

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT REALTIME RT – PCR ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG FLT-1 mRNA NGUỒN GỐC NHAU THAI TRONG HUYẾT TƯƠNG CỦA THAI PHỤ VÀ KHẢO SÁT MỐI LIÊN QUAN VỚI TIỀN SẢN GIẬT – SẢN GIẬT

Cao Ngọc Thành, Hà Thị Minh Thị, Nguyễn Việt Nhàn, Nguyễn Vũ Quốc Huy, Lê Phan Tường Quỳnh, Đoàn Hữu Nhật Bình, Trần Thị Hạ Thị, Lê Tuấn Linh, Đoàn Thị Duyên Anh, Vũ Văn Đức, Nguyễn Trần Thảo Nguyễn, Trần Mạnh Linh

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Khảo sát mRNA nhau thai trong huyết tương thai phụ là một phương pháp không xâm nhập, có giá trị dự báo nguy cơ tiền sản giật – sản giật. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu: (1) Bước đầu áp dụng kỹ thuật Realtime RT-PCR để định lượng FLT-1 mRNA có nguồn gốc nhau thai trong huyết tương của các phụ nữ mang thai; (2) Khảo sát mối liên quan giữa sự biểu hiện FLT-1 mRNA với tiền sản giật – sản giật. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 398 thai phụ có tuổi thai từ 16-24 tuần được theo dõi đến lúc sinh và 6 tuần sau sinh. mRNA của gene FLT-1 (gene đích) và gene GAPDH (gene chứng) được định lượng bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR với RNA được tách từ huyết tương của thai phụ. **Kết quả:** Tỷ lệ mẫu có FLT-1 mRNA dương tính là 10,05%, tỷ lệ này đạt 12,46% trong nhóm có nồng độ GAPDH mRNA từ 10^4 copy/ml trở lên. Nồng độ trung bình của FLT-1 mRNA là $1,54 \times 10^4 \pm 2,12 \times 10^4$ copy/ml. Tỷ số FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA là $0,017 \pm 0,043$. Nguy cơ mắc TSG – SG khi có một thai phụ có FLT-1 mRNA dương tính cao gấp 2,33 lần (95%CI: 1,01 – 5,39) so với thai phụ có FLT-1 mRNA âm tính. Nếu xem xét thêm yếu tố nồng độ GAPDH mRNA cao từ 10^4 copy/ml trở lên thì nguy cơ này cao gấp 2,48 lần (95%CI: 1,04 – 5,92). Tỷ số FLT1 mRNA / GAPDH mRNA ở nhóm TSG – SG cao hơn nhóm không có TSG – SG, lần lượt là $0,069 \pm 0,09$ và $0,008 \pm 0,016$ ($p = 0,0009$). Tỷ FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA có giá trị trong dự báo TSG – SG với xác suất đúng là 70,1%, điểm cắt tối ưu $> 0,0106$, độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng lần lượt là 66,67% và 82,35%. **Kết luận:** Chúng tôi đã ứng dụng thành công quy trình định lượng FLT-1 mRNA bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR. Sự biểu hiện gene FLT-1 ở mức mRNA có thể là một yếu tố giúp dự báo nguy cơ TSG – SG.

Từ khoá: Tiền sản giật, FLT-1 mRNA.

Abstract

APPLYING REALTIME RT-PCR FOR QUANTIFYING

PLACENTAL FLT-1 MRNA IN MATERNAL PLASMA AND IDENTIFYING ASSOCIATION WITH PREECLAMPSIA

Background: Detection of placental mRNA expression in maternal plasma seems noninvasive method by which to predict the risk of preeclampsia. This study aimed to: (1) Applying Realtime RT-PCR to quantify FLT-1 mRNA in maternal plasma; (2) Survey the association between FLT-1 mRNA expression and preeclampsia. **Patients and methods:** 398 pregnant women at 16-24 gestational weeks were followed until delivery and 6 weeks after. mRNA expression of FLT-1 gene (target gene) and GAPDH gene (control gene) were evaluated by Realtime RT-PCR in with RNA extracted from maternal plasma. **Results:** FLT-1 mRNA positive accounted for 10.05% of total samples and 12.46% of samples with GAPDH mRNA greater than or equal to 10^4 copies/ml. The mean concentration of FLT-1 mRNA was $1.54 \times 10^4 \pm 2.12 \times 10^4$ copies/ml, the mean ratio of FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA was 0.017 ± 0.043 . The presence of FLT-1 mRNA in maternal plasma increased the risk of developing preeclampsia (RR: 2.33, 95%CI: 1.01 – 5.39). In group having GAPDH mRNA concentration greater than or equal to 10^4 copies/ml, the presence of FLT-1 mRNA in maternal plasma also increased the risk of developing preeclampsia (RR: 2.48, 95%CI: 1.04 – 5.92). Ratio of FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA in preeclamptic pregnant women was significantly higher than normal group, 0.069 ± 0.09 and 0.008 ± 0.016 ($p = 0.0009$). The preeclampsia-predictive value of this ratio was 70.1%, the cut-off value > 0.0106 gave a sensitivity of 66.67% and specificity of 82.35%, respectively. **Conclusion:** The procedure for quantifying FLT-1 mRNA by Realtime RT-PCR was successfully applied. Increasing FLT-1 mRNA expression in maternal plasma could be a risk factor of preeclampsia.

