

# PHƯƠNG PHÁP VÀ KẾT QUẢ ĐỊNH LƯỢNG DOPAMIN HUYẾT THANH Ở BỆNH NHÂN TÂM THẦN PHÂN LIỆT THỂ PARANOID

NGUYỄN THANH BÌNH - Đại học Y Thái Bình

## ĐẶT VẤN ĐỀ.

Tâm thần phân liệt (TTPL-Schizophrenia) là một bệnh tâm thần nặng, tương đối phổ biến, căn nguyên chưa rõ, thường gặp ở lứa tuổi trẻ, tiến triển và tiên lượng rất khác nhau. Người ta đã xác định được một số phương pháp khác nhau để định lượng nồng độ của catecholamine trong máu như phương pháp quang phổ, phương pháp sắc ký, phương pháp đồng vị phóng xạ,...Nhưng cũng chưa có phương pháp nào làm thỏa mãn được các nhà nghiên cứu yêu cầu [5].

Để bước đầu tiếp cận với những phương pháp kỹ thuật xét nghiệm dopamin, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm mục tiêu: Định lượng nồng độ dopamin huyết thanh ở bệnh nhân tâm thần phân liệt thể paranoid.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

+ Nghiên cứu trên 71 bệnh nhân tâm thần phân liệt thể paranoid theo tiêu chuẩn chẩn đoán của Tổ chức y tế Thế giới lần thứ 10 năm 1992 (ICD-10F). Bệnh nhân được điều trị tại Bệnh viện tâm thần Thái Bình.

+ Giới tính: nam: 40 bệnh nhân và nữ: 31 bệnh nhân. Tuổi nhỏ nhất: 22 tuổi, tuổi cao nhất: 73 tuổi và tuổi trung bình là  $36,49 \pm 11,02$  tuổi.

+ Chọn bệnh nhân có đủ tiêu chuẩn của TTPL thể paranoid theo tiêu chuẩn của Tổ chức y tế Thế giới (ICD-10F năm 1992) về rối loạn tâm thần và hành vi. Sử dụng phương pháp nghiên cứu tiến cứu, phân tích từng trường hợp.

+ Chúng tôi chọn 71 bệnh nhân TTPL thể paranoid đáp ứng đủ tiêu chuẩn nghiên cứu điều trị nội trú tại Bệnh viện tâm thần Thái Bình từ tháng 11 năm 2006 đến tháng 11 năm 2008. Phương pháp xử lý số liệu bằng thống kê toán học theo chương trình Epiinfo 6.0.

## PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG DOPAMIN HUYẾT THANH.

### \* Phương pháp miễn dịch đánh dấu.

Những năm gần đây đã có nhiều kỹ thuật được áp dụng để định lượng nồng độ dopamin trong huyết thanh. Hầu hết các kỹ thuật dựa vào nguyên lý phản ứng miễn dịch (kháng nguyên, kháng thể: KN-KT):

+ Nguyên lý chung: các phương pháp miễn dịch đánh dấu đều dựa trên nguyên tắc miễn dịch cạnh tranh của phản ứng giữa kháng nguyên (Ag: antigene) và kháng thể (Ab: antibodies), tức là sự cạnh tranh giữa 2 kháng nguyên: một kháng nguyên đánh dấu với một kháng nguyên giống nhau không đánh dấu (chất cần định lượng). Kháng nguyên có thể đánh dấu với một chất phóng xạ như lode 125 (đối với RIA) hoặc đánh dấu với một enzyme (đối với EIA). Cụ thể như sau:

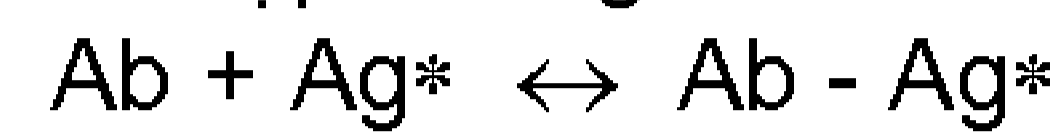
- Ag° là kháng nguyên không đánh dấu (chất cần định lượng).

- Ag\* là kháng nguyên có đánh dấu (hoặc với chất phóng xạ hoặc với enzyme).

- Ab là kháng thể.

Cho tác dụng Ag\* với Ab, ta được cân bằng thứ nhất,

tạo ra phức hợp kháng thể - kháng nguyên đánh dấu.



Người ta thêm vào phức hợp Ab - Ag\* một mẫu cần định lượng, tức là kháng nguyên không đánh dấu (Ag°), kháng nguyên không đánh dấu đẩy kháng nguyên đánh dấu (Ag\*) ra khỏi kháng thể.



