ kết quả Bảng 3.10. kết quả đo độ tinh sạch của DNA sau chiết tách từ huyết tương của thai phụ khi đo  $OD_{260}/OD_{280}$  ở 101 thai phụ bình thường:  $1,98 \pm 0,12$  ở 50 thai phụ TSG:  $1,95 \pm 0,15$  do đó đảm bảo độ tinh sạch của DNA.

#### **4.2.2. Kết quả của PCR lồng để kiểm tra DNA sau chiết tách**

Với mục đích kiểm tra phát hiện có DNA trong huyết tương thai phụ, nhóm nghiên cứu tiến hành kỹ thuật PCR lồng các cặp mồi  $X_1X_3$  và  $X_2X_3$ . Theo kết quả của bảng 3.11 và hình 3.1 cho thấy: tất cả mẫu chứng và mẫu của đối tượng nghiên cứu đều có sản phẩm PCR cuối cùng 261bp, chứng tỏ có DNA tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ và đây là tiền đề cho việc tiến hành phát hiện gen SRY tiếp theo.

#### **4.2.3. Kết quả của PCR lồng để phát hiện đoạn gen cần định lượng**

Từ kết quả của PCR lồng kiểm tra DNA sau chiết tách, chúng tôi tiếp tục dùng DNA của các mẫu chứng và mẫu của đối tượng nghiên cứu này tiến hành kỹ thuật PCR lồng với cặp mồi  $Y_{1.5}Y_{1.6}$  và  $Y_{1.7}Y_{1.8}$  để kiểm tra phát hiện gen SRY, kết quả bảng 3.12 và hình 3.2 cho thấy: chỉ có các mẫu DNA chiết tách từ chứng dương (huyết tương của thai phụ bình thường mang thai nam) và từ huyết tương của thai phụ bình thường mang thai nam (đối chiếu với thực tế thai

phụ này sinh con trai) mới có sản phẩm với cặp mồi này là 198bp, còn các mẫu chứng dương (huyết tương của thai phụ bình thường sinh con gái) và huyết tương của thai phụ bình thường mang thai nữ (đối chiếu với thực tế thai phụ này sinh con gái) thì không có sản phẩm. Kết quả PCR đã chứng minh rằng trong huyết tương thai phụ có mặt DNA của NST Y của thai. Đồng thời, các đối tượng nghiên cứu đều được chúng tôi theo dõi đến thời điểm sinh con để kiểm tra đối chiếu lại, cho kết quả phù hợp. Như vậy, với việc sử dụng PCR lồng bằng các cặp mồi trên, chúng tôi đều phát hiện đủ và đúng các trường hợp có thai và phát hiện được sự có mặt của DNA của NST Y của thai. Kết quả của chúng tôi phù hợp với một số tác giả khác khi dùng kỹ thuật này để phát hiện sự có mặt của DNA phôi thai tự do đặc hiệu của NST Y lưu hành trong huyết tương thai phụ [52],[54],[124],[125].

Do vậy, chúng tôi đã lựa chọn 2 cặp mồi khi sử dụng kỹ thuật PCR lồng là: X<sub>1</sub>X<sub>3</sub> và X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> để kiểm tra có mặt DNA và lựa chọn 2 cặp mồi khi sử dụng kỹ thuật PCR lồng là Y<sub>1.5</sub>Y<sub>1.6</sub> và Y<sub>1.7</sub>Y<sub>1.8</sub> để phát hiện DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ.

#### **4.2.4. Hoàn chỉnh và xây dựng đường chuẩn của kỹ thuật Realtime PCR**

##### **4.2.4.1. Kết quả tạo minigene nồng độ 10<sup>12</sup> copy/ml để xây dựng đường chuẩn cho nghiên cứu**

Realtime PCR là kỹ thuật PCR mà kết quả khuếch đại DNA đích hiển thị được ngay sau mỗi chu kỳ nhiệt của phản ứng, do vậy khi làm thí nghiệm không cần thiết phải làm tiếp các thí nghiệm để đọc và phân tích kết quả để xác định có sản phẩm khuếch đại đích hay không vì kết quả cuối cùng của phản ứng khuếch đại cũng được hiển thị ngay sau khi hoàn tất phản ứng khuếch đại.

Để Realtime PCR xác định được chính xác số lượng bản đích ban đầu có trong mẫu thử thì phải thực hiện các mẫu thử chứa các số lượng bản DNA đích ban đầu cần xác định số lượng cùng lúc với các mẫu chuẩn chứa số lượng DNA



ban đầu đã biết rõ số lượng và các mẫu chuẩn là các mẫu pha loãng theo hệ số pha loãng 10 chứa số lượng DNA đích ban đầu, nên số lượng bản DNA đích trong các mẫu chuẩn được biểu thị bằng logarith cơ số 10 của số lượng này.

Việc thiết lập biểu đồ chuẩn là rất cần thiết khi làm Realtime PCR chẩn đoán, đặc biệt khi để xác định chính xác số lượng tác nhân đích ban đầu có trong mẫu thử, đồng thời đánh giá được thao tác kỹ thuật của người làm thử nghiệm có đạt hay không, nếu thao tác kỹ thuật mà không chính xác thì không thể nào có được kết quả định lượng chính xác được. Hiện tại, trên thị trường chưa có bậc thang nồng độ chuẩn để định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ sử dụng cho kỹ thuật Realtime PCR. Để có thể tiến hành định lượng được DNA phôi thai tự do bằng kỹ thuật Realtime PCR sử dụng Taqman Probe phải tạo được minigene để có chứa trình tự của gen SRY. Theo nghiên cứu của các tác giả khi định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ sử dụng kỹ thuật Realtime PCR với cặp mồi của gen SRY cho kết quả độ nhạy và độ đặc hiệu cao: 97% (Rijinders và CS, 2001), 86% (Hwa và CS, 2004), 89% (Davalieve và CS), 80% (Pichiassi và CS, 2008), gần 100% (Lo và CS, 1997) và theo nghiên cứu của KHR Khorram và CS (2013) thì độ nhạy 97,3% (95% CI= 0,862 - 0,995) và độ đặc hiệu 97,4% (95% CI=0,865 - 0,995) [4],[126],[127],[128],[129],[130].

Vì vậy, chúng tôi áp dụng kỹ thuật Realtime PCR sử dụng Taqman probe với cặp mồi của gen SRY để định lượng DNA phôi thai trong huyết tương thai phụ. Kết quả hình 3.4 chúng tôi đã tạo được gen có chứa trình tự của gen SRY (minigene) có chiều dài 137bp và đoạn gen này được đặt vào plasmid, sau đó cho vào vi khuẩn để nhân lên nhiều lần (hình 3.3).

Khi thiết kế mồi cho Realtime PCR dùng Taqman probe nên thiết kế mồi có nhiệt độ chảy khoảng 55<sup>0</sup>C - 60<sup>0</sup>C thấp hơn nhiệt độ chảy của Taqman probe và thiết kế Taqman probe không dài quá 30bp, tỷ lệ GC trong probe khoảng 30

- 80% với C nhiều hơn G và chiều dài của sản phẩm khuếch đại trong khoảng 75-150bp để được hiệu quả PCR tối ưu. Nghiên cứu của Bianchi đã sử dụng kỹ thuật PCR định lượng cho thấy chỉ khuếch đại được các đoạn DNA ngắn của phôi chiết tách từ huyết tương thai phụ, tác giả đã gián tiếp kết luận là DNA phôi thai tự do có mặt trong máu mẹ có trọng lượng nhỏ hơn 450bp [12]. Ngoài ra, theo Bischoff và CS (2005) nghiên cứu về DNA phôi thai tự do trong máu mẹ thấy rằng 57% số DNA phôi thai tự do trong máu mẹ có kích thước khoảng 201bp và 20% có kích thước > 193bp nhưng không quá 313bp [131]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết kế mỗi SRY-109F và SRY-245R cho sản phẩm có độ dài 137bps.

Sử dụng kỹ thuật PCR lồng để kiểm tra, chúng tôi thấy rằng sản phẩm đảm bảo đã có đoạn minigene của gen SRY có trong plasmid (kết quả hình 3.4).

#### **4.2.4.2. Xây dựng đường chuẩn theo các mẫu chuẩn đã được pha loãng**

##### *a, Sử dụng kỹ thuật PCR kiểm tra sơ bộ nồng độ của mẫu chuẩn*

Từ mẫu chuẩn (minigene) đã xây dựng được, chúng tôi kiểm tra nồng độ của mẫu chuẩn bằng máy nanodrop, sau đó pha loãng mẫu chuẩn theo định luật Avogadro từ  $10^{12}$  đến  $10^0$  copy/ml

Kiểm tra sơ bộ nồng độ của mẫu chuẩn bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi SRY-109F và SRY-245R kết quả đều cho sản phẩm mong muốn và đậm độ của các băng mẫu tăng dần theo nồng độ của DNA (theo kết quả hình 3.5).

Do đó, mẫu chuẩn sau khi được pha loãng đảm bảo được độ tuyến tính của dung dịch chuẩn này, vì vậy, có thể dùng làm mẫu chuẩn cho kỹ thuật Realtime PCR định lượng DNA phôi thai tự do.

##### *b, Sử dụng kỹ thuật Realtime PCR xây dựng đường biểu diễn chuẩn từ các mẫu chuẩn đã được pha loãng ở các nồng độ $10^{10}$ đến $10^0$ copy/ml*

Khi làm Realtime PCR điều quan trọng là phải lựa chọn được bước sóng để kích thích các reporter, để tín hiệu huỳnh quang được thiết bị ghi nhận cho

reporter không ảnh hưởng lên nhau. Trong kỹ thuật này chúng tôi chọn reporter FAM (máy BioRad) để sử dụng trong nghiên cứu.

**Bảng 4.1. Liệt kê các kênh kính lọc nguồn sáng kích thích và kênh lọc huỳnh quang có trên IQ5 tương ứng với các reporter khuyến cáo sử dụng. Các chữ đậm là reporter tối ưu được chọn cho 5 màu**

Tên reporter	Bước sóng kích thích	Kênh kính lọc nguồn sáng kích thích	Bước sóng HQ phát ra	Kênh kính lọc
<b>FAM</b>	<b>495</b>	<b>Kênh 1: 475 - 495nm</b>	<b>520</b>	<b>Kênh 1: 515-545nm</b>
<b>TAMRA</b>	<b>557</b>	<b>Kênh 3: 530 - 560nm</b>	<b>583</b>	<b>Kênh 3: 575-595nm</b>
Cy3	548	Kênh 3: 530 - 560nm	566	Kênh 2: 565-585nm
<b>TEXAS RED</b>	<b>590</b>	<b>Kênh 4: 560 - 590nm</b>	<b>610</b>	<b>Kênh 4: 610-640nm</b>
Rox	586	Kênh 4: 560 - 590nm	610	Kênh 4: 610-640nm
TET	521	Kênh 2: 515 - 545nm	536	Kênh 1: 515-545nm
VIC	538	Kênh 2: 515 - 545nm	554	Kênh 2: 565-585nm
<b>HEX</b>	<b>535</b>	<b>Kênh 2: 515 - 545nm</b>	<b>556</b>	<b>Kênh 2: 565-585nm</b>
JOE	529	Kênh 2: 515 - 545nm	555	Kênh 2: 565-585nm
LC640	618	Kênh 5: 615 - 645nm	637	Kênh 4: 610-640nm
<b>Cy5</b>	<b>647</b>	<b>Kênh 5: 615 - 645nm</b>	<b>667</b>	<b>Kênh 5: 670-700nm</b>

Sau khi kiểm tra sơ bộ mẫu chuẩn, chúng tôi đánh giá lại các mẫu chuẩn trong bậc thang nồng độ đã được pha loãng bằng kỹ thuật Realtime PCR. Theo Bio-Rad (2006), tiêu chuẩn của một phản ứng Realtime PCR tối ưu cần phải đạt là đường chuẩn tuyến tính ( $R^2 > 0,98$ ), hiệu quả khuếch đại đạt cao (90 - 105%) và mức độ đồng nhất qua các lần phản ứng lặp lại [116]. Theo Phạm

Hùng Vân (2009): đánh giá biểu đồ chuẩn lý tưởng nhất là biểu đồ có hệ số tương quan  $R \geq 0,990$ , hiệu quả PCR:  $E = 90 - 105\%$  [113].

Để đánh giá các chỉ tiêu này, chúng tôi tiến hành xây dựng đường chuẩn cho định lượng DNA phôi thai tự do bằng kỹ thuật Realtime PCR trên hệ thống Bio-Rad CFX 96 với các mẫu chuẩn đã được pha loãng với nồng độ từ  $10^{12}$  đến  $10^0$  copy/ml tại Bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn dịch Trường Đại học Y Hà Nội. Đường chuẩn được thiết lập từ giá trị logarit lượng DNA ban đầu của từng độ pha loãng với giá trị Ct. Hiệu quả khuếch đại được tính toán từ độ dốc của đường chuẩn. Kết quả thu được cho thấy đường chuẩn đảm bảo yêu cầu với  $R^2 = 0,991$  và hiệu quả khuếch đại  $E = 96,3\%$  (kết quả hình 3.6).

