

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



TRỊNH THỊ QUẾ

**NGHIÊN CỨU MỐI LIÊN QUAN GIỮA NỒNG ĐỘ FOLAT,
HOMOCYSTEIN HUYẾT THANH VÀ MỘT SỐ ĐA HÌNH GEN
MTHFR Ở PHỤ NỮ CÓ BẤT THƯỜNG SINH SẢN**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2021

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



TRỊNH THỊ QUẾ

**NGHIÊN CỨU MỐI LIÊN QUAN GIỮA NỒNG ĐỘ FOLAT,
HOMOCYSTEIN HUYẾT THANH VÀ MỘT SỐ ĐA HÌNH GEN
MTHFR Ở PHỤ NỮ CÓ BẤT THƯỜNG SINH SẢN**

Chuyên ngành : Hóa sinh Y học

Mã số: 62720112

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. GS.TS. Tạ Thành Văn
2. TS. Đoàn Thị Kim Phượng

HÀ NỘI – 2021

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, trước hết, tôi xin bày tỏ lòng tri ân sâu sắc tới GS. TS. Tạ Thành Văn, Chủ tịch Hội đồng Trường, Trưởng Bộ môn Hóa sinh Trường Đại học Y Hà Nội và TS. BS. Đoàn Thị Kim Phượng, Phó chủ nhiệm Bộ môn Y sinh học - Di truyền, PGĐ Trung tâm Di truyền lâm sàng và hệ gen, Trường Đại học Y Hà Nội, những người thầy đã tận tụy giúp đỡ, động viên và hướng dẫn tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo Sau Đại Học, cùng toàn thể quý Thầy Cô, cán bộ trong Bộ môn Hóa Sinh, Trường Đại học Y Hà Nội đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến các Thầy Cô, các bác sỹ nội trú tại Bộ môn Y sinh học – Di Truyền, Trường Đại học Y Hà Nội đã giúp đỡ tôi trong việc thu thập và phân tích mẫu tại bộ môn.

Đồng thời, tôi cũng bày tỏ lòng biết ơn đến Ban Giám Đốc, các cán bộ tại Trung tâm xét nghiệm Bệnh viện đa khoa MEDLATEC đã hỗ trợ giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Xin được gửi lời cảm ơn đến các đối tượng tham gia nghiên cứu cùng gia đình của họ đã giúp tôi có được số liệu trong luận án này.

Cuối cùng, tôi xin ghi nhớ công ơn sinh thành, nuôi dưỡng và tình yêu thương của bố mẹ cùng sự ủng hộ, động viên của chồng, hai con và các anh chị em trong gia đình, những người đã luôn ở bên tôi, là chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận án.

Xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày tháng 6 năm 2021

Học viên

Trịnh Thị Quế

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là **Trịnh Thị Quế**, nghiên cứu sinh Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Hóa sinh Y học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của **GS.TS. Tạ Thành Văn và TS. Đoàn Thị Kim Phượng**
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 tháng 6 năm 2021

Tác giả luận án

Trịnh Thị Quế

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên viết tắt	Ý nghĩa
APC	Activated Protein C	Protein C hoạt hóa
AUC	Area Under Cuver	Diện tích dưới đường cong
BAC	Balanced Accuracy	Độ chính xác cân bằng
BM	Bookmarker informedness	Dự đoán cân đối giữa độ nhạy và độ đặc hiệu
BTSS		Bất thường sinh sản
CI	Confidence Interval	Khoảng tin cậy
CMIA	Chemiluminescent Microparticle Immunoassay	Miễn dịch hóa phát quang
Cs		Cộng sự
CV	Coefficient of Variation	Hệ số biến thiên
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide	
Hb	Hemoglobin	
Hct	Hematocrit	
Hcy	Homocystein	Là một acid amin chứa lưu huỳnh.
IgF1	Insulin-like Growth Factor -1	Yếu tố tăng trưởng giống Insulin
Lox1	Lectin like Oxidized LDL receptor-1	Thụ thể LDL-1 bị oxy hóa
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin	Lượng Hb trung bình hồng cầu
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration	Nồng độ Hb trung bình hồng cầu

MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein 1	Chất gây xơ vữa động mạch
MCV	Mean Corpuscular Volume	Thể tích trung bình của một hồng cầu
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate reductase	Là enzym tham gia trong quá trình chuyển hóa Hcy
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm thông tin về công nghệ sinh học quốc gia Mỹ
NNC		Nhóm nghiên cứu
NPV	Negative Predictive Value	Giá trị dự đoán âm tính
OR	Odds Ratio	Tỷ suất chênh
PKC	Protein Kinase C	Enzym chuyển hóa Proteine
PPV	Positive Predictive Value	Giá trị dự đoán dương tính
ROC	Receiver Operating Characteristic	Đồ thị biểu diễn tỷ lệ dương tính đúng dựa trên tỷ lệ dương tính sai tại các ngưỡng khác nhau
RPL	Recurrent Pregnancy Loss	Mất thai tái phát
SD	Standard Deviation	Độ lệch chuẩn
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms	Đa hình đơn nucleotide
SPC	Speccificity	Độ đặc hiệu
TCYTTG		Tổ chức Y tế thế giới
TGF	Transforming Growth Factor	Yếu tố thay đổi tăng trưởng
TNF	Tumor Necrosis Factor	Yếu tố hoại tử khối u
TPO-Ab	Thyroperoxidase Antibodies	Kháng thể kháng tuyến giáp
TPR	True Positive Rate (sensitivity)	Tỷ lệ dương tính đúng (độ nhạy)

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1: TỔNG QUAN	3
1.1. Tổng quan về bất thường sinh sản	3
1.1.1. Vô sinh	3
1.1.2. Các bất thường thai sản.....	3
1.1.3. Nguyên nhân của bất thường sinh sản	9
1.1.4. Cơ chế liên quan đến bất thường sinh sản	12
1.2. Vai trò của homocystein, folat và đa hình gen MTHFR.....	16
1.2.1. Vai trò của homocystein	16
1.2.2. Vai trò của folat	22
1.2.3. Đa hình gen MTHFR	26
1.3. Các phương pháp định lượng nồng độ homocystein, folat và xác định đa hình gen MTHFR	30
1.3.1. Các phương pháp định lượng nồng độ Hcy.....	30
1.3.2. Các phương pháp xét nghiệm folat.....	32
1.3.3. Các phương pháp phát hiện đa hình gen MTHFR.....	33
1.4. Các nghiên cứu về mối liên quan giữa homocystein, folat và đa hình gen MTHFR.....	35
1.4.1. Các nghiên cứu về mối liên quan giữa nồng độ homocystein, folat huyết thanh và đa hình gen MTHFR ở người khỏe mạnh	35
1.4.2. Các nghiên cứu về mối liên quan giữa nồng độ Hcy, folat và đa hình gen MTHFR ở phụ nữ có bất thường sinh sản	36
1.4.3. Các nghiên cứu về mối liên quan giữa nồng độ Hcy, folat huyết thanh	

và đa hình gen MTHFR ở một số bệnh lý khác..... 38

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU40

2.1. Đối tượng nghiên cứu	40
2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng nghiên cứu	40
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ.....	40
2.1.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu	41
2.2. Phương pháp nghiên cứu	41
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu	41
2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu.....	41
2.3. Thu thập mẫu và biến số nghiên cứu	44
2.3.1. Các bước tiến hành	44
2.3.2. Biến số nghiên cứu.....	45
2.4. Trang thiết bị, dụng cụ và hóa chất nghiên cứu.....	46
2.4.1. Trang thiết bị, dụng cụ.....	46
2.4.2. Hóa chất	46
2.5. Quy trình kỹ thuật	47
2.5.1. Quy trình xét nghiệm Hcy, folat	47
2.5.2. Kiểm soát chất lượng và báo cáo kết quả	48
2.5.3. Phát hiện đa hình gen MTHFR.....	49
2.6. Xử lý và phân tích số liệu	52
2.6.1. Xử lý số liệu.....	52
2.6.2. Xây dựng ngưỡng cắt tối ưu cho chẩn đoán tăng nồng độ homocystein và folat huyết thanh	52
2.7. Xây dựng mô hình tiên lượng	53
2.8. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu	53
2.9. Các biện pháp tránh sai số	54