Keywords: Preeclampsia, FLT-1 mRNA.

1. Đặt vấn đề

Tiền sản giật – sản giật (TSG – SG) là nguyên nhân tử vong thứ hai ở các bà mẹ mang thai, chỉ đứng sau băng huyết sau sinh và chiếm hơn 40% các trường hợp tai biến sản khoa [7]. Ngoài ra, hậu quả của tiền sản giật còn kéo dài dai dẳng sau khi sinh, với biến chứng đáng lưu ý là rối loạn chức năng nội mạc làm người mẹ có nguy cơ cao mắc các bệnh lý tim mạch.

Mặc dù cho đến nay nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của tiền sản giật – sản giật vẫn chưa được hiểu biết một cách rõ ràng, nhưng hầu như các giả thuyết đều cho rằng nó có nguồn gốc từ nhau thai bất thường làm phóng thích các yếu tố nhau thai vào máu mẹ. Chính các yếu tố này đã gây nên rối loạn chức năng nội mạc ở mẹ và hình thành các triệu chứng tiền sản giật – sản giật. Hệ thống các yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch máu (VEGF: vascular endothelial growth factor) và các receptor của nó (VEGFR) đóng vai trò quan trọng trong cả sự hình thành chức năng bình thường và bệnh lý của nội mạc, đặc biệt là trong tiền sản giật – sản giật [6]. VEGF có ba receptor, trong đó hai receptor liên quan đến sự tân tạo mạch máu (angiogenesis) trong phôi là Flt-1 (VEGFR-1) và KDR (VEGFR-2). Flt-1 (Fms-like tyrosine kinase-1) có hoạt tính tyrosine kinase yếu hơn KDR (kinase insert domain-containing receptor) nhưng khả năng gắn với VEGF lại mạnh hơn gấp 10 lần. Điều này cho thấy KDR là chất chuyển đổi chính của các tín hiệu tạo mạch máu, còn Flt-1 đóng vai trò điều hòa và được xem là có vai trò âm tính trong việc hình thành mạch máu ở giai đoạn sớm của phôi [11]. Protein Flt-1 được mã hóa bởi gene FLT-1 khu trú trên nhánh dài của nhiễm sắc thể 13, có chiều dài khoảng 195 Kb, gồm 30 exon. Bình thường, gene này bị hạn chế mức độ biểu hiện dù nó có mặt ở tế bào nội mạc của một số tổ chức khác nhau. Tuy nhiên, trong thời kỳ mang thai thì gene FLT-1 biểu hiện mức độ cao ở các tế bào lá nuôi, đặc biệt là dạng hòa tan sFlt-1 – một sản phẩm của sFLT-1 mRNA được hình thành từ sự thay đổi vị trí cắt nối gene làm đuôi poly-A gắn sớm ở trong intron 13 [3], [11]. Khảo sát của Jebbink (2011) cho thấy sFLT-1 mRNA chiếm đến 94% FLT-1 mRNA toàn phần được biểu hiện ở nhau thai. Protein sFlt-1 được xem như là một phân tử có tác dụng “bẫy” VEGF và PlGF (Placental growth factor: yếu tố phát triển nhau thai - thuộc họ VEGF) và làm giảm nồng độ các yếu tố này trong máu, vì vậy đóng vai trò quan trọng trong cơ chế hình thành tiền sản giật – sản giật [6]. Tỷ số sFlt-1/PlGF hiện nay đã bắt đầu được sử dụng như một yếu tố tiên lượng nguy cơ và giúp theo dõi

tiền sản giật – sản giật cho các bà mẹ mang thai. Bên cạnh nghiên cứu về các protein này trong huyết tương mẹ, việc khảo sát biểu hiện mRNA nhau thai trong huyết tương mẹ được xem như là một phương pháp để theo dõi chức năng nhau thai [9]. Định lượng FLT-1 mRNA trong máu mẹ bằng kỹ thuật Realtime RT – PCR sẽ giúp đánh giá được mức độ phiên mã của gene FLT-1 và góp phần tìm hiểu cơ chế bệnh sinh và nguy cơ tiền sản giật – sản giật. Vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm mục tiêu sau:

(1) Bước đầu áp dụng kỹ thuật Realtime RT – PCR để định lượng FLT-1 mRNA có nguồn gốc nhau thai trong huyết tương của các phụ nữ mang thai.