Để kiểm tra độ tin cậy của bậc thang chuẩn đã thực hiện được, chúng tôi tiến hành kỹ thuật Realtime PCR tại Phòng Viêm gan virus - Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (sử dụng máy Realtime 7500 Fast (Thermofisher)), kết quả phản ứng Realtime PCR của gen SRY trong nghiên cứu được thực hiện tại đây cũng cho tín hiệu tốt với:  $R^2 = 1$  và hiệu quả khuếch đại  $E = 90,0\%$  (kết quả hình 3.7). Các nồng độ dung dịch pha loãng đối chiếu với các chu kỳ khớp với đường chuẩn khi dựng chuẩn đã làm tại Bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn dịch Trường Đại học Y Hà Nội.

Như vậy, đường chuẩn mà chúng tôi xây dựng được có sự đồng nhất của độ lặp lại cao. Vì vậy, phản ứng Realtime PCR trong nghiên cứu của chúng tôi thỏa mãn các tiêu chuẩn như Bio-Rad (2006) [116], nên có thể ứng dụng phương pháp này trong các nghiên cứu tiếp theo.

Dựa vào đường chuẩn của Realtime PCR, sẽ tính toán được số copy của DNA đích ban đầu: phần mềm của máy sẽ tính toán nhờ vào hàm số biểu diễn mối tương quan giữa chu kỳ ngưỡng ( $Y = Ct$ ) với  $\log_{10}$  của số lượng bản DNA đích ban đầu có trong mẫu thử ( $X = \log_{10} Sq$ ) (Log Starting Quantity, copy

number). Hàm số đó là:  $Y = [\text{slope}(X)] + \text{intercep}$  (trong đó: slope và intercep đều hiển thị trên biểu đồ chuẩn).

Từ hàm số này, máy tính sẽ hiển thị Sq (Starting quantity) =  $10^{[(Ct - \text{intercep})/\text{slope}]}$ . Từ Sq sẽ cho kết quả định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do có trong huyết tương thai phụ.

### **4.3. Nồng độ và sự thay đổi của DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bình thường, thai phụ tiền sản giật và ứng dụng trong dự báo sớm tiền sản giật.**

Sử dụng kỹ thuật siêu âm hay tìm các dấu ấn sinh học trong huyết tương, huyết thanh thai phụ thường được sử dụng như các xét nghiệm sàng lọc sơ cấp cho việc chẩn đoán sớm những bất thường về phía thai phụ và thai. Trái ngược với những nghiên cứu truyền thống cho rằng rau thai là một rào ngăn cản không thấm giữa thai phụ và thai nhi, nhiều nghiên cứu đã cho thấy rằng: cả tế bào thai nhi nguyên vẹn và DNA phôi thai tự do có lưu hành trong huyết tương của thai phụ. Sự hiện diện của các tế bào thai nhi lưu hành trong tuần hoàn của thai phụ lần đầu tiên được Georg Schmorl ghi nhận bởi ông nhận thấy có sự hiện diện của tế bào không lồ đa nhân hợp bào gốc nhau thai trong mô phổi của những người phụ nữ đã chết do các biến chứng sản giật. Cùng với sự tiến bộ trong sinh học tế bào và phân tử tiếp tục làm sáng tỏ cả sinh lý và sinh lý bệnh của các tế bào thai nhi trong tuần hoàn thai phụ. Khái niệm này là nền tảng của các lĩnh vực được phát triển nhanh chóng của chẩn đoán tiền sản không xâm lấn. Theo Chen XQ (1996) một lĩnh vực nghiên cứu phát triển sau khi phát hiện ra một lượng lớn DNA của tế bào khối u tự do lưu hành trong huyết tương của bệnh nhân ung thư [132]. Lý giải rằng việc phát triển của thai nhi và rau thai trong cơ thể thai phụ cũng tương tự như việc phát triển của tế bào ung thư trong cơ thể bệnh nhân ung thư, năm 1997, Lo và CS đã phát hiện được sự lưu hành

của DNA phôi thai tự do trong tuần hoàn của thai phụ mang thai nam đã mở ra hướng nghiên cứu mới về kỹ thuật chẩn đoán trước sinh không xâm lấn [4].

Năm 1998, Lo và CS đã chứng minh rằng nồng độ DNA phôi thai tự do tăng tương ứng với sự phát triển của thai và tăng đột ngột vào 3 tháng cuối [33]. Năm 1999, Lo và CS cũng đã chứng minh rằng nồng độ DNA phôi thai tự do ở thai phụ TSG tăng gấp 5 lần so với nhóm thai phụ bình thường có tuổi thai tương ứng [14]. Đồng thời cũng có nghiên cứu đã thấy rằng ở những thai phụ tiến triển thành TSG thì nồng độ DNA phôi thai tự do tăng đột ngột ở thời điểm 3 tuần trước khi có các triệu chứng của TSG [7]. Vì vậy, việc nghiên cứu về DNA phôi thai tự do trong huyết tương, huyết thanh thai phụ là một lĩnh vực mới đã và đang được nghiên cứu ở nhiều nước.

#### **4.3.1. Nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bình thường.**

Chúng tôi tiến hành định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bình thường bằng kỹ thuật Realtime PCR ở 3 thời điểm của thai kỳ. Kết quả Bảng 3.13 cho thấy: nồng độ DNA trung bình ở quý 1: 574,79 copy/ml (khoảng dao động 60,55 - 1698,52 copy/ml), ở quý 2: 1587,11 copy/ml (khoảng dao động 248,31 - 4838,92 copy/ml) và ở quý 3: 2196,62 copy/ml (khoảng dao động 742,98 - 6397,98 copy/ml). Điều này chứng tỏ có DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ, kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của Lo và CS (1997), Invernizzi và CS (2002), Smid và CS (2003), Sifakis S. và CS (2009), Hong Yu và CS (2013) đã định lượng được nồng độ của DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ [4],[9],[34],[78],[133].

Đối chiếu với nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bình thường ở các nghiên cứu khác:

**Bảng 4.2. Nồng độ DNA phôi thai tự do ở nhóm thai phụ bình thường**

Tác giả	Môi	Tuần thai trung bình (min – max)	n	Nồng độ DNA phôi thai trung bình (copy/ml)
Lo và CS (1999) [14]	SRY-109F SRY-245R	32 (27 – 41)	20	76 (54-163)
Smid và CS (2001) [134]	SRY-109F SRY-245R	--(26- 40)	38	24 (0– 138)
Swinkles và CS (2002) [135]	SRY-106F SRY-192R	33 (27-34)	10	128 (96-170)
Lau và CS (2002) [136]	SRY-109F SRY-245R	32 (30 – 37)	10	277 (34-468)
Zhong và CS (2005) [137]	SRY-109F SRY-245R	30 (24 – 33)	18	106 (47-269)
		36 (34 – 42)	12	125 (38-358)
Al Nakib M. và CS (2009) [46]	SRY-109F SRY-245R	19 - 28	28	579 (169 - 1203)
Edna D'Souza và CS (2012) [138]	SRY-109F SRY-245R	> 28	50	728,5 (185 -1831)
		11 - 12	5	1182,09 (488,7 - 2844,1)
		12 - 13	3	1527,12 (213,7 - 3960,6)
		13 - 14	2	2149,86 (1316,5 - 2983,1)
		18 - 20	4	2498,21 (725,5 - 6643,9)
	SRY-109F SRY-245R	12 - 14	30	574,79 ( 60,55 - 1698,52)

Nghiên cứu của chúng tôi (2015, 2016)	16 - 25	30	1587,11 (248,31 - 4838,92)
	31 - 35	30	2196,62 (742,98 - 6397,98)

Nguồn gốc và cơ chế của sự gia tăng DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ vẫn chưa rõ ràng. Trong quá trình mang thai, DNA phôi thai tự do có thể có nguồn gốc từ thai và/hoặc rau thai và từ mẹ; các nghiên cứu cũng đặt ra các giả thuyết về cơ chế của sự gia tăng nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ, trong đó do 2 khả năng: tăng giải phóng DNA phôi thai tự do vào tuần hoàn thai phụ và/hoặc làm giảm lượng DNA lưu hành từ máu thai phụ.

Sự giải phóng DNA phôi thai tự do liên quan đến các thay đổi sinh lý của quá trình mang thai [4]. Năm 1993, Fournie và CS đã chứng minh rằng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ là dấu ấn của các tế bào chết theo chương trình [18]. Nguồn gốc của DNA phôi thai tự do có mặt trong tuần hoàn thai phụ theo giả thuyết của Bianchi DW và CS (2004) do 3 nguồn gốc: tế bào huyết học của thai, rau thai và trao đổi trực tiếp của các phân tử DNA. Như vậy có một lượng lớn tế bào thai đã qua rau thai đang trải qua quá trình chết thường quy và sự phá hủy của chúng giải thích cho sự hiện diện của DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ [19],[139]. Đồng thời, tuần thai tăng lên thì kích thước bánh rau tăng cũng góp phần làm gia tăng nồng độ của DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ. Hầu hết DNA phôi thai tự do được loại bỏ bởi gan, một phần nhỏ do thận [14],[140],[141]. Kết hợp các nghiên cứu này với nhau cho thấy, DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ là hiện tượng phổ biến về mặt sinh lý trong thời kỳ mang thai ở các thai phụ.



Về độ tin cậy của kết quả: chúng tôi sử dụng quy trình chiết tách DNA, lượng huyết tương ban đầu của thai phụ bình thường dùng cho chiết tách DNA, lượng DNA phôi thai tự do sau chiết tách đã được sử dụng để khuếch đại, môi, mẫu dò và các quy trình khuếch đại của Realtime PCR để định lượng DNA phôi thai tự do sau chiết tách tương tự như quy trình của Lo và CS (1998) và của các tác giả trên, điều này đồng nghĩa với độ nhạy của Realtime PCR là tương đương nhau ở các nghiên cứu.

Kết quả về nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ bình thường ở nghiên cứu này của chúng tôi cao hơn với các nghiên cứu trên đối tượng thai phụ ở Châu Âu, tuy nhiên, nồng độ DNA phôi thai tự do ở tuần 12-14 trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với nghiên cứu của Edna D'Souza và CS (2012) trên đối tượng thai phụ ở Ấn Độ là nước thuộc khu vực Châu Á. Điều này có thể giải thích theo các nguyên nhân sau:

- Do sự khác biệt về khu vực địa lý, điều kiện về địa dư sẽ làm ảnh hưởng tới nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ. Nghiên cứu của Zhong XY và CS (2004) đã chứng minh điều kiện sống ở những độ cao khác nhau cũng ảnh hưởng tới sự có mặt của DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ, nghiên cứu được tiến hành ở 3 nhóm thai phụ mang thai bình thường gồm 19 thai phụ sống ở vùng biển, 21 thai phụ nhóm người Hán di cư sống ở vùng thấp và 27 thai phụ người Tây Tạng thuộc vùng núi cao kết quả cho thấy nồng độ DNA tương ứng trong huyết tương thai phụ lần lượt như sau: 22,5 copy/ml (dao động 5,5 – 87,5 copy/ml); 90 copy/ml (17,5 – 212,5 copy/ml) và 76,5 copy/ml (5,57 – 1780 copy/ml). Những thai phụ sống ở vùng có độ cao thì nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ bình thường càng tăng và điều này được lý giải do thiếu oxy, đường kính động mạch tử cung sẽ nhỏ hơn và dòng máu động mạch tử cung sẽ thấp hơn [38],[142].

- Đồng thời có sự khác nhau về đặc điểm của đối tượng nghiên cứu, phần lớn phụ nữ mang thai ở Việt Nam đều có tình trạng thiếu máu (theo kết quả bảng 3.5), ở thai phụ bình thường khi có thai đòi hỏi sự tăng lưu lượng máu trong tuần hoàn tử cung - rau tăng lên làm khối lượng máu tăng lên, có khi tăng gấp rưỡi so với lúc bình thường nhưng tăng nhiều về mặt huyết tương hơn là huyết cầu do đó làm số lượng hồng cầu trong máu hơi giảm, tỷ lệ huyết sắc tố và hematocrit giảm làm thai phụ có xu hướng thiếu máu nhược sắc, có lẽ nó cũng góp phần làm tăng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ. Chính sự khác biệt này đòi hỏi cần phải xây dựng giá trị tham chiếu về nồng độ DNA phôi thai tự do cho thai phụ Việt Nam bình thường qua các giai đoạn tuổi thai trong thai kỳ. Điều này rất có ý nghĩa trong việc đánh giá xét nghiệm nhằm đưa ra dự báo sớm và chẩn đoán TSG chính xác.