Tỷ lệ giữa phức hợp đánh dấu và không đánh dấu phụ thuộc vào nồng độ của 2 kháng nguyên (đánh dấu và không đánh dấu). Nếu lượng của kháng nguyên đánh dấu và kháng thể không đánh dấu thay đổi thì tỷ lệ chỉ phụ thuộc vào kháng nguyên không đánh dấu, tức là kháng nguyên cần đo.

+ Phương pháp miễn dịch phóng xạ (RIA - Radio Immuno Assay): phân tích miễn dịch phóng xạ là người ta đánh dấu bằng các chất đồng vị phóng xạ chủ yếu là lode 125 hay thymidin [H3] phát ra tia alpha và beta. Tiến hành gắn kháng thể đặc hiệu lên pha rắn, sau đó lần lượt cho vào dịch sinh học chứa kháng nguyên định tìm và một lượng kháng nguyên cố định đã đánh dấu. Theo nguyên tắc cạnh tranh kháng nguyên đánh dấu sẽ thế vào chỗ kháng nguyên chưa đánh dấu và độ phóng xạ còn lại ở nước nổi càng thấp nếu kháng nguyên định tìm càng ít. Suy ra nồng độ kháng nguyên cần xác định. Khi so sánh với đồ thị chuẩn của một dung dịch kháng nguyên đã biết.

Qui trình kỹ thuật gồm có 17 bước cho định lượng Catecholamine nói chung và 3 bước tiếp theo cho phân tích nồng độ dopamin, 5 bước tiếp theo cho phân tích nồng độ Adrenaline và 5 bước cuối cùng cho phân tích nồng độ Noradrenaline. Cuối cùng là 8 bước hoàn thiện để định lượng được chất theo yêu cầu.

### \* Các bước chuẩn bị:

+ Các dụng cụ làm test: chất thử và mẫu vật phẩm để ở nhiệt độ phòng.

+ Chuẩn bị chất đệm rửa: hoà tan 50ml chất đệm rửa cô đặc với nước cất để đạt được 500 ml. Bảo quản dung dịch đệm rửa ở nhiệt độ 2-8°C.

+ Chuẩn bị dung dịch enzyme: Quan trọng là dung dịch enzyme phải được chuẩn bị ngay trước khi xét nghiệm (không quá 10-15 phút là được).

+ Chuẩn bị mẫu vật phẩm cô đặc và acylate:

### \* Các bước tiến hành cụ thể như sau:

- Bước 1. Dùng pipet lấy 20 µl dung dịch chuẩn, 20µl dung dịch chứng và 20µl dung dịch mẫu nước tiểu cho riêng vào từng 1 lọ nhỏ đã được cô đặc. Thêm 500µl nước cất vào các lọ này và chuẩn thể tích chính xác. Dùng pipet lấy 600µl mẫu vật phẩm huyết tương cho riêng vào từng lọ nhỏ để cô đặc dopamin.

Chú ý: để xác định dopamin trong huyết tương thêm vào chuẩn A/B là cần thiết.

- Bước 2. Dùng pipet lấy 50 µl chất đệm để thử cho vào tất cả các lọ nhỏ.

- Bước 3. Dùng pipet lấy 50 µl dịch chiết chất đệm cho vào tất cả các lọ nhỏ.

- Bước 4. Đậy phiến lá kim loại cho dính chặt miệng lọ lại và ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng đồng thời lắc xoay tròn đều (600-900 vòng/phút).

- Bước 5. Lấy phiến lá kim loại ra và bỏ đi. Gạn trực tiếp ngay ra một phiến kính mỏng và lấy phần chất lỏng còn lại bằng cách lật ngược phiến kính lên trên một khăn giấy.

- Bước 6. Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch rửa chất đệm đã cô đặc cho vào tất cả các lọ, đậy bằng một phiến lá kim loại cho dính chặt miệng lọ lại và ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng đồng thời lắc xoay tròn đều (600-900 vòng/phút).

- Bước 7. Lấy phiến lá kim loại ra và bỏ đi. Gạn trực tiếp ngay ra một phiến kính mỏng và lấy phần chất lỏng còn lại bằng cách lật ngược phiến kính lên trên một khăn giấy.

- Bước 8. Lặp lại bước 6, vớt bỏ và lấy phần chất lỏng còn lại bằng cách lật ngược phiến kính lên trên một khăn giấy.

- Bước 9. Dùng pipet lấy 150 μl axyl hoá chất đệm cho vào tất cả các lọ nhỏ.

- Bước 10. Dùng pipet lấy 25 μl axyl hoá thuốc thử cho vào tất cả các lọ nhỏ.

- Bước 11. Ủ bằng một phiến kính mỏng không có lá kim loại trong 15 phút ở nhiệt độ phòng đồng thời lắc xoay tròn đều (600-900 vòng/phút).