2.10. Sơ đồ nghiên cứu	54
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	56
3.1. Đặc điểm của nhóm đối tượng nghiên cứu	56
3.2. Nồng độ homocystein, folat huyết thanh và đa hình gen MTHFR.....	57
3.2.1. Nồng độ homocystein và folat huyết thanh ở nhóm nghiên cứu....	57
3.2.2. Đánh giá đa hình gen MTHFR	57
3.2.3. Đa hình gen MTHFR trên đối tượng nghiên cứu	65
3.3. Mối tương quan giữa nồng độ Hcy và folat huyết thanh theo đa hình gen MTHFR.....	71
3.3.1. So sánh nồng độ Hcy theo các đa hình gen MTHFR	71
3.3.2. So sánh nồng độ folat theo các đa hình gen MTHFR.....	72
3.3.3. Mối tương quan giữa nồng độ Hcy và folat với tổ hợp đa hình 2 vị trí C677T và A1298C trên gen MTHFR	72
3.3.4. Mối tương quan nồng độ Hcy và folat huyết thanh.....	74
3.3.5. Đánh giá mô hình nghiên cứu.....	75
Chương 4: BÀN LUẬN	88
4.1. Nồng độ folat, homocystein huyết thanh ở bệnh nhân có tiền sử thai chết lưu tái diễn.....	90
4.2. Sự liên quan giữa nồng độ folat, homocystein huyết thanh và đa hình gen MTHFR ở bệnh nhân có tiền sử thai chết lưu tái diễn.....	113
KHUYẾN NGHỊ	126
HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO.....	127
CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ...	128
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Quy định về thai chết lưu ở một số nước.....	5
Bảng 2.1:	Hàng số C liên quan đến sai sót loại I và II	42
Bảng 2.2:	Ước tính cỡ mẫu theo đa hình gen liên quan đến thai chết lưu tái phát theo mức sai sót loại I và II	42
Bảng 2.3:	Ước tính cỡ mẫu theo sự biến thiên của homocystein liên quan đến sảy thai và/hoặc thai chết lưu tương ứng với các mức sai sót loại I và II.....	43
Bảng 2.4.	Kết quả tính cỡ mẫu tương ứng cho mỗi nhóm với mức α , β	43
Bảng 2.5.	Thành phần phản ứng	49
Bảng 2.6.	Chu kỳ nhiệt của phản ứng realtime PCR.....	49
Bảng 2.7.	Trình tự môi của phản ứng sequencing.....	51
Bảng 2.8.	Chu kỳ nhiệt của sequencing	51
Bảng 3.1.	Đặc điểm về tuổi của nhóm nghiên cứu.....	56
Bảng 3.2.	So sánh nồng độ Hcy và folat huyết thanh theo tuổi	56
Bảng 3.3.	So sánh kết quả Hcy và folat của nhóm bệnh và nhóm chứng	57
Bảng 3.4.	Tỷ lệ xuất hiện của alen C và T vị trí 677	65
Bảng 3.5.	Phân bố kiểu gen MTHFR C677T trong nhóm nghiên cứu	65
Bảng 3.6.	Nguy cơ thai chết lưu tái diễn theo đa hình gen MTHFR vị trí 677 ...	66
Bảng 3.7.	Tỷ lệ xuất hiện alen C ở vị trí 1298	68
Bảng 3.8.	Phân bố kiểu gen MTHFR A1298C trong nhóm nghiên cứu.....	68
Bảng 3.9.	Nguy cơ có bệnh theo đa hình MTHFR vị trí 1298.....	69
Bảng 3.10.	Ảnh hưởng của đa hình gen khi kết hợp cả 2 vị trí đa hình trên gen MTHFR.....	70
Bảng 3.11.	Nồng độ Hcy ($\mu\text{mol/L}$) theo các đa hình gen MTHFR.....	71
Bảng 3.12.	Nồng độ folat (ng/mL) theo các đa hình gen MTHFR.....	72

Bảng 3.13.	So sánh nồng độ Hcy và folae huyết thanh theo các tổ hợp đồng hợp tử kiểu đại và dị hợp tử kép.....	72
Bảng 3.14.	So sánh nồng độ homocystein và folat huyết thanh theo tổ hợp gen dị hợp tử kép và đa hình đồng hợp tử kép	73
Bảng 3.15.	So sánh nồng độ homocystein và folae huyết thanh theo tổ hợp gen đồng hợp tử kiểu đại kép với đa hình đồng hợp tử kép.....	73
Bảng 3.16.	Đặc điểm của đối tượng nghiên cứu.....	75
Bảng 3.17.	Xác định ngưỡng cắt tối ưu theo d-distance, BM, F1 score, BAC.....	79
Bảng 3.18.	Xác định mô hình tối ưu dựa trên các biến nghiên cứu.....	82
Bảng 3.19.	Đánh giá tỷ suất chênh OR của các biến trong mô hình	85

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1.	Đánh giá nguy cơ có thai chết lưu theo các đa hình MTHFR vị trí 677	67
Biểu đồ 3.2.	Đánh giá nguy cơ có tình trạng thai chết lưu theo các đa hình MTHFR vị trí 1298.....	69
Biểu đồ 3.3.	Đánh giá tương quan giữa nồng độ Hcy và folat ở nhóm chứng .	74
Biểu đồ 3.4.	Đánh giá tương quan giữa nồng độ Hcy và folat ở nhóm bệnh ...	74
Biểu đồ 3.5.	Phân bố nồng độ Hcy giữa nhóm bệnh và nhóm chứng	76
Biểu đồ 3.6.	Phân bố kết quả xét nghiệm theo nhóm bệnh và nhóm chứng với phân bố đồ thị logistic.....	77
Biểu đồ 3.7.	Lựa chọn ngưỡng cắt tối ưu	78
Biểu đồ 3.8.	Biểu đồ ROC cho dự đoán nguy cơ có bệnh bằng nồng độ Hcy .	80
Biểu đồ 3.9.	Xác định giá trị ngoại lai bằng mô hình đơn biến bằng Cook's Distance.....	81
Biểu đồ 3.10.	Đánh giá chất lượng mô hình với đường cong ROC	83
Biểu đồ 3.11.	Xác định giá trị ngoại lai bằng mô hình đa biến bằng Cook's Distance.....	83
Biểu đồ 3.12.	Đánh giá chất lượng với chỉ số hat-values và studentized Residuals	84
Biểu đồ 3.13.	Biểu đồ Nomogram cho mô hình dự báo nguy cơ thai chết lưu tái diễn	86

DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 1.1.	Chuyển hóa của homocystein.....	18
Sơ đồ 2.1.	Thiết kế nghiên cứu.....	55

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Cấu trúc 2 và 3 chiều của Homocystein.....	16
Hình 1.2.	Cơ chế stress oxy hóa của Hcy	19
Hình 1.3.	Nồng độ homocystein và con đường đông máu.....	20
Hình 1.4.	Cơ chế gây xơ vữa động mạch của homocystein	22
Hình 1.5.	Các dạng cấu trúc của acid folic	23
Hình 1.6.	Sự hấp thu Folat trong cơ thể	24
Hình 1.7.	Chu trình folat trong chuyển hóa methionin	25
Hình 1.8.	Vị trí phân tử của gen MTHFR trên nhiễm sắc thể số 1.....	26
Hình 1.9.	Cấu trúc gen MTHFR và các protein được tổng hợp từ gen MTHFR	27
Hình 2.1.	Mô phỏng các bước trong quy trình xét nghiệm Hcy và folat ..	48
Hình 2.2.	Các tiêu chí để xây dựng ngưỡng cắt cho nồng độ Hcy, folat ..	53
Hình 3.1.	Chứng âm không có DNA	58
Hình 3.2.	Kết quả chứng kiểu gen MTHFR 677CC	58
Hình 3.3.	Kết quả chứng kiểu gen MTHFR 1298AA.....	59
Hình 3.4.	Kết quả chứng dị hợp tử gen MTHFR 677CT	59
Hình 3.5.	Kết quả chứng dị hợp tử gen MTHFR 1298AC	60
Hình 3.6.	Kết quả chứng đồng hợp tử gen MTHFR 677TT	60
Hình 3.7.	Kết quả chứng đồng hợp tử gen MTHFR 1298CC	61
Hình 3.8.	Hình ảnh realtime PCR (bên trái) và giải trình tự của kiểu gen 1298AA (bên phải) của cùng mẫu đối tượng nhóm chứng số 12 ..	62
Hình 3.9.	Hình ảnh realtime PCR (bên trái) và giải trình tự của kiểu gen 1298CC (bên phải) của cùng mẫu đối tượng nhóm chứng số 20..	62
Hình 3.10.	Hình ảnh realtime PCR (bên trái) và giải trình tự của kiểu gen 677TT (bên phải) của cùng mẫu đối tượng nhóm chứng số 12....	63

- Hình 3.11. Hình ảnh realtime PCR (bên trái) và giải trình tự của kiểu gen 677CC (bên phải) của cùng mẫu đối tượng nhóm bệnh số 56..63
- Hình 3.12. Hình ảnh realtime PCR (bên trái) và giải trình tự của kiểu gen 1298AC (bên phải) của cùng mẫu đối tượng nhóm bệnh số 58...64
- Hình 3.13. Hình ảnh realtime PCR (bên trái) và giải trình tự của kiểu gen 677CT (bên phải) của cùng mẫu đối tượng nhóm bệnh số 58..64

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bất thường sinh sản (BTSS) bao gồm các tình trạng có ảnh hưởng không tốt đến việc sinh ra một đứa trẻ khỏe mạnh. Theo hướng dẫn quốc gia về các dịch vụ chăm sóc sức khỏe sinh sản thì các bất thường sinh sản bao gồm các bất thường về thai nghén, chuyển dạ và sinh đẻ.¹ Có rất nhiều nguyên nhân gây bất thường sinh sản như: do rối loạn vật chất di truyền, do các tác nhân vật lý, hóa học, sinh học tác động từ môi trường, do cơ thể bố mẹ....^{2,3} trong đó nguyên nhân do rối loạn vật chất di truyền vẫn là phức tạp và khó xác định nhất.⁴