Theo kết quả Biểu đồ 3.1. chúng tôi thấy rằng nồng độ DNA phôi thai tự do có xu hướng tăng dần theo tuổi thai tương ứng, kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của Lo và CS (1998), Chan và CS (2003), Eric Wang (2013) [23],[33],[143]. Theo Lo và CS (1998) DNA phôi thai tự do xuất hiện với nồng độ cao lưu hành trong tuần hoàn thai phụ, nồng độ DNA phôi thai tự do là 25,4 copy/ml (dao động 3,3 - 69,4 copy/ml) ở giai đoạn sớm và 292,2 copy/ml (dao động 76,9 - 769 copy/ml) ở giai đoạn muộn, DNA phôi thai tự do xuất hiện trong huyết tương thai phụ từ 3 tháng đầu và nồng độ tăng cùng với tuổi thai (điều này có thể được giải thích bởi sự tăng diện tích của rau thai) và tăng đột ngột vào gần cuối thai kỳ, đặc biệt là sau tuần thai thứ 32 (đó có thể là kết quả của quá trình chuẩn bị sinh nở) và nồng độ trung bình của các mảnh DNA phôi thai trong huyết tương thai phụ trong 3 tháng giữa và 3 tháng cuối tương ứng là 3,4% và 6,2% DNA tổng số trong huyết tương thai phụ [33]. Nhiều nghiên cứu trước đó (Smid và CS (1997), Honda và CS (2002)) cũng thấy tồn tại mỗi

liên quan giữa số lượng DNA phôi thai tự do trong tuần hoàn thai phụ với tuổi thai.

Nghiên cứu của Al Nakib M. và CS (2009) định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do ở thai phụ bình thường tuần 19 - 28 thai kỳ là 579 copy/ml (169 - 1203 copy/ml) và ở tuần > 28 là 728,5 copy/ml (185 - 1831 copy/ml), nồng độ DNA cũng tăng dần theo tuổi thai [46]. Nghiên cứu của Wataganara T. và CS (2004) còn chứng minh nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn mẹ tăng 21% mỗi tuần trong quý 1 của thai kỳ, nồng độ này tăng lên nhanh chóng quý 3 của thai phụ mang thai bình thường, theo Chan và CS (2003) nồng độ DNA phôi thai tự do tăng trung bình 29,3% mỗi tuần ở quý 3 của thai kỳ và có mối tương quan tỷ lệ thuận giữa nồng độ DNA phôi thai tự do với tuổi thai tương ứng [23],[144]. Sự gia tăng nồng độ DNA phôi thai tự do có liên quan đến quá trình các tế bào rau thai chết theo chương trình, do stress oxy hóa tăng lên [139]. Tuổi thai cũng là một yếu tố có thể ảnh hưởng đến nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ, nghiên cứu của Wang và CS (2013): nồng độ DNA phôi thai tự do tăng lên trong suốt thời kỳ mang thai với mức tăng ban đầu là 0,1% mỗi tuần từ tuần 10 đến 20, sau đó tăng lên 1% mỗi tuần sau tuần 21 của thai kỳ [143]. Theo nghiên cứu của Taglauer và CS (2016), nồng độ DNA phôi thai tự do ở bất kỳ thời kỳ mang thai nào của thai phụ bình thường có phân bố hình chuông, đạt đỉnh từ 10 đến 20% vào khoảng tuần thứ 10 - 21 của thai kỳ [145].

Như vậy, chúng tôi đã định lượng được nồng độ của DNA phôi thai tự do qua các quý của thai kỳ ở thai phụ bình thường, nồng độ DNA phôi thai tự do ở nhóm thai phụ bình thường có xu hướng tăng dần theo tuổi thai.

#### **4.3.2. Nồng độ của DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ tiền sản giật**

Chúng tôi tiến hành định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương bằng kỹ thuật Realtime PCR ở nhóm thai phụ TSG, theo kết quả bảng 3.14. nồng độ DNA phôi thai tự do trung bình ở quý 2: 4882,79 copy/ml (khoảng dao động 1591,45 – 7677,00 copy/ml) và ở quý 3: 28701,26 copy/ml (khoảng dao động 5678,57 – 61666,14 copy/ml), nồng độ DNA có xu hướng tăng dần theo tuổi thai tương ứng và tăng cao ở những giai đoạn cuối của thai kỳ (kết quả biểu đồ 3.2.). Nồng độ DNA phôi thai tự do ở nhóm thai phụ TSG cao gấp 14 lần so với nhóm thai phụ bình thường có cùng tuổi thai tương ứng với  $p < 0,01$  (kết quả bảng 3.18. và biểu đồ 3.3.)

Đối chiếu với nghiên cứu của các tác giả khi định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương của thai phụ TSG.

**Bảng 4.3. Nồng độ DNA phôi thai tự do ở nhóm thai phụ bình thường và nhóm thai phụ tiền sản giật**

Tác giả	Marker	Tuần thai trung bình (min – max)	Nhóm TSG (n)	Nồng độ DNA phôi thai trung bình (copy/ml)	Nhóm chứng (n)	Nồng độ DNA phôi thai trung bình (copy/ml)
Lo và CS (1999) [14]	SRY	32 (27 – 41)	20	381 (194-788)	20	76 (54-163)
Smid và CS (2001) [134]	SRY	--(26- 40)	17	256 (59-859)	38	24 (0– 138)
Swinkles và CS (2002) [135]	SRY	33 (27-34)	7	781 (503-1212)	10	128 (96-170)
Lau và CS (2002) [136]	SRY	32 (30 – 37)	7	521 (247-3089)	10	277 (34-468)
Zhong và CS (2005) [137]	SRY	30 (24 – 33)	11	TSG sớm 547 (113 – 7088)	18	106 (47-269)

		36 (34 – 42)	12	TSG muộn 536 (61-1324)	12	125 (38-358)
Tao H và CS (2005) [146]	SRY	33,3 – 34,3	30	TSG nhẹ 758 ± 357	30	319 ± 99
				TSG nặng 1285 ± 573		
Nghiên cứu của chúng tôi 2015- 2016	SRY	(31 - 35)	17	30810,99 (5678,57 - 61666,14)	30	2196,62 (742,98- 6397,98)

Kết quả của các nghiên cứu trên đều cho thấy nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ TSG đều tăng lên rất cao và tăng gấp từ 4 lần trở lên so với nhóm thai phụ bình thường có cùng tuổi thai tương ứng. Năm 1999, hai năm sau khi phát hiện được sự lưu hành của DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ, Lo và CS định lượng nồng độ của DNA trong huyết tương thai phụ tiền sản giât đã chứng minh rằng nồng độ của nó tăng gấp 5 lần so với thai phụ bình thường [14]. Những kết quả này đã được chứng minh bởi các nghiên cứu của Leung và CS (2001) và Zong XY và CS (2002), Hahn S. và CS (2011), Seval MM. và CS (2015) ở các thai phụ tiền sản giât so với thai phụ bình thường [16],[20],[41],[147]

Theo nghiên cứu của Zhong XY và CS (2004) định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do ở 2 nhóm thai phụ TSG (nhóm 1 - thai phụ là người Hán di cư sống ở nơi có độ cao thấp và nhóm 2 - người Tây Tạng sống ở vùng núi cao) kết quả cho thấy nồng độ DNA tương ứng trong huyết tương thai phụ lần lượt như sau: 810 copy/ml (53 - 4910 copy/ml) và 859,54 copy/ml (50,3 – 8547,5 copy/ml). Tác giả cho rằng có 2 nguyên nhân dẫn tới tăng nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ tiền sản giât liên quan đến mức độ suy giảm tưới máu trong rau thai và mức độ nghiêm trọng của tiền sản giât. Khi tăng đáng kể các động mạch xoắn ốc ở niêm mạc tử cung của thai phụ sẽ

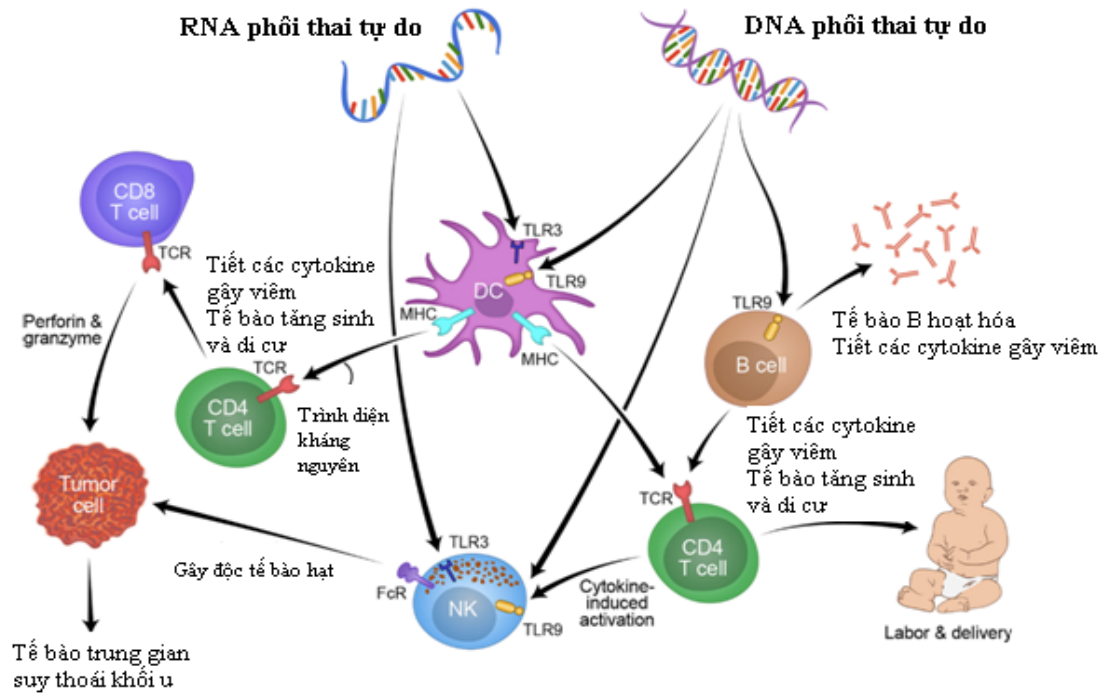
dẫn tới nhau thai thiếu máu cục bộ và tổn thương, đồng thời do quá trình chết theo chương trình do vậy làm gia tăng sự giải phóng DNA phôi thai vào tuần hoàn của thai phụ [38]. Palmer và CS (1999) cũng thấy rằng những thai phụ sống ở khu vực có độ cao 3100m so với mặt nước biển sẽ làm thay đổi sự cân bằng oxy bình thường, làm cản trở sự điều chỉnh sinh lý của mạch máu và có nguy cơ tiến triển tiền sản giật [148]. Nghiên cứu của Tao H và CS (2005) nồng độ DNA phôi thai tự do ở thai phụ bình thường (34,3 tuần) và thai phụ tiền sản giật (33,3 tuần) kết quả như sau: nhóm bình thường  $319 \pm 99$  copy/ml và tiền sản giật nhẹ là  $758 \pm 357$  copy/ml và ở thai phụ tiền sản giật nặng là:  $1285 \pm 573$  copy/ml; có sự khác biệt giữa các nhóm này với  $p < 0,01$  [146]. Nghiên cứu của Hong Yu và CS (2013) khi định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương 20 thai phụ ở giai đoạn sớm của TSG và 20 thai phụ bình thường, các thai phụ đều mang thai nam được phát hiện bởi gen SRY, kết quả cho thấy nồng độ DNA phôi thai ở thai phụ giai đoạn sớm của TSG (logged) (trung vị 3,08 ; dao động 2,93-3,68) cao hơn so với nhóm chứng (1,79; dao động 1,46-2,53) [78].

Ở thai phụ mang thai bình thường, nồng độ DNA phôi thai thấp, bởi vì các tế bào chết theo chương trình được loại bỏ hiệu quả nhờ quá trình thực bào. DNA phôi thai tự do lưu thông trong tuần hoàn thai phụ có thời gian bán hủy  $t/2$  ngắn [36] và hầu hết DNA phôi thai tự do được loại bỏ bởi gan, một phần nhỏ do thận [14],[140],[141]. Tiền sản giật là tình trạng bệnh lý do thai nghén gây ra, đây là một rối loạn nghiêm trọng thường biểu hiện sau tuần thứ 20 của thai kỳ, được xác định là có tăng huyết áp, protein niệu hoặc đi kèm theo phù và có thể kèm theo các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng khác [1],[57],[2]. Nghiên cứu của Bianchi DW. và CS (2004) đã đưa ra giả thuyết: nồng độ DNA tăng lần đầu tiên là do sự hoại tử của rau thai hoặc các tế bào chết theo chương trình, còn nồng độ DNA tăng lần thứ hai là do các triệu chứng của tiền sản giật

làm rối loạn các chức năng của mẹ kéo theo rối loạn sự bài tiết DNA phôi thai [19]. Như vậy, cơ chế của sự gia tăng nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ do 2 khả năng là do tăng giải phóng DNA phôi thai tự do vào tuần hoàn thai phụ và/hoặc làm giảm lượng DNA lưu hành từ máu thai phụ.