- Bước 12. Gạn trực tiếp ngay ra một phiến kính và lấy phần chất lỏng còn lại (xem bước 5).

- Bước 13. Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch rửa chất đệm đã cô đặc cho vào tất cả các lọ nhỏ.

- Bước 14. Ủ phiến kính mỏng với lá kim loại trong 10 phút ở nhiệt độ phòng đồng thời lắc xoay tròn đều (600-900 vòng/phút).

- Bước 15. Gạn trực tiếp ngay ra một phiến kính và lấy phần chất lỏng còn lại (xem bước 5).

- Bước 16. Dùng pipet lấy 200 μl acid hydrochloric cho vào tất cả các lọ để lấy dopamin.

- Bước 17. Đậy phiến kính với lá kim loại và dính chặt lại và ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng đồng thời lắc xoay tròn đều (600-900 vòng/phút). Lưu ý: không được gạn dung dịch nổi trên mặt tiếp theo nữa.

Tính dung tích tiếp theo là cần thiết cho xét nghiệm enzyme miễn dịch (Enzyme Immuno Assay-EIA).

Dopamin	
100 μl	

+ Xét nghiệm miễn dịch enzyme dopamin:

- Bước 1. Dùng pipet lấy 25 μl dung dịch enzyme tinh khiết được chuẩn bị cho vào tất cả các lọ nhỏ.

- Bước 2. Dùng pipet lấy 100 μl dung dịch chuẩn đã cô đặc, dung dịch chứng và lấy mẫu vật phẩm của bệnh nhân cho vào từng lọ nhỏ riêng biệt tương ứng.

- Bước 3. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng đồng thời lắc xoay tròn đều ở 400-500 vòng/phút.

- Bước 4. Dùng pipet lấy 50 μl dopamin kháng huyết thanh cho vào tất cả các lọ nhỏ.

- Bước 5. Ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng đồng thời lắc xoay tròn đều (400-500 vòng/phút).

- Bước 6. Loại bỏ hoặc hút các chất ra vừa phải trong lọ và rửa mỗi lọ bằng 300 μl chất đệm cô đặc. Lặp lại quá trình rửa này 2 lần. Thấm khô bằng cách lật ngược phiến kính lên trên một khăn mềm.

- Bước 7. Dùng pipet lấy 100 μl enzyme liên kết cho vào tất cả các lọ nhỏ.

- Bước 8. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng đồng thời lắc xoay tròn đều (400-500 vòng/phút).

- Bước 9. Hút/ loại bỏ và rửa sạch mỗi lọ 3 lần. Thấm khô bằng cách lật ngược phiến kính lên trên một miếng vải hút nước.

- Bước 10. Dùng pipet lấy 100 μl chất nền cho vào tất cả các lọ nhỏ.

- Bước 11. Ủ 20-30 phút nhiệt độ phòng đồng thời lắc xoay tròn đều (400-500 vòng/phút).

- Bước 12. Thêm 100 μl của dung dịch tạo lắng vào mỗi lọ và khuấy bằng que nhỏ để chúng trở thành một dung dịch thuần nhất.

- Bước 13. Đọc sự hấp thụ của dung dịch ở các lọ trong vòng 10 phút, sử dụng một đĩa rất nhỏ người đọc đặt từ bước sóng 450 nm và chuyển dần lên giữa bước sóng 620 nm và 650 nm.

\* **Tính kết quả:**

+ Nồng độ của chuẩn của dopamone:

- A = 0 ng/ml.

- D = 160 ng/ml.

- B = 10 ng/ml.

- E = 640 ng/ml.

- C = 40 ng/ml.

- F = 2,560 ng/ml.

+  $A/B = 2.5 \text{ ng/ml}$ .

+ Lưu ý: để xác định nồng độ plasma trong huyết tương, phải thêm chuẩn  $A/B$ .

Kết quả bước đầu nghiên cứu nồng độ Dopamin huyết thanh ở bệnh nhân tâm thần phân liệt thể paranoid.

Bảng 1. Nồng độ Dopamin huyết thanh ở các đối tượng nghiên cứu.

STT	Chỉ số		X (pg/ml)	CL (pg/ml)	SD (pg/ml)	SE (pg/ml)
	Kết quả	n				
1	Lần 1	71	28,69	26,71- 30,67	8,42	1,01
2	Lần 2	71	15,24	14,50- 15,98	3,17	0,38
3	Nhóm chứng	30	16,69	16,40- 16,98	3,98	0,14
P <sub>1-3</sub>			<0,001 (t <sub>1-3</sub> = 7,36)			
P <sub>2-3</sub>			>0,05 (t <sub>2-3</sub> = 0,89)			
P <sub>1-2</sub>			<0,001 (t <sub>1-2</sub> = 12,57)			

Chú thích: n = Số lượng mẫu; X = Trung bình cộng; CI = Khoảng tin cậy; SD = Độ lệch chuẩn; SE = Độ sai chuẩn.