Các bất thường sinh sản gây ra nhiều hậu quả nặng nề cho sức khỏe, tâm lý người mẹ, cho gia đình và cho cả xã hội. Do đó việc tìm ra nguyên nhân, cách phòng tránh và khắc phục các bất thường sinh sản nói trên luôn là vấn đề được quan tâm, nghiên cứu. Cơ chế gây bất thường sinh sản phụ thuộc vào các nguyên nhân như: các nguyên nhân từ phôi hoặc thai thường do rối loạn về vật chất di truyền, các nguyên nhân từ mẹ thường có cơ chế như: rối loạn nội tiết⁵⁻⁷, cơ chế miễn dịch⁸ hay cơ chế huyết khối làm tắc mạch máu nuôi dưỡng thai.^{9,10} Các yếu tố liên quan đến cơ chế huyết khối đã được biết đến như tăng nồng độ homocystein (Hcy) huyết thanh hay một số yếu tố di truyền bao gồm sự thiếu hụt antithrombin, protein C và protein S, các yếu tố đột biến gen V Leiden, yếu tố II (G20210A) hoặc gen MTHFR.¹⁰

Gen Methylene Tetra Hydro Folate Reductase (MTHFR) là một gen nằm ở vùng 36.3 trên nhánh ngắn nhiễm sắc thể số 1. Đa hình gen MTHFR thường xảy ra tại hai vị trí 677 và 1298.¹¹ Trong một số nghiên cứu quần thể người da trắng, tần suất của đa hình dị hợp tử 677CT thường xảy ra ở khoảng 35% dân số, đa hình đồng hợp tử 677TT là khoảng 5-10% dân số. Đa hình đồng hợp tử của 1298CC xảy ra ở 9% dân số.¹² Gen MTHFR sản xuất enzym MTHFR xúc tác quá trình chuyển hóa Hcy thành methionin. Enzym này có tác dụng xúc tác chuyển 5,10-

methylene THF thành 5-methyl THF. 5-methyl THF hoạt động như chất trung gian để chuyển homocystein thành methionin.¹³ Vì vậy, khi gen MTHFR bị biến đổi, homocystein không được chuyển hóa dẫn đến nồng độ tăng cao trong máu. Nồng độ homocystein tăng cao trong máu được xem là nguyên nhân gây xơ vữa, hẹp lòng động mạch, gây tắc mạch, huyết khối, tăng hình thành cục máu đông.¹⁴ Việc tăng hình thành huyết khối xảy ra ở vi mạch tiếp nối giữa nhau thai và thành tử cung sẽ gây bất thường thai sản như sẩy thai, thai chết lưu.¹⁴ Bên cạnh đó, nồng độ homocystein tăng cao có thể được hạn chế bởi vai trò của folat.¹⁵ Nồng độ cao folat dẫn tới việc tăng ái lực với cofactor FAD,¹⁶ ngăn ngừa chứng tăng homocystein. Folat là một loại vitamin cần thiết để hình thành nên tế bào mới và còn giúp cho sự phân chia tế bào,¹⁷ vì vậy thiếu folat thường liên quan với các bất thường cấu trúc trong quá trình phát triển phôi thai.

Từ những nghiên cứu định hướng về vai trò của gen MTHFR liên quan đến nồng độ homocystein và folat, câu hỏi đặt ra là nồng độ homocystein, folat huyết thanh và đa hình gen MTHFR trong cơ thể mẹ có liên quan đến nguy cơ bất thường sinh sản và dị tật bẩm sinh hay không? Câu trả lời sẽ rất có ý nghĩa trong: dự đoán nguyên nhân bất thường sinh sản như sẩy thai, thai chết lưu, thai dị tật ống thần kinh; trong việc điều trị chứng tăng đông máu gây bất thường thai sản; và trong dự phòng nguy cơ bất thường thai sản.

Với những lý do và lợi ích của các xét nghiệm gen MTHFR, folat và homocystein, đề tài: **“Nghiên cứu mối liên quan giữa nồng độ folat, homocystein huyết thanh và một số đa hình gen MTHFR ở phụ nữ có bất thường sinh sản”** được thực hiện với mục tiêu:

1. *Xác định nồng độ homocystein, folat huyết thanh và đa hình gen MTHFR ở phụ nữ có tiền sử thai chết lưu tái diễn.*
2. *Đánh giá mối liên quan giữa nồng độ homocystein, folat huyết thanh và tính đa hình gen MTHFR trong dự báo nguy cơ thai chết lưu.*

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về bất thường sinh sản

Bất thường sinh sản bao gồm vô sinh và bất thường thai sản. Bất thường thai sản thường biểu hiện ở các dạng bệnh lý như sảy thai sớm hoặc sảy thai muộn, thai chết lưu, thai trứng, chửa ngoài tử cung, thai chậm phát triển trong tử cung, đẻ non, sơ sinh nhẹ cân, thai già tháng, dị tật bẩm sinh, chết sơ sinh, ...¹⁸