Theo giả thuyết của các tác giả, nguồn gốc của DNA phôi thai tự do có thể có nguồn gốc từ thai và/hoặc rau thai và từ mẹ. Vì vậy, ở thai phụ TSG, nồng độ của DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ tăng cao có liên quan đến tổn thương rau thai [149]. Sự tăng cao của nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn của những thai phụ TSG có thể là tăng quá mức của các tế bào chết theo chương trình, do giảm hiệu quả của quá trình thực bào. Theo giả thuyết của các tác giả khi tế bào rau thai bị thiếu oxy trong TSG sẽ làm tăng cơ chế chết theo chương trình và hoại tử tế bào rau thai thì sẽ làm biến đổi lượng DNA phôi thai tự do trong máu thai phụ trước khi có các triệu chứng về lâm sàng và sinh hóa, hay các dị tật của thai cũng sẽ làm biến đổi nồng độ DNA sớm từ giai đoạn đầu của thai kỳ. Như vậy có một lượng lớn tế bào thai đã qua rau thai đang trải qua quá trình chết thường quy và sự phá hủy của chúng giải thích cho sự hiện diện của DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ [19],[139]. Levine RJ. và CS (2004) cho rằng các tế bào chết theo chương trình xảy ra như một hiệu ứng thứ cấp để đáp ứng với tình trạng thiếu oxy của rau thai và đó là cần thiết cho sự khác biệt của nhau thai trong ba tháng đầu tiên của thai kỳ và nồng độ DNA phôi thai tự do khả năng vẫn sẽ ổn định trong giai đoạn sớm của nhóm thai phụ TSG [7]. Scharfe-Nugent và CS (2012) cho rằng nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành tăng trong tuần hoàn của thai phụ sẽ làm thúc đẩy quá trình viêm tăng lên và các biến chứng của nó là TSG, đẻ non, thai kém phát triển hay thai chết lưu. Ở những thai phụ mà có nồng độ DNA phôi thai tự do tăng cao từ tuần 11 - 14 của thai kỳ thì những thai

phụ này tiến triển thành TSG hoặc thai chậm phát triển trong tử cung và xảy ra trước tuần thứ 35 của thai kỳ [49]. Có khả năng là nồng độ cao của DNA phôi thai tự do lưu thông trong tuần hoàn thai phụ như một tín hiệu nguy hiểm cho người mẹ do các tế bào của thai nhi đang chết dần, dẫn đến tình trạng viêm hoặc thai nhi tử vong.



**Hình 4.1. DNA phôi thai tự do kích hoạt quá trình viêm thông qua thụ thể TLR-9 [150]**

Ngoài ra, sự gia tăng nồng độ DNA phôi thai tự do còn liên quan đến vai trò của gan và thận. Ở thai phụ TSG có những thay đổi bệnh lý liên quan đến gan và thận, nhiều khả năng các quá trình này có thể làm giảm khả năng của các cơ quan này để loại bỏ DNA khỏi lưu thông. Theo nghiên cứu của Zhong XY. và CS (2001), Swinkles và CS (2002) nồng độ DNA phôi thai tự do tăng cao gấp 3,5 - 4 lần ở thai phụ TSG có hội chứng HELLP so với thai phụ tiền sản giật không kèm hội chứng HELLP và tăng gấp 10 lần so với nhóm chứng [135],[149]. Hội chứng HELLP là một biến thể nặng của TSG bao gồm các triệu chứng tan huyết - tăng men gan - giảm tiểu cầu, có đặc điểm là tổn thương



mô lớn (hoại tử tế bào và tan máu), điều này ủng hộ giả thuyết cho rằng hoại tử tế bào có thể làm tăng nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ tiền sản giật; đồng thời DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ tăng cao có liên quan đến mức độ nặng của bệnh.

Kỹ thuật Realtime PCR cho phép định lượng một cách chính xác nồng độ của DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ, từ đó dự đoán tình trạng của thai nhi hay các biến chứng thai kỳ liên quan đến việc phát hiện sự khác biệt về nồng độ DNA phôi thai tự do của thai nhi đó so với thai bình thường. Nghiên cứu của các tác giả khác cũng đã cho thấy nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ tăng một cách có ý nghĩa trong TSG, thai lệch bội NST 21, ...

Leung và CS (2001) khi nghiên cứu 18 thai phụ có tuần thai trung bình là 17 tuần (dao động từ 11 - 22 tuần) được định lượng nồng độ DNA phôi thai trước khi có triệu chứng của TSG là 42 copy/ml (dao động 36 - 2375 copy/ml) trong khi đó ở nhóm chứng (33 thai phụ) nồng độ DNA phôi thai tương ứng là 22 copy/ml (dao động từ 4,2 - 300 copy/ml) [16], Zhong và CS (2004) định lượng được nồng độ DNA phôi thai trước khi có triệu chứng của TSG là 423 copy/ml (dao động 97 - 1642 copy/ml), nhóm chứng: 129 copy/ml (dao động từ 31 - 318 copy/ml) [38]. Levine RJ và CS (2004) chứng minh nồng độ của DNA phôi thai tự do tăng lên gấp 2-3 lần ở thai phụ TSG và tăng 3 tuần trước khi khởi phát các triệu chứng lâm sàng của TSG [7]. Papantoniou N. và CS (2013) đã chứng minh ở những thai phụ tuần thai 11 - 13 có nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương tăng cao so với thai phụ bình thường và những thai phụ này sau đó tiến triển thành TSG, chính vì vậy, định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ có giá trị dự báo sớm những thai phụ có nguy cơ tiến triển TSG [151]. Năm 2004, Bianchi và CS phát hiện thấy nồng độ DNA phôi thai tự do trong các mẫu huyết thanh tăng lên một cách có ý nghĩa lần đầu

tiên từ tuần thai thứ 17 và lần thứ hai vào thời điểm 3 tuần trước khi có triệu chứng lâm sàng của TSG. Tác giả đưa ra giả thuyết rằng: nồng độ DNA tăng lần đầu tiên là do sự hoại tử của rau thai hoặc các tế bào chết theo chương trình, còn nồng độ DNA tăng lần thứ hai là do các triệu chứng của TSG làm rối loạn các chức năng của mẹ kéo theo rối loạn sự bài tiết DNA phôi thai [19]. Theo nghiên cứu tổng quan của Martin A và CS (2014) cho thấy ở 13 nghiên cứu thì 11 nghiên cứu đã chứng minh ở những thai phụ có nồng độ DNA phôi thai tự do tăng cao, thai phụ sau đó đã phát triển TSG, ngoài ra, kết quả của bốn nghiên cứu đã chứng minh thấy nồng độ DNA phôi thai tăng cao đáng kể trước khi khởi phát TSG [6].

Trái ngược với các kết quả của nghiên cứu trên, trong năm 2007, Crowley và CS không có sự khác biệt về nồng độ của DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn giữa nhóm thai phụ bình thường và thai phụ TSG khi tiến hành định lượng DNA phôi thai tự do với cặp mồi của gen SRY ở thời điểm trước 20 tuần [152]. Kết quả này cũng tương tự như trong một số nghiên cứu khác chứng minh rằng nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ không bị thay đổi đáng kể giữa nhóm thai phụ bình thường và thai phụ TSG [153],[154].

Như vậy, có sự khác biệt về kết quả của các nghiên cứu khi định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ, điều này có thể do sự khác nhau về tình trạng tuần hoàn rau thai, tuần thai, hay sử dụng các phương pháp chiết tách và định lượng DNA khác nhau, ... Nhưng phần lớn các nghiên cứu đều chứng minh rằng nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong tuần hoàn thai phụ tăng cao trước khi có các triệu chứng lâm sàng của TSG và tăng theo tuổi thai. Nồng độ của DNA phôi thai tự do tăng cao ở thai phụ TSG có liên quan đến tổn thương rau thai và nồng độ DNA phôi thai tự do tăng cao trước khi có các triệu chứng lâm sàng của TSG điều này chỉ ra rằng ở thai phụ

TSG có tổn thương rau thai xảy ra trước khi có các triệu chứng lâm sàng của TSG, điều này ủng hộ giả thuyết về cơ chế bệnh sinh của TSG được tin rằng phát triển qua 2 giai đoạn: (1) giảm tưới máu rau thai (được coi như nguyên nhân gốc rễ), (2) dẫn tới hội chứng đa hệ thống của mẹ [67].

Về độ tin cậy của kết quả: chúng tôi sử dụng quy trình chiết tách DNA, lượng huyết tương ban đầu của thai phụ TSG dùng cho chiết tách DNA, lượng DNA phôi thai tự do sau chiết tách đã được sử dụng để khuếch đại và các quy trình khuếch đại của Realtime PCR để định lượng DNA phôi thai tự do sau chiết tách tương tự như quy trình của Lo và CS (1998) và của các tác giả trên, điều này đồng nghĩa với độ nhạy của Realtime PCR là tương đương nhau ở các nghiên cứu.

Kết quả về nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ TSG ở nghiên cứu của chúng tôi có sự khác biệt so với các nghiên cứu khác, điều này có thể giải thích như sau:

- Do sự khác nhau về đối tượng nghiên cứu: thai phụ TSG trong nghiên cứu của chúng tôi là người Việt Nam, theo kết quả nghiên cứu các tác giả khác cũng thấy rằng thai phụ ở các khu vực địa lý khác nhau, điều kiện về địa dư khác nhau, chế độ dinh dưỡng khác nhau, kích thước bánh rau khác nhau sẽ làm ảnh hưởng tới nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ.

Chính sự khác biệt này đòi hỏi cần phải xây dựng giá trị tham chiếu về DNA phôi thai tự do cho thai phụ Việt Nam bình thường qua các giai đoạn tuổi thai trong thai kỳ, sự thay đổi về nồng độ DNA phôi thai tự do ở thai phụ TSG so với thai phụ bình thường như thế nào. Điều này rất có ý nghĩa trong việc đánh giá xét nghiệm nhằm đưa ra chẩn đoán TSG chính xác.

Nghiên cứu về sự thay đổi của nồng độ DNA phôi thai tự do ở thời điểm trước và sau khi sinh, Tao H và CS (2005) định lượng nồng độ DNA phôi thai

tự do trong huyết tương của 30 thai phụ bình thường (34,3 tuần) và 30 thai phụ tiền sản giật (33,3 tuần), ở quý 3 của thai kỳ và 3 thời điểm: 1 giờ, 3 giờ và 6 giờ sau khi thai phụ sinh con. Kết quả tương ứng như sau: ở thai phụ bình thường nồng độ DNA phôi thai tự do:  $319 \pm 99$  copy/ml;  $139 \pm 45$  copy/ml;  $76 \pm 31$  copy/ml và  $44 \pm 13$  copy/ml; ở thai phụ tiền sản giật nhẹ nồng độ DNA phôi thai tự do:  $758 \pm 357$  copy/ml;  $102 \pm 42$  copy/ml;  $57 \pm 25$  copy/ml và  $36 \pm 12$  copy/ml và ở thai phụ tiền sản giật nặng nồng độ DNA phôi thai tự do:  $1285 \pm 573$  copy/ml;  $209 \pm 51$  copy/ml;  $97 \pm 40$  copy/ml và  $52 \pm 17$  copy/ml và có sự khác biệt giữa các nhóm này với  $p < 0,01$  [146]. Điều đó cho thấy nồng độ DNA phôi thai tăng cao ở các thai phụ TSG so với thai phụ bình thường, đồng thời nồng độ DNA phôi thai sẽ giảm dần sau khi sinh ở cả thai phụ bình thường và thai phụ TSG.

Nguồn gốc của DNA phôi thai tự do trong tuần hoàn mẹ là từ rau thai, một ngoại lệ là có nguồn gốc từ các tế bào thai có nhân trong tuần hoàn mẹ và có khả năng từ chính thai thông qua trao đổi trực tiếp. Tốc độ giải phóng DNA phôi thai tự do vào tuần hoàn thai phụ sau khi sinh xảy ra hai giai đoạn với cơ chế động học khác nhau: giai đoạn ban đầu nhanh với thời gian bán hủy  $t/2$  khoảng 1h, trong khi giai đoạn chậm với thời gian bán hủy  $t/2$  khoảng 13h, tuy nhiên sau sinh 1-2 ngày cũng không phát hiện được DNA phôi thai [36]. Do đó, với giả thuyết không có những thay đổi đột ngột sự thải trừ DNA phôi thai tuần hoàn do quá trình chuyển dạ và đẻ, các tác giả tính toán rằng để duy trì tình trạng ổn định, DNA phôi thai có thể được giải phóng tiếp tục vào tuần hoàn thai phụ với tốc độ trung bình 2,24– 104 bản copy/phút. Với tốc độ giải phóng và thải trừ nhanh chóng, số lượng DNA phôi thai đã cung cấp một bức tranh toàn cảnh và chi tiết theo thời gian về sự sản xuất và thải trừ DNA phôi thai, vì vậy sẽ có ích cho giám sát những trường hợp thai nghén bệnh lý. Như vậy, nồng độ DNA phôi thai tự do là một dấu ấn sinh học nhiều tiềm năng và khi có sự

tăng nồng độ có liên quan đến các giai đoạn của quá trình thai nghén và tăng cao trước khi có triệu chứng lâm sàng của TSG nên có giá trị dự đoán sớm TSG [78],[155].