Bảng 2. Mối liên quan giữa giới tính với nồng độ Dopamin huyết thanh ở bệnh nhân tâm thần phân liệt thể paranoid.

STT	Giới tính		Nam (n = 58)	Nữ (n = 37)
	Kết quả			
1	Lần 1 (X ± SD)		29,06 ± 8,78 pg/ml	29,02 ± 7,58 pg/ml
2	Lần 2 (X ± SD)		15,62 ± 2,92 pg/ml	15,81 ± 4,74 pg/ml
3	Nhóm chứng (X ± SD)		16,48 ± 16,39 pg/ml	16,92 ± 15,90 pg/ml
P <sub>1</sub> - P <sub>3</sub> =			<0,001 (t <sub>3-1</sub> = 3,08)	<0,01 (t <sub>3-1</sub> = 2,44)
P <sub>2</sub> - P <sub>3</sub> =			>0,05 (t <sub>3-2</sub> = 0,22)	>0,05 (t <sub>3-2</sub> = 0,22)
P <sub>1</sub> - P <sub>2</sub> =			<0,001 (t <sub>1-2</sub> = 3,54)	<0,01 (t <sub>1-2</sub> = 2,60)

**Bảng 3. Mối liên quan giữa lứa tuổi với nồng độ Dopamin huyết thanh ở bệnh nhân tâm thần phân liệt thể paranoid.**

S TT	Lứa tuổi Kết quả	≤ 20 tuổi	21-30 tuổi	31-40 tuổi	> 40 tuổi
		(n = 1)	(n = 20)	(n = 19)	(n = 31)
1	Lần 1 (X±SD) (pg/ml)	28,50± 5,10	29,01± 11,14	29,05± 7,24	29,06± 6,86
2	Lần 2 (X±SD) (pg/ml)	14,50± 2,11	15,84± 4,36	15,87± 4,91	15,80± 3,51
3	Nh.chứng (X±SD) (pg/ml)	16,69± 3,98	16,69± 3,98	16,69± 3,98	16,69± 3,98
	$p_1 - p_3 =$	<0,05 ( $t_{1-3} = 1,70$ )	<0,001 ( $t_{1-3} = 3,12$ )	<0,001 ( $t_{1-3} = 3,77$ )	<0,001 ( $t_{1-3} = 3,68$ )
	$p_2 - p_3 =$	>0,05 ( $t_{2-3} = 0,24$ )	>0,05 ( $t_{2-3} = 0,30$ )	>0,05 ( $t_{2-3} = 0,29$ )	>0,05 ( $t_{2-3} = 0,33$ )
	$p_1 - p_2 =$	<0,001 ( $t_{1-2} = 4,82$ )	<0,001 ( $t_{1-2} = 3,14$ )	<0,001 ( $t_{1-2} = 3,90$ )	<0,001 ( $t_{1-2} = 4,03$ )

#### **KẾT LUẬN:**

+ Phương pháp định lượng nồng độ Dopamin huyết thanh thông dụng hiện nay bằng phương pháp miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc miễn dịch enzyme (EIA) hay ELISA.

+ Kết quả bước đầu xác định nồng độ Dopamin huyết thanh ở bệnh nhân tâm thần phân liệt thể paranoid đã thể hiện đầy đủ khả năng làm chủ được xét nghiệm này.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO:**

1. Nguyễn Đình Chúc, Ngô Tuấn Kỳ (1984), "Các thông số và hằng số thực nghiệm về sắc ký và điện di". *Sách tra cứu hoá sinh tập IV*, Nxb. Khoa học-Kỹ thuật, Hà Nội.

2. Nguyễn Văn Ngân (1992), *Khảo sát hàm lượng một số nguyên tố vi lượng ở tóc người bình thường và bệnh nhân tâm thần phân liệt (lứa tuổi 18-35)*, Luận án PTS Khoa học Y-Dược, Học viện Quân y.

3. Nguyễn Văn Siêm (1996), *Nghiên cứu dịch tễ lâm sàng bệnh Tâm thần phân liệt tại cộng đồng*, Luận án phó tiến sĩ khoa học y dược, Hà Nội, tr. 136.

4. Nguyễn Viết Thiêm, Trần Viết Nghị, Lã Thị Bưởi và cs (2001), *Bệnh học tâm thần (phần nội sinh)*. Trường Đại học Y Hà Nội, tr. 5-26.

Lê Đức Trình (1998), "Hormon", Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 135-137.