1.1.1. Vô sinh

Định nghĩa: Vô sinh là bệnh của hệ thống sinh dục nam hoặc nữ được xác định là không đạt được mục đích mang thai sau 12 tháng quan hệ tình dục thường xuyên không được bảo vệ.¹⁹

Vô sinh nam chiếm khoảng 20% các cặp vợ chồng vô sinh. Thăm dò các nguyên nhân vô sinh ở nam giới cũng rất hạn chế, xét nghiệm tinh dịch đồ gần như là thăm dò duy nhất để đánh giá khả năng sinh sản của nam giới.²⁰

Vô sinh nữ được chia làm 2 nhóm: nguyên phát và thứ phát.²⁰

- Vô sinh nguyên phát (vô sinh I): hai vợ chồng chưa bao giờ có thai, mặc dù đã sống với nhau trên một năm và không dùng biện pháp tránh thai nào.

- Vô sinh thứ phát (vô sinh II): hai vợ chồng trước kia đã có con hoặc đã có thai, nhưng sau đó không thể có thai lại mặc dù đang sống với nhau trên một năm và không dùng biện pháp tránh thai nào.

1.1.2. Các bất thường thai sản

1.1.1.1. Sảy thai

Có nhiều quan niệm về sảy thai khác nhau tùy theo từng nước, chủ yếu khác nhau về quy định đối với thời gian mang thai. Theo Tổ chức Y tế thế giới (TCYTTG), sảy thai là hiện tượng kết thúc quá trình thai nghén một cách tự nhiên trước khi thai nhi đạt tới độ tuổi có thể sống bên ngoài tử cung; đó là sự

trục xuất hoặc tổng ra của phôi thai hoặc thai nhi có trọng lượng < 500 gam (tương ứng với tuổi thai < 22 tuần).²¹ Theo hướng dẫn của Bộ Y tế về các dịch vụ chăm sóc sức khỏe sinh sản của Việt Nam, sảy thai là trường hợp thai và rau bị tổng ra khỏi buồng tử cung trước 22 tuần (kể từ ngày đầu của kỳ kinh cuối)¹ và hướng dẫn chẩn đoán và điều trị các bệnh sản phụ khoa, sảy thai là hiện tượng kết thúc thai nghén trước khi thai có thể sống được. Với khái niệm này, sảy thai được định nghĩa là trường hợp thai bị tổng ra khỏi buồng tử cung trước 22 tuần hay cân nặng của thai dưới 500g.²² Như vậy, đối với thời gian mang thai, Việt Nam áp dụng định nghĩa của TCYTTG.

Sảy thai được chia ra các thể lâm sàng như sau:²³

- Sảy thai hoàn toàn: người bệnh có dấu hiệu của có thai và đã sảy hoàn toàn ra ngoài. Siêu âm buồng tử cung sạch.

- Sảy thai không hoàn toàn: người bệnh có dấu hiệu của có thai và đang sảy thai. Sau khi thấy thai ra rồi vẫn còn đau bụng, còn ra máu kéo dài. Khám cổ tử cung mở và tử cung còn to. Siêu âm có hình ảnh âm vang không đồng nhất trong buồng tử cung.

- Sảy thai đã chết: người bệnh có dấu hiệu của có thai. Có dấu hiệu của thai chết lưu: giảm nghén, ra máu đen kéo dài, khám thấy tử cung nhỏ hơn tuổi thai, siêu âm thấy hình ảnh túi ối méo mó không có âm vang phôi hay có phôi thai nhưng không thấy hoạt động của tim thai. Có dấu hiệu của dọa sảy thai, đang sảy thai, sảy thai hoàn toàn hay không hoàn toàn.

- Sảy thai liên tiếp: là hiện tượng có từ 2 lần sảy thai liên tục trở lên, thai nhi bị tổng xuất khỏi buồng tử cung trước 22 tuần. Nguy cơ thay đổi tùy theo số lần sảy thai, đã từng sinh con còn sống và có con bị dị tật hay không.

1.1.1.2. Thai chết lưu

Có nhiều quan niệm về thai chết lưu khác nhau tùy theo từng nước, chủ yếu khác nhau về quy định đối với thời gian mang thai và trọng lượng thai.