(2) Khảo sát mối liên quan giữa sự biểu hiện FLT-1 mRNA với tiền sản giật – sản giật.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

398 thai phụ có tuổi thai từ 16-24 tuần đến khám thai định kỳ và tham gia chương trình sàng lọc nguy cơ tiền sản giật – sản giật tại bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế trong thời gian từ tháng 11 năm 2013 đến tháng 6 năm 2015.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu theo phương pháp tiến cứu: 398 thai phụ sau khi được khám thai và thu thập các thông tin đều được theo dõi đến lúc sinh và thêm 6 tuần sau đó để xác định có hay không có tiền sản giật – sản giật.

2.2.2. Tiêu chuẩn chẩn đoán

Tiền sản giật – sản giật được chẩn đoán theo các tiêu chuẩn như sau:

- Chẩn đoán tiền sản giật khi có các triệu chứng sau:
 - + Huyết áp tâm thu > 140 mmHg hoặc huyết áp tâm trương > 90 mmHg, đo ít nhất hai lần, khi tuổi thai trên 20 tuần.
 - + Protein niệu > 300 mg/24 giờ.
 - Tiền sản giật nặng khi có ít nhất một trong các triệu chứng sau:
 - + Huyết áp tâm thu ≥ 160 mmHg hoặc huyết áp tâm trương ≥ 110 mmHg, đo ít nhất hai lần, khi tuổi thai trên 20 tuần.
 - + Protein niệu ≥ 5 g/24 giờ hoặc ≥ 3 g trên hai mẫu nước tiểu được lấy cách nhau ít nhất 4 giờ.
 - + Các triệu chứng thần kinh trung ương nặng và liên tục.
 - + Giảm tiểu cầu: dưới $100.000 / \text{mm}^3$.
 - + Tăng các enzyme gan gấp đôi giới hạn trên của ngưỡng bình thường.

+ Phù phổi.
+ Creatinine huyết thanh: 1,1 mg/dl.
- Sản giật: Có cơn giật với 4 giai đoạn điển hình (xâm nhiễm, giật cứng, giật giãn cách và hôn mê), kèm theo một số dấu hiệu tiền sản giật nặng. [1], [2]

2.2.3. Tiêu chuẩn loại trừ

- Các thai phụ từ chối tham gia nghiên cứu mRNA.
- Các thai phụ có kết quả định lượng GAPDH mRNA âm tính (GAPDH là gene chứng).
- Các thai phụ không theo dõi được đến hết 6 tuần sau sinh để phân nhóm có và không có tiền sản giật – sản giật.

- Các thai phụ được phát hiện có kèm chửa trứng.

2.2.4. Quy trình định lượng FLT-1 mRNA

- Tách chiết RNA toàn phần: Lấy 7 ml máu tĩnh mạch của các thai phụ, chống đông trong EDTA, tách lấy huyết tương rồi quay ly tâm với vận tốc 1600g trong 10 phút ở 4°C. RNA toàn phần được tách từ 800 µl huyết tương (được chia thành 4 phần ứng tách chiết) theo phương pháp PHENOL/CHCL3. Nồng độ RNA và A260/A280 của mẫu được đo bằng máy Nano Drop 2000.

- Tổng hợp cDNA: Phản ứng RT – PCR để tổng hợp cDNA gồm 8 µl RT-Mix, 15 µl dịch chiết RNA toàn phần cho vào ống có chứa sẵn 1 µl enzyme RT (kit cDNA-H Synthesis). Cho ống phản ứng vào máy luân nhiệt Sure Cyclor 8800 (Agilent Technologies), với chu kỳ nhiệt là 25°C trong 5 phút; 42°C trong 30 phút; 85°C trong 5 phút; giữ ở 4°C.

- Thực hiện phản ứng Realtime RT – PCR: Mỗi ống phản ứng gồm 12,5 µl iPremium qPCR Master Mix 2X; 1,2 µl primer-probe(*) tương ứng, 11,3 µl dung dịch cDNA đã được tổng hợp ở trên. Cho ống phản ứng vào máy Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies), với chu kỳ nhiệt là biến tính ở 95°C trong 15 giây, gắn mỗi ở 60°C trong 1 phút (đọc kết quả tại bước này). Mỗi lần chạy phản ứng đều có chạy kèm một bộ chuẩn với 3 nồng độ là 10², 10⁴ và 10⁶ copy/µl.

(*) Sử dụng TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) gồm có PCR primer không đánh dấu và TaqMan MGB probe đánh dấu FAM.

+ Đối với gene FLT1-1 (gene nghiên cứu): Human assay ID là Hs01052936_m1

+ Đối với gene GAPDH (gene chứng): Human assay ID là Hs99999905_m1

- Đọc kết quả: Sử dụng phần mềm MxPro v4.10 được tích hợp theo máy Realtime PCR. Nồng độ đo được biểu thị theo đơn vị số copy/ml huyết tương.

- Bình thường hóa (normalise) nồng độ FLT-1 mRNA theo gene chứng GAPDH: Sử dụng tỷ số “nồng độ FLT-1 mRNA / nồng độ GAPDH mRNA” [4].