Các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng: tuổi thai phụ, triệu chứng phù, protein niệu, huyết áp tâm thu, huyết áp tâm trương, số lượng tiểu cầu, acid uric và DNA phôi thai tự do đều là hậu quả của stress oxy hóa và quá trình viêm trong TSG. Kết quả bảng 3.15, bảng 3.16 và bảng 3.17 cho thấy ở thai phụ TSG: có mối liên quan tỷ lệ thuận giữa yếu tố tuổi thai, HATT, phù, protein niệu và acid uric với nồng độ DNA phôi thai tự do. Cụ thể: tuổi thai, HATT, phù, protein niệu và acid uric càng cao thì nồng độ DNA càng cao, mối liên quan có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu Finning và CS (2002) và của các tác giả khác rằng nồng độ DNA phôi thai không chỉ phụ thuộc vào tuổi mẹ mà còn tăng dần theo tuổi thai và tăng cao lúc chuyển dạ đẻ [156]. Nghiên cứu của Kim SY. và CS (2016), Kumar N. và CS (2018) đã chứng minh nồng độ DNA phôi thai tự do tăng trong huyết tương thai phụ có giá trị dự báo sớm rối loạn tăng huyết áp của thai kỳ [157],[158].

Hiện tượng tăng nồng độ DNA phôi thai tự do và các tế bào thai trong vòng tuần hoàn thai phụ ở các thai phụ TSG vẫn đang được các nhà khoa học tiếp tục nghiên cứu để ứng dụng chúng vào chẩn đoán trong tương lai gần. Tuy nhiên, phần lớn kết quả các nghiên cứu thấy rằng nồng độ DNA phôi thai tăng cao trước khi có các triệu chứng lâm sàng của TSG, vì vậy, những nghiên cứu này gợi ý khả năng ứng dụng kỹ thuật định lượng DNA phôi thai tự do để sàng lọc và phát hiện các thai phụ có nguy cơ bị TSG, ít nhất là đối với những trường hợp TSG nặng và ở giai đoạn sớm của bệnh. Các cơ chế liên quan phức tạp hơn so với các giả thuyết ban đầu về mối liên quan giữa nồng độ DNA phôi thai tự do và TSG, đây là sự kết hợp phức tạp giữa quá trình chết theo chương trình, suy giảm tưới máu nhau thai và quá trình viêm. Như vậy, định lượng được nồng

độ DNA phôi thai tự do có giá trị dự báo sớm TSG. Chúng tôi chỉ mới ghi nhận được mối liên quan giữa các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng của TSG với nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ TSG, hạn chế trong nghiên cứu này của chúng tôi là không theo dõi dọc theo từng cá nhân thai phụ về nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương qua các quý của thai kỳ và theo dõi được sự thay đổi về nồng độ của DNA phôi thai tự do trước khi có các triệu chứng của TSG ở các thai phụ tiến triển thành TSG, theo Chan và CS (2003) nồng độ DNA phôi thai tự do thay đổi phải so sánh với giá trị của mỗi cá nhân ở mỗi lần định lượng [23].

Với sự hiểu biết hiện tại về cơ chế bệnh sinh của TSG cho thấy TSG có thể là một tập hợp của các hội chứng với sự kết hợp của nhiều yếu tố tham gia và dẫn tới nhiều hậu quả [159]. Tiền sản giật với các hội chứng không đồng nhất cùng với cơ chế bệnh sinh phức tạp của nó [160], là hạn chế cho việc sử dụng một yếu tố nguy cơ trên lâm sàng hoặc một dấu ấn sinh học trong thai kỳ để dự báo sớm, để phân biệt thai phụ bình thường và thai phụ tiến triển TSG. Giá trị dự báo sớm TSG được chấp nhận rộng rãi dựa trên cách tiếp cận đa tham số vì không có xét nghiệm sàng lọc duy nhất cung cấp một đánh giá rủi ro hợp lý [161]. Có một số dấu ấn có giá trị cho TSG và có độ tin cậy cao giúp các bác sĩ lâm sàng trong việc dự đoán TSG ở những tháng đầu. Việc phát hiện ra thử nghiệm DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương của thai phụ sẽ cách mạng hóa cách tiếp cận hiện tại để sàng lọc dị bội [162]. Nồng độ DNA phôi thai tự do được tăng lên rõ ràng trước khi khởi phát triệu chứng lâm sàng của các biến chứng liên quan đến thai như TSG, IUGR, đẻ non, tiền đạo của rau thai và chứng nôn nghén [163]. Do đó, cần có các nghiên cứu các dấu ấn sinh học chuyên sâu hơn, quy mô lớn, nghiên cứu ở nhiều trung tâm, nghiên cứu trên các đối tượng thai phụ có nguy cơ ở các quốc gia, lãnh thổ khác nhau để

dự báo sớm tiền sản giật với mục tiêu đề đề xuất sự kết hợp của các dấu ấn sinh học này thành các xét nghiệm thường quy.

## KẾT LUẬN

### **1. Hoàn chỉnh và xây dựng được đường chuẩn của kỹ thuật Realtime PCR để định lượng DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ.**

- Chọn đoạn trình tự cần quan tâm của gen SRY
- Nhân bản plasmid và kiểm tra trình tự gen đích.
- Thực hiện PCR lồng với cặp mồi đặc hiệu để kiểm tra phát hiện DNA phôi thai tự do đặc hiệu.
- Kiểm tra trình tự mồi và probe được thiết kế cho Realtime PCR; tối ưu hóa phản ứng PCR với cặp mồi của Realtime PCR trên mẫu chuẩn.
- Tối ưu hóa phản ứng Realtime PCR trên mẫu chuẩn.
- Xây dựng đường chuẩn trong phản ứng Realtime PCR

### **2. Định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ.**

*Nồng độ DNA trung bình ở nhóm thai phụ bình thường.*

Quý 1: 574,79 copy/ml (dao động 60,55 - 1698,52 copy/ml).

Quý 2: 1587,11 copy/ml (dao động 248,31 - 4838,92 copy/ml).

Quý 3: 2196,62 copy/ml (dao động 742,98 - 6397,98 copy/ml).

Nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ có xu hướng tăng dần theo tuổi thai tương ứng.

*Nồng độ DNA trung bình ở nhóm thai phụ tiền sản giật.*

Quý 2: 4882,79 copy/ml (dao động 1591,45 - 7677,00 copy/ml).

Quý 3: 28701,26 copy/ml (dao động 5678,57 - 61666,14 copy/ml).

Nồng độ DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ có xu hướng tăng dần theo tuổi thai và tăng cao gấp 14 lần so với nhóm thai phụ bình thường có cùng tuổi thai tương ứng với  $p < 0,01$ .



## **KIẾN NGHỊ**

Qua nghiên cứu đề tài, chúng tôi có kiến nghị sau:

DNA phôi thai tự do là dấu ấn sinh học, định lượng được DNA phôi thai có giá trị dự báo sớm, chẩn đoán và theo dõi tiền sản giật bằng kỹ thuật không xâm lấn. Tuy nhiên, nghiên cứu với số mẫu còn ít cần những nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn và theo dõi dọc theo từng bệnh nhân để có thể xác định được giá trị tham chiếu cho thai phụ Việt Nam và ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh không xâm lấn giúp dự báo sớm tiền sản giật. Góp phần nâng cao chăm sóc sức khỏe bà mẹ và trẻ sơ sinh, nâng cao chất lượng cuộc sống và giảm thiểu chi phí bệnh tật cho xã hội.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO (2003). Global burden of hypertensive disorder of pregnancy in the year of 2000. *Geneva*,
2. Duley L. (2011). Pre-eclampsia, eclampsia and hypertension. *BMJ Clinical Evidence*, 1402.
3. Bộ Y Tế (2009). *Hướng dẫn Quốc gia về các dịch vụ chăm sóc sức khỏe sinh sản*,
4. Lo Y.M., Corbetta N., Chamberlain P.F., et al (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350 (9076), 485-487.
5. Cuckle H. (2014). Prenatal Screening Using Maternal Markers. *J. Clin. Med.*, 3(2), 504-520.
6. Martin A., Krishna I., Badell M., et al (2014). Can the quantity of cell-free fetal DNA predict preeclampsia: a systematic review. *Prenat. Diagn.*, 34 (7), 685-691.
7. Levine R.J., Qian C., Leshane E.S., et al (2004). Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 190 (3), 707-713.
8. Alberry M., Maddocks D., Jones M., et al (2007). Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn*, 27 (5), 415-418.
9. Sifakis S., Zaravinos A., Maiz N., et al (2009). First-trimester maternal plasma cell-free fetal DNA and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 201 (5), 472.e471-477.
10. Jorgez C.J., Dang D.D., Wapner R., et al (2007). Elevated levels of total (maternal and fetal) beta-globin DNA in maternal blood from first trimester pregnancies with trisomy 21. *Hum Reprod*, 22 (8), 2267-2272.

11. Trần Thị Thanh Hương (2006). Định lượng AFP, hCG, uE3 trong huyết thanh mẹ để sàng lọc trước sinh. *Nghiên cứu Y học*, 40 (1), 31 -35.
12. Bianchi D.W., Williams J.M., Sullivan L.M., et al (1997). PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet*, 61 (4), 822-829.
13. Sekizawa A., Samura O., Zhen D.K., et al (2000). Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat Diagn*, 20 (11), 886-889.
14. Lo Y.M., Zhang J., Leung T.N., et al (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *American Journal of Human Genetics*, 64 (1), 218-224.
15. Hahn S. và Holzgreve W. (2002). Fetal cells and cell free fetal DNA in maternal blood new insights into preeclampsia. *Human Reproduction Update*, 8 (6), 501-508.
16. Leung T.N., Zhang J., Lau T.K., et al (2001). Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem*, 47 (1), 137-139.
17. Rudin C.M. và Thompson C.B. (1997). Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med*, 48, 267-281.
18. Fournie G.J., Martres F., Pourrat J.P., et al (1993). Plasma DNA as cell death marker in elderly patients. *Gerontology*, 39 (4), 215-221.
19. Bianchi D.W. (2004). Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta*, 25 Suppl A, S93-s101.
20. Zhong X.Y., Holzgreve W. và Hahn S. (2002). The levels of circulatory cell free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 21 (1), 77-83.

21. Angert R.M., LeShane E.S., Lo Y.M., et al (2003). Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples. *Clin Chem*, 49 (1), 195-198.
22. Honda H., Miharu N., Ohashi Y., et al (2002). Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet*, 110 (1), 75-79.
23. Chan L.Y., Leung T.N., Chan K.C., et al (2003). Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy. *Clin Chem*, 49 (4), 678-680.
24. Sekizawa A., Yokokawa K., Sugito Y., et al (2003). Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta. *Hum Genet*, 113 (4), 307-310.
25. Angert R.M., Leshane E.S., Yarnell R.W., et al (2004). Cell-free fetal DNA in the cerebrospinal fluid of women during the peripartum period. *Am J Obstet Gynecol*, 190 (4), 1087-1090.
26. Koide K., Sekizawa A., Iwasaki M., et al (2005). Fragmentation of cell-free fetal DNA in plasma and urine of pregnant women. *Prenat Diagn*, 25 (7), 604-607.
27. Zhong X.Y., Holzgreve W., Tercanli S., et al (2006). Cell-free foetal DNA in maternal plasma does not appear to be derived from the rich pool of cell-free foetal DNA in amniotic fluid. *Arch Gynecol Obstet*, 273 (4), 221-226.
28. Bianchi D.W., LeShane E.S. và Cowan J.M. (2001). Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid. *Clin Chem*, 47 (10), 1867-1869.
29. Makrydimas G., Gerovassili A., Sotiriadis A., et al (2008). Cell-free fetal DNA in celomic fluid. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 32 (4), 594-595.
30. Chan KC., Zhang J., Hui AB., et al (2004). Size Distributions of Maternal and Fetal DNA in Maternal Plasma. *Clinical Chemistry*, 50, 88-92.

31. Li Y., Zimmermann B., Rusterholz C., et al (2004). Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem*, 50 (6), 1002-1011.
32. Fan HC., Blumenfeld YJ., Chitkara U., et al (2010). Analysis of the Size Distributions of Fetal and Maternal Cell-Free DNA by Paired-End Sequencing. *Clinical Chemistry*, 56 (8), 1279-1286.
33. Lo Y.M., Tein M.S., Lau T.K., et al (1998). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*, 62 (4), 768-775.
34. Smid M., Galbiati S., Vassallo A., et al (2003). No evidence of fetal DNA persistence in maternal plasma after pregnancy. *Hum Genet*, 112 (5-6), 617-618.
35. Tsui N.B., Jiang P., Chow K.C., et al (2012). High resolution size analysis of fetal DNA in the urine of pregnant women by paired-end massively parallel sequencing. *PLoS One*, 7 (10), e48319.
36. Stephanie C.Y. Yu, Shara W.Y. Lee, Peiyong Jiang, et al (2013). High Resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clinical Chemistry*, 59 (8), 1228 - 1237.
37. Levine R.J., Maynard S.E., Qian C., et al (2004). Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *New England journal of medicine*, 350 (7), 672-683.
38. Zhong X.Y., Wang Y., Chen S., et al (2004). Circulating fetal DNA in maternal plasma is increased in pregnancies at high altitude and is further enhanced by preeclampsia. *Clin Chem*, 50 (12), 2403-2405.
39. Zimmermann B., El-Sheikhah A., Nicolaidis K., et al (2005). Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*, 51 (9), 1598-1604.