Theo TCYTTG, thai chết lưu là thai chết trước khi bị đưa ra hoàn toàn

khỏi người mẹ không phân biệt thời gian mang thai.²¹ Ba tiêu chuẩn để chẩn đoán thai chết lưu là: trọng lượng thai, tuổi thai và chiều dài cơ thể thai. TCYTTG cũng chia làm 2 nhóm: thai chết lưu sớm bao gồm: trọng lượng thai tối thiểu 500 gam, tuổi thai ≥ 22 tuần và chiều dài thai đo từ đỉnh đầu đến gót chân ít nhất 25 cm.²³ Thai chết lưu muộn có trọng lượng ≥ 1000 gam hoặc ≥ 28 tuần tuổi và chiều dài cơ thể ≥ 35 cm.²³

Theo Nguyễn Đức Hình và cộng sự năm 2013²⁴ và theo hướng dẫn của Bộ Y tế về việc chẩn đoán và điều trị các bệnh sản phụ khoa, thai chết lưu trong tử cung là tất cả các trường hợp thai bị chết mà lưu trong buồng tử cung trên 48 giờ.¹⁹ Vì các mục đích so sánh và khả năng chăm sóc sơ sinh, các định nghĩa có tính pháp lý về thai chết lưu ở các quốc gia rất khác nhau, thường yêu cầu ghi nhận trường hợp thai chết lưu ở một số độ tuổi thai nào đó (12, 16, 20, 22, 24, 26 hoặc 28 tuần) và cân nặng (350, 400, 500, hoặc 1000 gam). Ngay cả ở một nước, ví dụ ở các tiểu bang Hoa Kỳ có nhiều định nghĩa thai chết lưu khác nhau trên cơ sở kết hợp giữa tuổi thai và trọng lượng thai. Hầu hết các tiểu bang báo cáo thai chết lưu quy định từ tuần thứ 20 và trọng lượng từ 350g trở lên, tuy nhiên một số tiểu bang báo cáo thai chết lưu ở tất cả các thời kỳ mang thai.^{25,26}

Bảng 1.1. Quy định về thai chết lưu ở một số nước

Nước	Tuổi thai	Trọng lượng thai
Đức ²⁷	Không quy định	≥ 500 gam
Na Uy ²⁸	≥ 12 tuần	Không quy định
Hà Lan ²⁷	≥ 16 tuần	Không quy định
Úc ²⁸	≥ 20 tuần	Hoặc ≥ 400 gam
Mỹ ²⁵	≥ 20 tuần	≥ 350 gam
Canada ²⁹	≥ 20 tuần	Hoặc ≥ 500 gam
Pháp ²⁷	≥ 22 tuần	Hoặc ≥ 500 gam
Hungary ²⁷	≥ 24 tuần	Hoặc ≥ 500 gam
Ý ²⁷	≥ 180 ngày	Không quy định
Tây Ban Nha ²⁷	≥ 26 tuần	Không quy định
Thụy Điển ²⁷	≥ 28 tuần	Không quy định

Tại Việt Nam

Thai chết lưu được chia làm 2 nhóm:²²

❖ Thai chết lưu dưới 20 tuần: nhiều trường hợp không có triệu chứng làm cho phát hiện muộn, một số trường hợp người bệnh thấy bụng bé đi hoặc không to lên dù mất kinh đã lâu.

- Bệnh cảnh lâm sàng hay gặp:

+ Người bệnh đã có dấu hiệu của có thai như chậm kinh, hCG dương tính, siêu âm đã thấy có thai và hoạt động của tim thai.

+ Ra máu âm đạo: máu ra tự nhiên, ít một, máu đỏ sẫm hay nâu đen.

+ Đau bụng: thường không đau bụng, chỉ đau bụng khi dọa sảy hay đang sảy thai lưu.

- Cận lâm sàng:

+ Nồng độ β hCG: thấp hơn so với tuổi thai hay tốc độ tăng của β hCG không theo qui luật của thai sống.

+ Siêu âm: là thăm dò có giá trị, cho chẩn đoán sớm và chính xác: hoặc có thể thấy âm vang thai rõ ràng mà không thấy hoạt động tim thai. Hình ảnh túi ối rộng (chỉ nhìn thấy túi ối mà không thấy âm vang thai), túi ối rộng với bờ méo mó, không đều. Trong trường hợp nghi ngờ, nên kiểm tra lại sau 1 tuần để xem tiến triển của túi ối; hoặc có âm vang thai mà không thấy hoạt động tim thai.

❖ Thai chết lưu trên 20 tuần: triệu chứng thường rõ ràng làm người bệnh phải đi khám ngay.

- Bệnh cảnh lâm sàng:

+ Người bệnh không thấy thai cử động nữa, không thấy bụng to lên, thậm chí bé đi (nếu thai đã chết lâu ngày).

+ Hai vú tiết sữa non.

+ Ra máu âm đạo: hiếm gặp.

+ Đau bụng: khi chuẩn bị sảy, đẻ thai lưu.

+ Nếu người bệnh bị một số bệnh kèm theo như nghén nặng, tiền sản giật, bệnh tim... thì bệnh tự thuyên giảm, người bệnh cảm thấy dễ chịu hơn.