2.2.5. Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm thống kê y học MedCalc v.12 để thực hiện các kiểm định: t-test để so sánh trị trung bình, test χ² để so sánh các tỷ lệ %, tính nguy cơ tương đối (RR: Relative risk), vẽ đường cong ROC cùng các trị số liên quan để đánh giá giá trị dự báo của chỉ điểm.

3. Kết quả nghiên cứu

Trong 398 thai phụ được đưa vào nghiên cứu và theo dõi đến hết thời kỳ hậu sản, đã có 29 trường hợp xuất hiện TSG – SG, chiếm tỷ lệ 7,29 %.

3.1. Thông tin chung của các thai phụ nghiên cứu

Bảng 1. Một số đặc điểm của các thai phụ và thai

Đặc điểm	Không TSG - SG (n = 369)	TSG - SG (n = 29)	p
Tuổi thai thời điểm định lượng mRNA (tuần)	20,95 ± 1,70	21,10 ± 1,35	0,6432
Thai con so (%)	50,68	34,48	0,1371
Tuổi mẹ	29,34 ± 4,99	32,38 ± 5,31	0,0018
BMI trước khi mang thai	19,88 ± 2,70	21,02 ± 3,47	0,0329
Tiền sử TSG - SG (%)	3,25	17,24	0,0019
Tiền sử bất thường thai sản* (%)	23,04	17,24	0,6258
HATT (mmHg)	111,13 ± 12,34	118,66 ± 14,89	0,0020
HATT _r (mmHg)	68,65 ± 8,08	71,69 ± 8,78	0,0533

(*): Sẩy thai, thai lưu, sinh non

Nhận xét: Tuổi thai tại thời điểm định lượng FLT-1 mRNA không khác biệt giữa hai nhóm thai phụ có và không có TSG – SG. Không có sự khác biệt về yếu tố con so, tiền sử bất thường thai sản và huyết áp tâm trương (HATT_r) giữa hai nhóm. BMI trước khi mang thai và HATT (huyết áp tâm thu) ở nhóm TSG – SG cao hơn nhóm không TSG – SG có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ có tiền sử TSG – SG ở nhóm TSG – SG cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không TSG – SG.

3.2. Kết quả định lượng FLT-1 mRNA bằng kỹ thuật Realtime PCR

Bảng 2. Tỷ lệ FLT-1 mRNA dương tính khi định lượng bằng kỹ thuật Realtime PCR

Nồng độ GAPDH mRNA	FLT-1 mRNA	Số mẫu	Tỷ lệ %
Dưới 10 ⁴ copy/ml (n = 77)		0	0,0
Từ 10 ⁴ copy/ml trở lên (n = 321)		40	12,46
Tổng (n = 398)		40	10,05

Nhận xét: Tỷ lệ mẫu có FLT1 mRNA dương tính là 10,05%. Trong số các mẫu có nồng độ GAPDH mRNA dưới 10⁴ copy/ml, không có mẫu nào có FLT1 mRNA dương tính trong khi ở các mẫu nồng độ GAPDH mRNA từ 10⁴ copy/ml trở lên, tỷ lệ FLT1 mRNA dương tính đạt đến 12,46 %.

Bảng 3. Nồng độ FLT-1 mRNA và tỷ số FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA

Nồng độ FLT-1 mRNA	Tỷ số FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA
1,54 x 10 ⁴ ± 2,12 x 10 ⁴ (copy/ml)	0,017 ± 0,043

Chú thích: Tính trên 40 mẫu FLT-1 mRNA dương tính
Nhận xét: Nồng độ FLT1 mRNA trung bình của các mẫu dương tính là 1,54 x 10⁴ copy/ml. Trung bình tỷ số FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA là 0,017 ± 0,043.

Bảng 4. Mối liên quan của FLT-1 mRNA dương tính với một số đặc điểm của thai phụ và thai

Đặc điểm khảo sát	FLT-1 mRNA dương tính (n = 40)	FLT-1 mRNA âm tính (n = 358)	p
Tuổi thai khi lấy mẫu	21,48 ± 0,99	20,90 ± 1,72	0,0370
Thai con so (%)	45,50	49,72	0,9206
Tuổi mẹ	30,30 ± 4,40	29,47 ± 5,12	0,3252
BMI trước khi mang thai	20,24 ± 2,36	19,93 ± 2,81	0,5023
Tiền sử TSG - SG (%)	0,00	4,75	0,3109
Tiền sử bất thường thai sản (%)	22,50	22,63	0,8562
HATT	113,55 ± 14,75	111,47 ± 12,43	0,3256
HATT _r	70,20 ± 10,00	68,73 ± 7,93	0,2804

Nhận xét: FLT-1 mRNA dương tính có liên quan với tuổi thai, tuổi thai trung bình ở nhóm FLT-1 mRNA là 21,48 ± 0,99 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm FLT-1 mRNA âm tính (20,90 ± 1,72).