40. Wataganara T. và Bianchi D.W. (2004). Fetal cell-free nucleic acids in the maternal circulation: new clinical applications. *Ann N Y Acad Sci*, 1022, 90-99.
41. Seval M.M., Karabulut H.G., Tukun A., et al (2015). Cell free fetal DNA in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 42 (6), 787-791.
42. Wataganara T., LeShane E.S., Farina A., et al (2003). Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Hum Genet*, 112 (2), 204-208.
43. Sekizawa A., Jimbo M., Saito H., et al (2003). Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*, 188 (2), 480-484.
44. Smid M., Galbiati S., Lojacono A., et al (2006). Correlation of fetal DNA levels in maternal plasma with Doppler status in pathological pregnancies. *Prenat Diagn*, 26 (9), 785-790.
45. Alberry M.S., Maddocks D.G., Hadi M.A., et al (2009). Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction. *Am J Obstet Gynecol*, 200 (1), 98.e91-96.
46. Al Nakib M., Desbriere R., Bonello N., et al (2009). Total and fetal cell-free DNA analysis in maternal blood as markers of placental insufficiency in intrauterine growth restriction. *Fetal Diagn Ther*, 26 (1), 24-28.
47. El-Garf W., Sheba M., Salama S., et al (2013). Assessment of plasma cell-free fetal DNA using hypermethylated RASSF1A in maternal plasma in cases of spontaneous preterm labor. *Medical Research Journal*, 12 (2), 49-52.
48. Quezada M.S., Francisco C., Dumitrascu-Biris D., et al (2015). Fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma in the prediction of spontaneous preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45 (1), 101-105.

49. Scharfe-Nugent A., Corr S.C., Carpenter S.B., et al (2012). TLR9 provokes inflammation in response to fetal DNA: mechanism for fetal loss in preterm birth and preeclampsia. *J Immunol*, 188 (11), 5706-5712.
50. Tardy-Guidollet V., Menassa R., Costa J.M., et al (2014). New management strategy of pregnancies at risk of congenital adrenal hyperplasia using fetal sex determination in maternal serum: French cohort of 258 cases (2002-2011). *J Clin Endocrinol Metab*, 99 (4), 1180-1188.
51. Sirichotiyakul S., Charoenkwan P. và Sanguansermsri T. (2012). Prenatal diagnosis of homozygous alpha-thalassemia-1 by cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn*, 32 (1), 45-49.
52. Nguyễn Thanh Thúy, Vũ Triệu An và Nguyễn Duy Ánh (2007). Kết quả bước đầu xác định DNA phôi thai trong máu mẹ bằng kỹ thuật PCR lồng. *Nghiên cứu Y học*, 47 (2), 6-9.
53. Nguyễn Thanh Thúy và Nguyễn Duy Ánh (2008). Phát hiện DNA thai từ huyết thanh mẹ bằng kỹ thuật PCR lồng - hướng tới một marker mới cho sàng lọc gen. *Y học Việt Nam*, 346 (2), 23-27.
54. Nguyễn Thanh Thúy, Ngô Thị Thúy, Vũ Triệu An, và cộng sự (2010). Sử dụng kỹ thuật PCR lồng phát hiện DNA phôi thai từ huyết thanh mẹ và ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh. *Tạp chí Thông tin Y Dược*, 3891, 41-45.
55. Triệu Tiến Sang (2014). *Nghiên cứu quy trình tách chiết, phân tích ADN và tế bào phôi thai tự do trong máu ngoại vi của mẹ để chẩn đoán trước sinh*, Luận án Tiến sĩ, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.
56. Ngô Văn Tài (2007). *Tiền sản giật và tai biến*, Nhà xuất bản Y học,
57. Duley L. (2009). The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*, 33 (3), 130-137.
58. Tuffnell D.J., Jankowicz D., Lindow S.W., et al (2005). Outcomes of severe pre-eclampsia/eclampsia in Yorkshire 1999/2003. *BJOG*, 112 (7), 875-880.



59. Duckitt Kirsten và Harrington Deborah (2005). Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ : British Medical Journal*, 330 (7491), 565-565.
60. Badria L.F., Abu-Heija A., Zayed F., et al (2001). Has consanguinity any impact on occurrence of pre-eclampsia and eclampsia? *J Obstet Gynaecol*, 21 (4), 358-360.
61. Esplin M.S., Fausett M.B., Fraser A., et al (2001). Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N Engl J Med*, 344 (12), 867-872.
62. Berends A.L., de Groot C. J., Sijbrands E. J., et al (2008). Shared constitutional risks for maternal vascular-related pregnancy complications and future cardiovascular disease. *Hypertension*, 51 (4), 1034-1041.
63. Uzan J., Carbonnel M., Piconne O., et al (2011). Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag*, 7, 467-474.
64. Matsuo K., Kooshesh S., Dinc M., et al (2007). Late postpartum eclampsia: report of two cases managed by uterine curettage and review of the literature. *Am J Perinatol*, 24 (4), 257-266.
65. Gammill H.S. và Roberts J.M. (2007). Emerging concepts in preeclampsia investigation. *Front Biosci*, 12, 2403-2411.
66. Sargent I.L., Borzychowski A.M. và Redman C.W. (2006). Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online*, 13 (5), 680-686.
67. Roberts J.M. và Gammill H.S. (2005). Preeclampsia: recent insights. *Hypertension*, 46 (6), 1243-1249.
68. McCarthy F.P., Kingdom J.C., Kenny L.C., et al (2011). Animal models of preeclampsia; uses and limitations. *Placenta*, 32 (6), 413-419.

69. Lam C., Lim K.H. và Karumanchi S.A. (2005). Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*, 46 (5), 1077-1085.
70. Gant N.F., Daley G.L., Chand S., et al (1973). A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest*, 52 (11), 2682-2689.
71. Kobayashi T., Tokunaga N., Sugimura M., et al (1999). Coagulation/fibrinolysis disorder in patients with severe preeclampsia. *Semin Thromb Hemost*, 25 (5), 451-454.
72. Campbell D.M. và Campbell A.J. (1983). Evans Blue disappearance rate in normal and pre-eclamptic pregnancy. *Clin Exp Hypertens B*, 2 (1), 163-169.
73. Roberts J.M. và Redman C.W. (1993). Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet*, 341 (8858), 1447-1451.
74. Roberts J. (2009). *Pregnancy related hypertension*, CREASY R.; RESNIK R.; IAMS J.D., editors. *Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice*. 6th edition. Saunders Elsevier, Philadelphia,
75. Roberts J.M., Taylor R.N., Musci T.J., et al (1989). Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol*, 161 (5), 1200-1204.
76. Roberts J.M. và Lain K.Y. (2002). Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta*, 23 (5), 359-372.
77. Bộ môn Sản (2002). *Bài giảng Sản Phụ khoa*, Nhà xuất bản Y học,
78. Yu H., Shen Y., Ge Q., et al (2013). Quantification of maternal serum cell-free fetal DNA in early-onset preeclampsia. *Int J Mol Sci.*, 14 (4), 7571-7582.
79. Nguyễn Chính Nghĩa (2014). *Nghiên cứu yếu tố phát triển rau thai (PLGF) và thụ thể yếu tố phát triển tế bào nội mạc hòa tan (sFlt-1) trong huyết thanh ở thai phụ bình thường và thai phụ có nguy cơ tiền sản giật*, Luận án tiến sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.

80. Bộ Y Tế (2015). *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị các bệnh sản phụ khoa*,
81. Barton J.R. và Sibai B.M. (2009). Gastrointestinal complications of pre-eclampsia. *Semin Perinatol*, 33 (3), 179-188.
82. Bauer S.T. và Cleary K.L. (2009). Cardiopulmonary complications of pre-eclampsia. *Semin Perinatol*, 33 (3), 158-165.
83. Benagiano G., Brosens I. và Carrara S. (2009). Adenomyosis: new knowledge is generating new treatment strategies. *Womens Health (Lond)*, 5 (3), 297-311.
84. Samra K.A. (2013). The eye and visual system in pregnancy, what to expect? An in-depth review. *Oman Journal of Ophthalmology*, 6 (2), 87-91.
85. Sibai B.M. (2004). Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol*, 103 (5 Pt 1), 981-991.
86. Lê Thiện Thái. (1999). Nhận xét qua 83 bệnh án sản giật tại Viện BVBM TSS năm 1991 - 1995. *Tạp chí Thông tin Y Dược*, 12, 149-153.
87. Lê Thị Mai (2004). *Nghiên cứu tình hình sản phụ bị nhiễm độc thai nghén để tại Bệnh viện Phụ Sản Trung ương trong năm 2003*, Luận văn tốt nghiệp Bác sỹ chuyên khoa cấp II. Chuyên ngành Phụ Sản,
88. Phan Trường Duyệt và Ngô Văn Tài (2000). Một số thay đổi sinh hóa trong nhiễm độc thai nghén. *Tạp chí Thông tin Y Dược*, 5, 36-40.
89. Lê Thiện Thái (2010). *Nghiên cứu ảnh hưởng của bệnh lý tiền sản giật lên thai phụ và thai nhi và đánh giá hiệu quả của phác đồ điều trị*, Luận án Tiến sỹ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
90. Ngô Văn Tài (2001). *Nghiên cứu một số yếu tố tiên lượng trong nhiễm độc thai nghén*, Luận án Tiến sỹ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
91. Sibai B.M. và Mohamed K.R. (1995). Pre-eclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol*, 3, 1-15.

92. Romero R, Nien J. K, Espinoza J, et al (2008). A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 21 (1), 9-23.
93. Grill S., Rusterholz C., Zanetti-Dallenbach R., et al (2009). Potential markers of preeclampsia-a review. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 70.
94. Burke S.D., Zsengeller Z.K., Khankin E.V., et al (2016). Soluble fms-like tyrosine kinase 1 promotes angiotensin II sensitivity in preeclampsia. *J Clin Invest*, 126 (7), 2561-2574.
95. Polliotti B.M., Fry A.G., Saller D.N., et al (2003). Second-trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, early-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 101 (6), 1266-1274.
96. Levine R.J., Lam C., Qian C., et al (2006). Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *The New England journal of medicine*, 355 (10), 992-1005.
97. Bersinger N.A., Smarason A.K., Muttukrishna S., et al (2003). Women with preeclampsia have increased serum levels of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A), inhibin A, activin A and soluble E-selectin. *Hypertens Pregnancy*, 22 (1), 45-55.
98. Deveci K., Sogut E., Evliyaoglu O., et al (2009). Pregnancy-associated plasma protein-A and C-reactive protein levels in pre-eclamptic and normotensive pregnant women at third trimester. *J Obstet Gynaecol Res*, 35 (1), 94-98.
99. Smith G.C., Stenhouse E.J., Crossley J.A., et al (2002). Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine

growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. *J Clin Endocrinol Metab*, 87 (4), 1762-1767.

100. Chen Y. (2009). Novel angiogenic factors for predicting preeclampsia: sFlt-1, PlGF, and soluble endoglin. *Clin Chem J*, 2, 1-6.

101. Sunderji S., Gaziano E., Wothe D., et al (2010). Automated assays for sVEGF R1 and PlGF as an aid in the diagnosis of preterm preeclampsia: a prospective clinical study. *Am J Obstet Gynecol*, 202 (1), 40.e41-47.

102. Mutter W.P. và Karumanchi S.A (2008). Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res*, 75 (1), 1-8.

103. Jeyabalan A., McGonigal S., Gilmour C., et al (2008). Circulating and placental endoglin concentrations in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and preeclampsia. *Placenta*, 29 (6), 555-563.

104. Than N.G., Romero R., Goodman M., et al (2009). A primate subfamily of galectins expressed at the maternal-fetal interface that promote immune cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (24), 9731-9736.

105. Than N.G., Romero R., Kim C.J., et al (2012). Galectins: guardians of eutherian pregnancy at the maternal-fetal interface. *Trends Endocrinol Metab*, 23 (1), 23-31.

106. Burger O., Pick E., Zwickel J., et al (2004). Placental protein 13 (PP-13): effects on cultured trophoblasts, and its detection in human body fluids in normal and pathological pregnancies. *Placenta*, 25 (7), 608-622.

107. Huppertz B. (2008). Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*, 51 (4), 970-975.

108. Cowans N.J., Stamatopoulou A., Khalil A., et al (2011). PP13 as a marker of pre-eclampsia: A two platform comparison study. *Placenta*, 32 Suppl, S37-41.

109. De Muro P., Capobianco G., Lapedda A.J., et al (2016). Plasma PP13 and urinary GAGs/PGs as early markers of pre-eclampsia. *Arch Gynecol Obstet*,
110. Chafetz I., Kuhnreich I., Sammar M., et al (2007). First-trimester placental protein 13 screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*, 197 (1), 35.e31-37.
111. Zhong Y., Tuuli M. và Odibo A.O. (2010). First-trimester assessment of placenta function and the prediction of pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Prenat. Diagn*, 30, 293-308.
112. Scazzocchio E. và Figueras F. (2011). Contemporary prediction of pre-eclampsia. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 23, 65-71.
113. Phạm Hùng Vân (2009). *PCR và real time PCR, Các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp*, Nhà xuất bản Y học.
114. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., et al (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10 (4), 413-417.
115. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., et al (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11 (9), 1026-1030.
116. Bio-Rad (2006). *Real-Time PCR Applications Guide*, Bio - Rad Laboratories, Inc.,
117. Biassoni R. và Raso A. (2014). *Quantitative Real-Time PCR Methods and Protocols*, Springer protocol, Humana Press,
118. M. Tefvik Dorak (2006). *Real-time PCR* Taylor & Francis Group,,
119. Kubista M. (2008). Emerging real-time PCR application. *Drug Dis*,
120. Randen I., Hauge R., Kjeldsen-Kragh J., et al (2003). Prenatal genotyping of RHD and SRY using maternal blood. *Vox Sang*, 85 (4), 300-306.

121. Farina A., Caramelli E., Concu M., et al (2002). Testing normality of fetal DNA concentration in maternal plasma at 10-12 completed weeks' gestation: a preliminary approach to a new marker for genetic screening. *Prenat Diagn*, 22 (2), 148-152.
122. Costa J.M., Benachi A., Gautier E., et al (2001). First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Prenat Diagn*, 21 (12), 1070-1074.
123. Benachi A., Yamgnane A., Olivi M., et al (2005). Impact of formaldehyde on the in vitro proportion of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Clin Chem*, 51 (1), 242-244.
124. Tungwiwat W., Fucharoen G., Ratanasiri T., et al (2003). Non-invasive fetal sex determination using a conventional nested PCR analysis of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chim Acta*, 334 ((1-2)), 173-177.
125. Zargari M., Sadeghi M.R., Shahhosseiny M.H., et al (2011). Fetal Sex Determination using Non-Invasive Method of Cell-free Fetal DNA in Maternal Plasma of Pregnant Women During 6(th)– 10(th) Weeks of Gestation. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 3 (4), 201-206.
126. Hwa H.L., Ko T.M., Yen M.L., et al (2004). Fetal gender determination using real-time quantitative polymerase chain reaction analysis of maternal plasma. *Formosan Medical Association - Taiwan Yi Zhi*, 103 (5), 364 - 368.
127. Davaliev K., Dimcev P., Efremov G.D., et al (2006). Non-invasive fetal sex determination using real-time PCR. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 19 (6), 337 -342.
128. Rijnders R.J., van der Schoot C.E., Bossers B., et al (2001). Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol*, 98 (3), 374 - 378.

129. Picchiassi E., Coata G., Fanetti A., et al (2008). The best approach for early prediction of fetal gender by using free fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn*, 28 (6), 525 - 530.
130. KHR Khorram, Zargari M., Sadeghi MR., et al (2013). Early fetal gender determination using real-time PCR analysis of cell-free fetal DNA during 6th-10th weeks of gestation. *Acta Medica Iranica*, 6.
131. Bischoff F.Z., Lewis D.E. và Simpson J.L. (2005). Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update*, 11 (1), 59-67.
132. Chen X.Q., Stroun M., Magnenat J.L., et al (1996). Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med*, 2 (9), 1033-1035.
133. Invernizzi P., Biondi M.L., Battezzati P.M., et al (2002). Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Hum Genet*, 110 (6), 587-591.
134. Smid M., Vassallo A., Lagona F., et al (2001). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma in pathological conditions associated with placental abnormalities. *Ann N Y Acad Sci*, 945, 132-137.
135. Swinkels D.W., de Kok J.B., Hendriks J.C., et al (2002). Hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP) syndrome as a complication of preeclampsia in pregnant women increases the amount of cell-free fetal and maternal DNA in maternal plasma and serum. *Clin Chem*, 48 (4), 650-653.
136. Lau T.W., Leung T.N., Chan L.Y., et al (2002). Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia. *Clin. Chem.*, 48, 2141-2146.



137. Zhong X.Y., Gebhardt S., Hillermann R., et al (2005). Parallel assessment of circulatory fetal DNA and corticotropin-releasing hormone mRNA in early- and late-onset preeclampsia. *Clin Chem*, 51 (9), 1730-1733.
138. D'Souza Edna, Nair Sona, Nadkarni Anita, et al (2012). SRY sequence in maternal plasma: Implications for non-invasive prenatal diagnosis: First report from India. *Indian Journal of Human Genetics*, 18 (1), 87-90.
139. Tjoa M.L., Cindrova-Davies T., Spasic-Boskovic O., et al (2006). Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA. *Am. J. Pathol.*, 169, 400-404.
140. Gauthier V.J., Tyler L.N. và Mannik M. (1996). Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice. *J Immunol*, 156 (3), 1151-1156.
141. Zeerleder S. (2006). The struggle to detect circulating DNA. *Crit Care*, 10 (3), 142.
142. Julian C.G. (2011). High altitude during pregnancy. *Clin Chest Med*, 32,21-31.
143. Eric Wang, Annette Batey, Craig Struble, et al (2013). Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn*, 33, 662-666.
144. Wataganara T., Peter I., Messerlian GM., et al (2004). Inverse correlation between maternal weight and second trimester circulating cell-free fetal DNA levels. . *Obstet Gynecol*, 104, 545-550.
145. Taglauer ES., Wilkins-Haug L. và Bianchi DW. (2014). Review: Cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta*, 35 (Suppl), S64-68.
146. Tao H., Wang X.M. và Ji X.H. (2005). [Study on the relation between concentration of circulating non-host fetal DNA in pregnant women and pre-eclampsia]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 40 (12), 808-811.

147. Hahn S., Rusterholz C., Hosli I., et al (2011). Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta*, 32 Suppl, S17-20.
148. Palmer S.K., Moore L.G., Young D., et al (1999). Altered blood pressure course during normal pregnancy and increased preeclampsia at high altitude (3100 meters) in Colorado. *Am J Obstet Gynecol*, 180 (5), 1161-1168.
149. Zhong X.Y., Laivuori H., Y. O. Livingston J.C., et al (2001). Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 184 (3), 414-419.
150. Enninga E.A L., Nevala W.K., Holtan S.G., et al (2015). Immune Reactivation by Cell-Free Fetal DNA in Healthy Pregnancies Re-Purposed to Target Tumors: Novel Checkpoint Inhibition in Cancer Therapeutics. *Frontiers in Immunology*, 6 (424).
151. Papantoniou N., Bagiokos V., Agiannitopoulos K., et al (2013). RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of preeclampsia. *Prenat Diagn*, 33 (7), 682-687.
152. Crowley A., Martin C., Fitzpatrick P., et al (2007). Free fetal DNA is not increased before 20 weeks in intrauterine growth restriction or pre-eclampsia. *Prenat Diagn*, 27 (2), 174-179.
153. Poon L.C., Musci T., Song K., et al (2013). Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes. *Fetal Diagn Ther*, 33 (4), 215-223.
154. Stein W., Muller S., Gutensohn K., et al (2013). Cell-free fetal DNA and adverse outcome in low risk pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 166 (1), 10-13.

155. Contro E., Bernabini D. và Farina A. (2017). Cell-Free Fetal DNA for the Prediction of Pre-Eclampsia at the First and Second Trimesters: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mol Diagn Ther*, 21 (2), 125-135.
156. Finning K.M., Martin P.G., Soothill P.W., et al (2002). Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion*, 42 (8), 1079-1085.
157. Kim S.Y., Kim H.J., Park S.Y., et al (2016). Early Prediction of Hypertensive Disorders of Pregnancy Using Cell-Free Fetal DNA, Cell-Free Total DNA, and Biochemical Markers. *Fetal Diagn Ther*, 40 (4), 255-262.
158. Kumar N. và Singh A.K. (2018). Cell-Free Fetal DNA: A Novel Biomarker for Early Prediction of Pre-eclampsia and Other Obstetric Complications. *Curr Hypertens Rev*,
159. Roberts J.M. và Bell M.J. (2013). If we know so much about pre-eclampsia, why haven't we cured the disease? . *J. Reprod. Immunol*, 99, 1-9.
160. Steegers E.A., Von Dadelszen P., Duvekot J.J., et al (2010). Pre-eclampsia. *Lancet* 376, 631-644.
161. Conde-Agudelo A., Villar J. và Lindheimer M. (2004). World Health Organization systematic review of screening tests for pre-eclampsia. . *Obstet. Gynecol.*, 104 (1367-1391),
162. Hui L. (2013). Non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidy: Charting the course from clinical validity to clinical utility. *Ultrasound Obstet. Gynecol*, 41, 2-6.
163. Sifakis S., Koukou Z. và Spandidos D.A. (2015). Cell-free fetal DNA and pregnancy-related complications (review). *Mol. Med. Rep.*, 11 (4), 2367-2372.

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**



**NGUYỄN THỊ PHƯƠNG LAN**

**NGHIÊN CỨU DNA PHÔI THAI TỰ DO  
TRONG HUYẾT TƯƠNG THAI PHỤ  
BẰNG KỸ THUẬT REALTIME PCR  
NHẪM DỰ BÁO SỚM TIỀN SẢN GIẬT**

Chuyên ngành: Dị ứng và miễn dịch

Mã số : 62720109

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS Nguyễn Thanh Thúy
2. PGS.TS Nguyễn Đức Hình

**HÀ NỘI – 2018**

## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án nghiên cứu sinh của mình, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới:

- **PGS.TS Nguyễn Thanh Thúy** - Phó trưởng Bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn dịch Trường Đại học Y Hà Nội

- **PSG.TS Nguyễn Đức Hình** - Hiệu trưởng, Phó trưởng Bộ môn Phụ Sản - Trường Đại học Y Hà Nội

Hai người Thầy đã trực tiếp hướng dẫn, dìu dắt, động viên, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu để hoàn thành Luận án này.

- PGS.TS Nguyễn Duy Ánh - Giám đốc Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội, Phó trưởng Bộ môn Phụ Sản, chủ nhiệm đề tài "Nghiên cứu kết hợp siêu âm và định lượng DNA phôi thai ứng dụng trong dự báo sớm tiền sản giật" đã có nhiều ý kiến quý báu và tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi có thể hoàn thành Luận án.

- Thầy, Cô Chủ tịch Hội đồng, các Thầy, Cô trong Hội đồng chấm luận án đã có nhiều ý kiến quý báu giúp tôi hoàn thiện Luận án.

Trong quá trình học tập và nghiên cứu để hoàn thành luận án, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, đóng góp ý kiến quý báu của Nhà Trường, Đơn vị công tác, các Thầy, Cô, bạn bè, đồng nghiệp và gia đình. Tôi xin trân trọng cảm ơn:

- Ban giám hiệu Trường Đại học Dược Hà Nội, Ban Giám hiệu Trường Đại học Y Hà Nội đã tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành Luận án này.

- PGS.TS Phạm Đăng Khoa, nguyên Trưởng bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn dịch Trường Đại học Y Hà Nội, người Thầy đã ủng hộ, dành cho tôi nhiều thuận lợi trong quá trình học tập tại Bộ môn.

- ThS. Hồ Quang Huy, giáo vụ Sau đại học Bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn dịch Trường Đại học Y Hà Nội đã hết sức nhiệt tình, có trách nhiệm và tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành Luận án.

- TS. Nguyễn Thị Thường - Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và TS. Lê Ngọc Anh - Trường Đại học Y Hà Nội đã giúp đỡ và có nhiều ý kiến quý báu giúp tôi hoàn thiện Luận án.

- ThS. Nguyễn Thị Hiền - Trưởng Bộ môn Y học cơ sở Trường Đại học Dược Hà Nội đã giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và công tác.

- Ban chủ nhiệm, các Thầy, Cô và anh chị trong Bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn dịch Trường Đại học Y Hà Nội, Phòng Đào tạo Sau đại học Trường Đại học Y Hà Nội, Bộ môn Y học cơ sở Trường Đại học Dược Hà Nội, Trung tâm chẩn đoán trước sinh Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội, Khoa khám bệnh và Khoa Sản bệnh Bệnh viện Phụ sản Trung ương, Phòng khám Vạn Phúc đã động viên và tạo mọi điều kiện cho tôi hoàn thành Luận án.

CN. Nguyễn Minh Huyền, KTV. Đỗ Thị Hương Bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn dịch Trường Đại học Y Hà Nội đã tham gia thực hiện kỹ thuật và giúp đỡ tôi trong thời gian thực hiện đề tài nghiên cứu tại Bộ môn.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn tới các thai phụ đã đồng ý tham gia nghiên cứu để tôi có số liệu trong luận án này.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp đã ủng hộ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Sau cùng, tôi xin cảm ơn bố mẹ, chồng, các con và những người thân trong gia đình đã hết lòng ủng hộ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và là nguồn động lực giúp tôi vượt qua những khó khăn để hoàn thành Luận án.