Bảng 5. Tương quan của tỷ số FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA với một số đặc điểm của thai phụ và thai

Đặc điểm khảo sát	Hệ số tương quan r	p	95%CI của r
BMI trước khi mang thai	-0,2408	0,1345	-0,5137 - 0,0765
HATT	-0,0398	0,8073	-0,3470 - 0,2751
HATT _r	-0,1940	0,2303	-0,4767 - 0,1251
Tuổi thai khi lấy mẫu	-0,0097	0,9524	-0,3203 - 0,3027
Tuổi mẹ	-0,0377	0,8173	-0,3452 - 0,2771

Chú thích: Chỉ khảo sát trên 40 trường hợp có FLT-1 mRNA dương tính.

Nhận xét: Không có mối tương quan nào giữa tỷ số FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA với các đặc điểm BMI, HATT, HATT_r, tuổi thai và tuổi mẹ của thai phụ.

3.3. Mối liên quan giữa sự biểu hiện gene FLT-1 ở mức mRNA với tiền sản giật – sản giật

Trong số 29 bà mẹ có xuất hiện TSG – SG sau khi theo dõi, có 23 bà mẹ có nồng độ GAPDH mRNA từ 10⁴ copy/ml trở lên.

Bảng 6. Nguy cơ tương đối mắc TSG – SG theo chỉ điểm FLT-1 mRNA dương tính

GAPDH mRNA (copy/ml) của các thai phụ được khảo sát RR	TSG - SG	Không TSG-SG	RR (95%CI)	
Từ 10 ⁴ trở lên	FLT1 mRNA (+)	6	34	2,48 (1,04 - 5,92) p = 0,0407
	FLT1 mRNA (-)	17	264	
Chung (n = 398)	FLT1 mRNA (+)	6	34	2,33 (1,01 - 5,39) p = 0,0471
	FLT1 mRNA (-)	23	335	

Nhận xét: Phân tích nguy cơ tương đối (RR: relative risk) cho thấy nguy cơ mắc TSG – SG khi có một thai phụ có FLT-1 mRNA dương tính cao gấp 2,48 lần so với thai phụ có FLT-1 mRNA âm tính, nếu chỉ xét khi kết quả định lượng mRNA gene chứng GAPDH cao

từ 10⁴ copy/ml trở lên. Nguy cơ này cũng cao gấp 2,33 lần nếu xét trên toàn bộ thai phụ có mRNA gene chứng dương tính.

Bảng 7. So sánh tỷ số FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA ở hai nhóm TSG – SG và không TSG – SG

FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA	TSG - SG (n = 6)	Không TSG - SG (n = 34)	p
$\bar{X} \pm SD$	0,069 ± 0,096	0,008 ± 0,016	0,0009

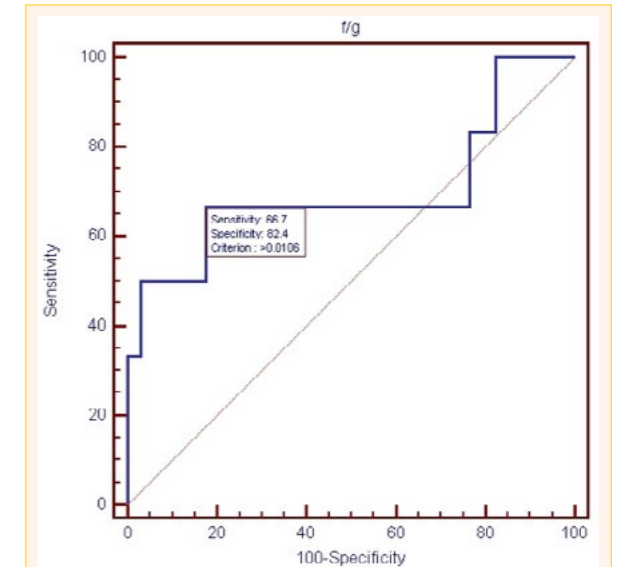
Nhận xét: Tỷ số FLT1 mRNA / GAPDH mRNA trung bình ở nhóm có TSG – SG là 0,069 ± 0,096; cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không có TSG – SG là 0,008 ± 0,016.

3.4. Khảo sát đường cong ROC của chỉ điểm FLT1 mRNA / GAPDH mRNA theo TSG - SG

- Diện tích dưới đường cong ROC (AUC) = 0,701 (95%CI: 0,536 – 0,835)

- Điểm cắt tối ưu: > 0,0106.

- Độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng tại điểm cắt này lần lượt là 66,67% và 82,35%.



Hình 1: Đường cong ROC thể hiện giá trị của tỷ FLT1 mRNA / GAPDH mRNA trong dự báo TSG - SG

4. Bàn luận

4.1. Thông tin chung của các thai phụ nghiên cứu

398 thai phụ đến khám thai tại bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế được chúng tôi vào nghiên cứu là những người được theo dõi thai kỳ đến hết thời kỳ hậu sản và có kết quả định lượng mRNA của các gene GAPDH (gene chứng) dương tính. FLT-1 mRNA cũng được định lượng cùng lúc với GAPDH mRNA. Sau khi theo dõi, đã phát hiện có 29 thai phụ bị TSG – SG, chiếm tỷ lệ 7,3%. Tỷ lệ này cũng khá phù hợp với ý văn, 3 – 7% [10].