Hà Nội, tháng 5 năm 2018

**Nguyễn Thị Phương Lan**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Thị Phương Lan, nghiên cứu sinh khóa 29 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Dịch tễ - Miễn dịch, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Nguyễn Thanh Thúy - Bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn dịch và PGS.TS Nguyễn Đức Hình - Bộ môn Phụ Sản Trường Đại học Y Hà Nội.

2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu. Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội, ngày 30 tháng 5 năm 2018*

Người viết cam đoan

Nguyễn Thị Phương Lan

# MỤC LỤC

<b>Mục lục</b>	
<b>Đặt vấn đề</b>	<b>1</b>
<b>Chương 1. Tổng quan</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Tổng quan về DNA phôi thai tự do lưu hành trong huyết tương thai phụ</b>	<b>3</b>
1.1.1. Nguồn gốc của DNA phôi thai tự do	3
1.1.2. Kích thước của DNA phôi thai tự do	7
1.1.3. Thời gian bán hủy $t/2$ của DNA phôi thai tự do	8
1.1.4. Tình hình nghiên cứu DNA phôi thai tự do ở nước ngoài và ở Việt Nam	9
<b>1.2. Tổng quan về tiền sản giật</b>	<b>14</b>
1.2.1. Khái niệm tiền sản giật	14
1.2.2. Yếu tố nguy cơ và cơ chế bệnh sinh của tiền sản giật	15
1.2.3. Một số triệu chứng điển hình của tiền sản giật	19
1.2.4. Phân loại và chẩn đoán tiền sản giật	20
1.2.5. Tiên lượng	21
1.2.6. Các biến chứng của tiền sản giật	21
1.2.7. Một số dấu ấn sinh học được sử dụng trong chẩn đoán, theo dõi tiền sản giật	24
<b>1.3. Kỹ thuật Realtime PCR định lượng DNA</b>	<b>26</b>
1.3.1. Kỹ thuật PCR	26
1.3.2. Kỹ thuật Realtime PCR	28
<b>Chương 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu</b>	<b>38</b>
<b>2.1. Đối tượng nghiên cứu</b>	<b>38</b>
2.1.1 Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng nghiên cứu	38
2.1.2 Tiêu chuẩn loại trừ	39



<b>2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu</b>	<b>39</b>
<b>2.3. Phương pháp nghiên cứu</b>	<b>39</b>
2.3.1. Thiết kế nghiên cứu	39
2.3.2. Các bước tiến hành nghiên cứu	40
2.3.3. Các chỉ số cần xác định trong nghiên cứu	43
2.3.4. Kỹ thuật xác định các chỉ số trong nghiên cứu	43
<b>2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu</b>	<b>51</b>
<b>2.5. Trang thiết bị và máy móc phục vụ nghiên cứu</b>	<b>52</b>
<b>2.6. Phương pháp phân tích số liệu</b>	<b>52</b>
<b>2.7. Đạo đức nghiên cứu</b>	<b>53</b>
<b>Chương 3. Kết quả nghiên cứu</b>	<b>54</b>
<b>3.1. Một số đặc điểm của đối tượng nghiên cứu</b>	<b>54</b>
3.1.1. Đặc điểm về tuổi và huyết áp	54
3.1.2. Tuổi thai của đối tượng nghiên cứu	54
3.1.3. Đặc điểm về tỷ lệ phù	55
3.1.4. Một số đặc điểm về huyết học	56
3.1.5. Một số đặc điểm về hóa sinh máu cơ bản	58
3.1.6. Phân bố mức protein niệu	58
3.1.7. Một số đặc điểm của trẻ sơ sinh ở các sản phụ bình thường và tiền sản giật	59
<b>3.2. Hoàn chỉnh và xây dựng đường chuẩn của kỹ thuật Realtime PCR để định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ</b>	<b>60</b>
3.2.1. Chiết tách DNA	60
3.2.2. Thực hiện kỹ thuật PCR lồng để phát hiện DNA sau chiết tách	60
3.2.3. Thực hiện kỹ thuật PCR lồng để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen cần định lượng trong huyết tương thai phụ	62
3.2.4. Hoàn chỉnh và xây dựng đường chuẩn của kỹ thuật Realtime PCR để định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ	63

<b>3.3. Định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bằng kỹ thuật Realtime PCR</b>	<b>69</b>
3.3.1. Định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bình thường	69
3.3.2. Định lượng nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ tiền sản giật	70
3.3.3. Xác định sự thay đổi nồng độ DNA phôi thai trong huyết tương thai phụ bình thường và thai phụ tiền sản giật	74
<b>Chương 4. Bàn luận</b>	<b>75</b>
<b>4.1. Một số đặc điểm của đối tượng nghiên cứu</b>	<b>76</b>
<b>4.2. Hoàn chỉnh và xây dựng đường chuẩn của kỹ thuật Realtime PCR định lượng DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ</b>	<b>78</b>
4.2.1. Hoàn chỉnh kỹ thuật chiết tách DNA phôi thai tự do theo quy trình của Randen I. và CS	78
4.2.2. Kết quả của PCR lồng kiểm tra DNA sau chiết tách	79
4.2.3. Kết quả của PCR lồng để phát hiện đoạn gen cần định lượng	79
4.2.4. Hoàn chỉnh và xây dựng đường chuẩn của kỹ thuật Realtime PCR	80
<b>4.3. Nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương mẹ ở nhóm thai phụ bình thường và thai phụ tiền sản giật, ứng dụng trong dự báo sớm tiền sản giật</b>	<b>85</b>
4.3.1. Nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ bình thường	86
4.3.2. Nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương thai phụ tiền sản giật	92
<b>Kết luận</b>	<b>104</b>
<b>Kiến nghị</b>	<b>105</b>
<b>Tài liệu tham khảo</b>	
<b>Phụ lục</b>	

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

$\alpha$ FP	anpha-fetoprotein
CI:	Confidence Interval (Khoảng tin cậy)
Coef.	Coefficient (hệ số)
Ct:	Threshold cycle (Chu kỳ ngưỡng)
DNA:	Deoxyribonucleic acid
E:	Efficiency (Hiệu quả)
HATT:	Huyết áp tâm thu
HATTr:	Huyết áp tâm trương
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
IL:	Interleukin
Nested PCR:	Nested Polymerase Chain Reaction (PCR lồng)
NST:	Nhiễm sắc thể
OR:	Odds Ratio (Tỷ suất chênh)
PCR:	Polymerase Chain Reaction
RhD:	Rhesus D
RNA:	Ribonucleic acid
RR:	Relative Risk (Nguy cơ tương đối)
Sq:	Starting quantity (Số lượng bản DNA đích ban đầu)
SRY:	Sex-determining region of Y (Vùng quyết định giới nằm trên NST Y)
THA:	Tăng huyết áp
TSG:	Tiền sản giật
WHO:	World Health Organization (Tổ chức Y tế Thế giới)

## DANH MỤC BẢNG

	Trang
Bảng 1.1. Một số yếu tố nguy cơ của tiền sản giật.	15
Bảng 1.2. Phân loại tiền sản giật.	21
Bảng 2.1. Trình tự môi của phản ứng PCR xác định gen của NST X	45
Bảng 2.2. Trình tự môi của phản ứng PCR xác định gen của NST Y	47
Bảng 2.3. Trình tự môi và mẫu dò của phản ứng Realtime PCR xác định gen SRY của NST Y	49
Bảng 3.1. Một số đặc điểm về tuổi, huyết áp của đối tượng nghiên cứu.	54
Bảng 3.2. Thống kê tuổi thai của đối tượng nghiên cứu.	55
Bảng 3.3. Tình trạng phù của đối tượng nghiên cứu.	55
Bảng 3.4. Một số đặc điểm về huyết học của đối tượng nghiên cứu	56
Bảng 3.5. Đặc điểm về số lượng hồng cầu, hematocrit, hemoglobin của đối tượng nghiên cứu.	57
Bảng 3.6. Đặc điểm về hóa sinh máu cơ bản của đối tượng nghiên cứu.	58
Bảng 3.7. Phân bố mức độ protein niệu của thai phụ.	58
Bảng 3.8. Trọng lượng thai lúc đẻ.	59
Bảng 3.9. Hình thức đẻ.	59
Bảng 3.10. Bảng đo độ tinh sạch DNA chiết tách của đối tượng nghiên cứu.	60
Bảng 3.11. Kết quả kiểm tra và phát hiện DNA sau chiết tách bằng PCR lồng với cặp môi $X_1X_2$ , $X_1X_3$ .	61

Bảng 3.12. Kết quả kiểm tra và phát hiện DNA của gen SRY sau chiết tách bằng PCR lồng với cặp mồi Y <sub>1.5</sub> Y <sub>1.6</sub> và Y <sub>1.7</sub> Y <sub>1.8</sub> .	62
Bảng 3.13. Nồng độ DNA phôi thai tự do trung bình ở các quý của nhóm thai phụ bình thường.	69
Bảng 3.14. Nồng độ DNA phôi thai tự do trung bình ở các quý của nhóm thai phụ tiền sản giật.	71
Bảng 3.15. Mối tương quan giữa nồng độ DNA phôi thai trong huyết tương với một số yếu tố của thai phụ tiền sản giật.	72
Bảng 3.16. Mối tương quan giữa nồng độ DNA phôi thai với tuần thai, phù, huyết áp tâm thu, huyết áp tâm trương ở thai phụ tiền sản giật.	73
Bảng 3.17. Mối tương quan giữa nồng độ DNA phôi thai với tuần thai, phù và protein niệu ở thai phụ tiền sản giật.	73
Bảng 3.18. Nồng độ DNA phôi thai tự do trong huyết tương của nhóm thai phụ bình thường và thai phụ tiền sản giật ở quý 3 của thai kỳ.	74
Bảng 4.1. Liệt kê các kênh kính lọc nguồn sáng kích thích và kênh lọc huỳnh quang có trên IQ5 tương ứng với các reporter khuyến cáo sử dụng. Các chữ đậm là reporter tối ưu được chọn cho 5 màu.	83
Bảng 4.2. Nồng độ DNA phôi thai tự do ở nhóm thai phụ bình thường.	87
Bảng 4.3. Nồng độ DNA phôi thai tự do ở nhóm thai phụ bình thường và nhóm thai phụ tiền sản giật.	92

## DANH MỤC HÌNH

	Trang
Hình 1.1. Động mạch xoắn ốc ở thai phụ bình thường và thai phụ tiền sản giật.	18
Hình 1.2. Tóm tắt cơ chế bệnh sinh của tiền sản giật.	19
Hình 1.3. Minh họa biểu đồ khuếch đại vẽ lên các đường biểu diễn khuếch đại của mẫu chuẩn và mối quan hệ giữa số lượng bản DNA đích có trong các mẫu chuẩn và chu kỳ ngưỡng tương ứng.	29
Hình 1.4. Minh họa biểu đồ khuếch đại thể hiện các đường biểu diễn khuếch đại của mẫu chuẩn và mối quan hệ giữa số lượng bản DNA đích có trong các mẫu chuẩn và chu kỳ ngưỡng tương ứng	30
Hình 1.5. Tóm tắt cơ chế hoạt động khi sử dụng chất huỳnh quang là SYBR-I. trong Realtime PCR.	31
Hình 1.6. Tóm tắt cơ chế hoạt động của Taqman Probe trong Realtime PCR.	32
Hình 1.7. Tóm tắt cơ chế hoạt động của Beacon probe trong Realtime PCR.	33
Hình 1.8. Tóm tắt cơ chế hoạt động của probe lai trong Realtime PCR.	34
Hình 3.1. Hình ảnh điện di sản phẩm sau PCR lồng với cặp mồi $X_1X_3$ và $X_2X_3$	61
Hình 3.2. Hình ảnh điện di sản phẩm sau PCR lồng với cặp mồi $Y_{1.5}Y_{1.6}$ và $Y_{1.7}Y_{1.8}$	63
Hình 3.3. <i>E.coli</i> trong có chứa plasmid TOPO	65
Hình 3.4. Hình ảnh điện di sản phẩm sau PCR kiểm tra DNA của gen SRY có trong plasmid.	65

Hình 3.5. Hình ảnh điện di sản phẩm sau PCR với cặp mồi SRY - 245R và SRY - 109F	66
Hình 3.6. Đường chuẩn của gen SRY cho tín hiệu tốt với $E = 96,3\%$ và $R^2 = 0,991$	67
Hình 3.7. Đường chuẩn của gen SRY cho tín hiệu tốt với $E = 90\%$ và $R^2 = 1$	68
Hình 4.1. DNA phôi thai tự do kích hoạt quá trình viêm thông qua thụ thể TLR-9.	96

## **DANH MỤC BIỂU ĐỒ**

	Trang
Biểu đồ 3.1. Mối liên quan giữa tuần thai và nồng độ DNA phôi thai tự do ở nhóm thai phụ bình thường.	70
Biểu đồ 3.2. Mối liên quan giữa tuần thai và nồng độ DNA phôi thai tự do ở nhóm thai phụ tiền sản giật.	71
Biểu đồ 3.3. Nồng độ DNA phôi thai tự do (log) trong huyết tương thai phụ bình thường và thai phụ tiền sản giật ở quý 3 của thai kỳ.	74