Tuổi thai thời điểm định lượng mRNA của nhóm nghiên cứu là từ 16 – 24 tuần, so sánh tuổi thai này trong hai phân nhóm là không TSG – SG và TSG – SG chúng tôi

nhận thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, lần lượt là $20,95 \pm 1,70$ và $21,10 \pm 1,35$ tuần, $p = 0,6432$.

Chúng tôi có khảo sát một số đặc điểm của thai phụ được xem là yếu tố nguy cơ của tiền sản giật thì nhận thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm về tuổi mẹ, BMI trước khi mang thai, tiền sử bản thân/gia đình có TSG – SG. Kết quả ở bảng 1 cho thấy tuổi mẹ trung bình ở nhóm TSG – SG cao hơn nhóm không TSG – SG ($32,38 \pm 5,31$ tuổi so với $29,34 \pm 4,99$ tuổi, $p = 0,0018$); trung bình BMI trước khi mang thai ở nhóm TSG – SG cao hơn nhóm không TSG – SG ($21,02 \pm 3,47$ so với $19,88 \pm 2,70$; $p = 0,0329$); tỷ lệ có tiền sử bản thân/gia đình về TSG ở nhóm TSG – SG là 17,24%, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không bị TSG – SG (3,25%) với $p = 0,0019$. Về đặc điểm thai con so thường được xem là một yếu tố nguy cơ của TSG – SG, tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi tỷ lệ thai con so ở hai nhóm TSG – SG và không TSG – SG lần lượt là 34,48% và 50,68%, với sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ có tiền sử thai sản bất thường cũng không có sự khác biệt giữa hai nhóm TSG – SG và không TSG – SG (lần lượt là 17,24% và 23,04%). Đối với trị số huyết áp đo được tại thời điểm khảo sát (16 – 24 tuần tùy thai phụ), chúng tôi nhận thấy sự khác biệt về HATT là có ý nghĩa thống kê, với HATT ở nhóm TSG – SG là $118,66 \pm 14,89$, cao hơn nhóm không TSG – SG ($111,13 \pm 12,34$) với $p = 0,020$; trong khi đó sự khác biệt về HATTr giữa hai nhóm không có ý nghĩa thống kê.

4.2. Định lượng FLT-1 mRNA trong máu mẹ bằng kỹ thuật Realtime PCR

Chúng tôi đã định lượng FLT-1 mRNA trên các mẫu máu của 398 thai phụ với tuổi thai từ 16 – 24 tuần. Kết quả ở bảng 2 cho thấy có 40 mẫu có FLT-1 mRNA dương tính, chiếm tỷ lệ 10,05%. Trong số 77 mẫu có nồng độ GAPDH mRNA dưới 10^4 copy/ml không có mẫu nào có FLT-1 mRNA dương tính, trong khi ở nhóm nồng độ GAPDH mRNA từ 10^4 copy/ml trở lên có tỷ lệ FLT-1 mRNA dương tính là 12,46%.

Kết quả bảng 3 cho thấy nồng độ FLT1 mRNA trung bình của các mẫu dương tính là $1,54 \times 10^4$ copy/ml. Hiện nay có hai phương pháp được khuyến cáo để bình thường hóa (normalise) nồng độ mRNA gene đích trong nghiên cứu khi thực hiện kỹ thuật Realtime RT-PCR là sử dụng tỷ số mRNA của gene đích so với gene chứng (thường là gene quản gia như gene GAPDH) hoặc sử dụng $-\Delta\Delta Ct$ (Ct : chu kỳ ngưỡng) [4]. Phương pháp bình thường hóa của chúng tôi trong nghiên cứu này được thực hiện bằng cách lấy tỷ số nồng độ FLT-1 mRNA / nồng độ GAPDH mRNA, vì chúng tôi có sử dụng bộ nồng độ chuẩn trong quá trình thực hiện Realtime RT-PCR nên có kết quả theo số copy/ml của mRNA. Trung bình tỷ

số FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA trong nghiên cứu của chúng tôi là $0,017 \pm 0,043$. Như vậy, nồng độ FLT-1 mRNA trong máu mẹ khá thấp so với GAPDH mRNA.

Chúng tôi còn khảo sát mối liên quan của FLT-1 mRNA dương tính khi định lượng bằng Realtime RT-PCR với một số đặc điểm của thai phụ và thai. Kết quả ở bảng 4 cho thấy FLT-1 mRNA có liên quan với tuổi thai khi lấy mẫu, tuổi thai trung bình ở nhóm FLT-1 mRNA dương tính là $21,48 \pm 0,99$ cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm FLT-1 mRNA âm tính ($20,90 \pm 1,72$), $p = 0,0370$. Trong khi đó FLT-1 mRNA dương tính không liên quan với các đặc điểm còn lại như tuổi mẹ, BMI, thai con so, tiền sử TSG – SG, tiền sử bất thường thai sản, HATT và HATTr. Khi khảo sát tương quan giữa tỷ số FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA trong nhóm có FLT-1 mRNA dương tính với các đặc điểm tuổi mẹ, BMI, HATT và HATTr, kết quả ở bảng 5 cho thấy không có mối tương quan nào.

4.3. Mối liên quan giữa sự biểu hiện gene FLT-1 mRNA với tiền sản giật – sản giật

Chúng tôi đã theo dõi 398 thai phụ cho đến hết thời kỳ hậu sản và phát hiện có 29 bà mẹ bị TSG – SG, trong đó có 23 bà mẹ TSG – SG thuộc nhóm nồng độ GAPDH mRNA từ 10^4 copy/ml trở lên. Mặc dù FLT-1 dương tính có liên quan đến tuổi thai khi lấy mẫu, tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi không có sự khác biệt về tuổi thai ở hai nhóm TSG – SG và không TSG – SG (bảng 1) nên những phân tích sau đây là hoàn toàn hợp lý. Kết quả phân tích nguy cơ tương đối (RR: relative risk) ở bảng 6 cho thấy nguy cơ mắc TSG – SG khi một thai phụ có FLT-1 mRNA dương tính cao gấp 2,33 lần (95%CI: 1,01 – 5,39) so với thai phụ có FLT-1 mRNA âm tính. Nếu xem xét thêm yếu tố nồng độ mRNA gene chứng GAPDH cao từ 104 copy/ml trở lên thì nguy cơ này cao hơn, gấp 2,48 lần (95%CI: 1,0⁴ – 5,92). Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy FLT-1 mRNA là một yếu tố giúp dự báo nguy cơ mắc TSG – SG.

Khảo sát tỷ số FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA trên 40 thai phụ có FLT-1 mRNA dương tính cho thấy trung bình tỷ số FLT1 mRNA / GAPDH mRNA ở nhóm có TSG – SG là $0,069 \pm 0,09$; cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không có TSG – SG là $0,008 \pm 0,016$; $p = 0,0009$ (bảng 7). Trong nghiên cứu này, tuổi thai khi lấy mẫu ở hai nhóm có và không TSG – SG không có sự khác biệt và khi xét trong 40 mẫu có FLT-1 dương tính thì tỷ số FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA cũng không có mối tương quan với tuổi thai ($r = -0,0097$; $p = 0,9524$) nên nhận định trên của chúng tôi là đáng tin cậy.

Một nghiên cứu của Farina (2006) theo dõi trên 36 phụ nữ mang thai có 6 người TSG – SG và 30 người bình

thường có tuổi thai trung bình 32-33 tuần, kết quả nồng độ tương đối (RC: relative concentration) của FLT-1 mRNA ở nhóm TSG – SG cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm bình thường, giá trị trung bình của RC là 1021782 copy/ml so với 593525 copy/ml, $p < 0,01$ [5]. Nghiên cứu của Purwosunu và cs năm 2009 trên 372 thai phụ có tuổi thai từ 15 – 20 tuần cho thấy trung bình của nồng độ FLT-1 mRNA (tác giả sử dụng log10 scale của số copy/ml) ở nhóm TSG – SG ($n = 62$) là $2,39 \pm 0,32$, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với ở nhóm không TSG – SG ($n = 310$) là $1,90 \pm 0,32$, với $p < 0,001$ [10]. Như vậy, kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với các tác giả Farina và Purwosunu.

Phân tích đường cong ROC chúng tôi nhận thấy tỷ FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA có giá trị dự báo TSG – SG với xác suất đúng là 70,1%, điểm cắt tối ưu: $> 0,0106$, độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng tại điểm cắt này lần lượt là 66,67% và 82,35% (hình 1). Nghiên cứu của Purwosunu (2009) còn cho thấy giá trị dự báo TSG – SG cao hơn chúng tôi, với AUC = 0,846 (95%CI: 0,783 – 0,909) và FLT-1 mRNA là chỉ điểm có AUC cao nhất trong bảy chỉ điểm được tác giả nghiên cứu (gồm FLT-1, endoglin, SERPINE1, SELP, PLAT, VEGFA, PLAC1) [10]. Theo nghiên cứu của Ng (2003), mRNA nhau thai khá ổn định trong huyết tương mẹ, vì vậy có thể đóng vai trò là các chỉ điểm có tính ứng dụng cao trong lâm sàng [8]. Ngoài ra, việc khảo sát các mRNA nguồn gốc nhau thai trong máu mẹ sẽ giúp đánh giá chức năng nhau thai và góp phần tìm hiểu cơ chế bệnh sinh TSG – SG.

5. Kết luận

Qua nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật Realtime RT-PCR để định lượng nồng độ mRNA của gene FLT-1 mRNA nguồn gốc nhau thai trong huyết tương của 398 thai phụ được theo dõi thai kỳ đến hết thời kỳ hậu sản, chúng tôi có những kết luận như sau:

Tài liệu tham khảo

- Bộ y tế (2009), "Tăng huyết áp, tiền sản giật và sản giật", Hướng dẫn quốc gia về các dịch vụ chăm sóc sức khỏe sinh sản, pp. 112-113.
- ACOG (2013), "Hypertension in pregnancy", *Obstetrics & Gynecology*, 122(5).
- Clark D. E., Smith S. K., He Y., Day K. A., Licence D. R., Corps A. N., Lammoglia R., Charnock-Jones D. S. (1998), "A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation", *Biology of Reproduction*, 59(6), pp. 1540-1548.
- Crocker J, Murray P. G. (2003), *Molecular Biology in Cellular Pathology*, John Wiley & Sons.
- Farina A., Sekizawa A., Purwosunu Y., Rizzo N., Banzola I., Concu M., Morano D., Giommi F., Bevinì M., Mabrook M. (2006), "Quantitative distribution of a panel of circulating mRNA in preeclampsia versus controls", *Prenatal diagnosis*, 26(12), pp. 1115-1120.
- Jebbink J., Keijsers R., Veenboer G., van der Post J., Ris-Stalpers C., Afink G. (2011), "Expression of placental FLT1 transcript variants relates to both gestational hypertensive disease and fetal growth", *Hypertension*, 58(1), pp. 70-76.
- Meis P. J., Goldenberg R. L., Mercer B. M., Iams J. D., Moawad A. H.,

5.1. Về quy trình định lượng mRNA của gene FLT-1 trong huyết tương thai phụ bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR:

Chúng tôi đã ứng dụng thành công quy trình định lượng FLT-1 mRNA bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR, kết quả cụ thể là:

- Tỷ lệ mẫu có FLT-1 mRNA dương tính là 10,05%, tỷ lệ này đạt 12,46% trong nhóm có nồng độ GAPDH mRNA (gene chứng) từ 10^4 copy/ml trở lên.

- Nồng độ trung bình của FLT-1 mRNA là $1,54 \times 10^4 \pm 2,12 \times 10^4$ copy/ml. Tỷ số FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA là $0,017 \pm 0,043$.

- FLT-1 mRNA dương tính có liên quan với tuổi thai: tuổi thai trung bình ở nhóm FLT-1 mRNA là $21,48 \pm 0,99$ cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm FLT-1 mRNA âm tính ($20,90 \pm 1,72$)

- Trong nhóm có FLT-1 mRNA dương tính, không có mối tương quan giữa tỷ số FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA với tuổi thai, BMI, HATT và HATTr.

5.2. Về mối liên quan giữa sự biểu hiện FLT-1 mRNA với tiền sản giật – sản giật:

- Nguy cơ mắc TSG – SG khi có một thai phụ có FLT-1 mRNA dương tính cao gấp 2,33 lần (95%CI: 1,01 – 5,39) so với thai phụ có FLT-1 mRNA âm tính. Nếu xem xét thêm yếu tố nồng độ mRNA gene chứng GAPDH cao từ 10^4 copy/ml trở lên thì nguy cơ này cao gấp 2,48 lần (95%CI: 1,04 – 5,92).

- Trong số 40 thai phụ có FLT-1 mRNA dương tính: trung bình tỷ số FLT1 mRNA / GAPDH mRNA ở nhóm TSG – SG cao hơn nhóm không có TSG – SG, lần lượt là $0,069 \pm 0,09$ và $0,008 \pm 0,016$ ($p = 0,0009$).

- Tỷ FLT-1 mRNA / GAPDH mRNA có giá trị trong dự báo TSG – SG với xác suất đúng là 70,1%, điểm cắt tối ưu: $> 0,0106$, độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng lần lượt là 66,67% và 82,35%.

Miodovnik M., Menard M. K., Caritis S. N., Thurnau G. R., Bottoms S. F. (1998), "The preterm prediction study: risk factors for indicated preterm births", *American journal of obstetrics and gynecology*, 178(3), pp. 562-567.

8. Ng E. K., Tsui N. B., Lau T. K., Leung T. N., Chiu R. W., Panesar N. S., Lit L. C., Chan K.-W., Lo Y. D. (2003), "mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), pp. 4748-4753.

9. Purwosunu Y., Sekizawa A., Koide K., Farina A., Wibowo N., Wilkjosastro G. H., Okazaki S., Chiba H., Okai T. (2007), "Cell-free mRNA concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator are increased in the plasma of pregnant women with preeclampsia", *Clinical chemistry*, 53(3), pp. 399-404.

10. Purwosunu Y., Sekizawa A., Okazaki S., Farina A., Wibowo N., Nakamura M., Rizzo N., Saito H., Okai T. (2009), "Prediction of preeclampsia by analysis of cell-free messenger RNA in maternal plasma", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 200(4), pp. 386.e1-386.e7.

11. Shibuya M. (2011), "Involvement of Flt-1 (VEGF receptor-1) in cancer and preeclampsia", *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 87(4), pp. 167.