- Cận lâm sàng

+ Siêu âm: không thấy hoạt động của tim thai. Đầu thai méo mó, có thể thấy hiện tượng chùng khớp sọ hay dấu hiệu hai vòng ở xương sọ do da đầu bị bong ra. Nước ối ít hay hết ối.

+ Định lượng Fibrinogen trong máu: đánh giá ảnh hưởng của thai đến quá trình đông máu.

*1.1.1.3. Thai chậm phát triển trong tử cung*²⁰

Khái niệm: thai nhẹ cân là khi thai đủ tháng, trọng lượng thai lúc sinh dưới 2500 gram. Trong thực tế, khái niệm thai chậm phát triển trong tử cung bao gồm trọng lượng thai tại thời điểm thăm khám và sự phát triển của thai. Để xác định thai thực sự có chậm phát triển hoặc ngừng phát triển thì phải đo kích thước và ước lượng trọng lượng thai ở ít nhất 2 lần thăm khám liên tiếp cách nhau 01 tuần.

*1.1.1.4. Tiền sản giật – sản giật*²⁰

Tiền sản giật, sản giật là biến chứng nội khoa thường gặp nhất ở phụ nữ mang thai với tỉ lệ từ 2% - 8%. Triệu chứng thường gặp là phù, tăng huyết áp và protein niệu. Đây là một trong những nguyên nhân chính gây tử vong cho mẹ và thai. Theo dõi và quản lý thai nghén, điều trị thích hợp tiền sản giật, sản giật nhằm giảm biến chứng nặng nề cho mẹ và thai.

*1.1.1.5. Dọa đẻ non, đẻ non*²⁰

Định nghĩa: theo TCYTTG, đẻ non là cuộc chuyển dạ xảy ra từ tuần thứ 22 đến trước tuần 37 của thai kỳ tính theo kinh cuối cùng. Sơ sinh non tháng có tỷ lệ tử vong và mắc bệnh cao hơn rất nhiều so với trẻ đẻ đủ tháng, nguy cơ cao bị di chứng thần kinh với tỷ lệ 1/3 trước tuần 32, giảm xuống 1/10 sau 35 tuần. Dự phòng và điều trị dọa đẻ non - đẻ non luôn là một vấn đề quan trọng đối với sản khoa, sơ sinh và toàn xã hội.

Tại Việt nam, chưa có thống kê trên toàn quốc, nhưng theo những nghiên

cứ đơn lẻ, tỷ lệ đẻ non khoảng 8-10%.

1.1.1.6. Dị tật bẩm sinh

Dị tật bẩm sinh là những bất thường về cấu trúc, chức năng bao gồm cả các rối loạn chuyển hóa có mặt lúc mới sinh. Về mặt lâm sàng, dị tật bẩm sinh có thể phát hiện ngay từ lúc sinh hoặc có thể được chẩn đoán muộn hơn.² Dị tật bẩm sinh xảy ra khoảng 3% trẻ sơ sinh. Nếu không được can thiệp phẫu thuật khoảng 1/3 số trẻ này sẽ tử vong do các dị tật này làm trẻ không thích ứng được với đời sống bên ngoài tử cung.²⁰ Dị tật bẩm sinh có nhiều kiểu bất thường về hình thái. Tuy nhiên các rối loạn chức năng đóng vai trò chính trong quyết định thái độ xử trí cấp cứu hơn là các hình thái biểu hiện bên ngoài.²⁰

1.1.1.7. Một số bệnh mạn tính và thai nghén²²

Bệnh tim

Bệnh tim ở phụ nữ mang thai gây ra nhiều nguy cơ cho mẹ và con trong khi mang thai, sau khi đẻ và đặc biệt trong chuyển dạ. Tần suất mắc bệnh ở Việt nam khoảng 1-2% phụ nữ mang thai. Các ảnh hưởng của bệnh tim mạch và thai nghén bao gồm:

- Đối với thai: dọa sảy thai, sảy thai, dọa đẻ non, đẻ non; thai chậm phát triển trong tử cung, thai dị dạng; thai chết lưu trong tử cung, thai chết trong chuyển dạ.

- Đối với thai phụ: suy tim cấp, phù phổi cấp, loạn nhịp tim, tắc mạch phổi, viêm tắc tĩnh mạch sau đẻ.

Thiếu máu

Thiếu máu trong thai nghén khi tỷ lệ hemoglobin (Hb) < 110g/l. Thiếu máu nặng nếu Hb < 70g/l máu. Các nguy cơ khi thiếu máu bao gồm:

- Đối với mẹ: tình trạng thiếu oxygen làm mẹ mệt, nhịp tim nhanh. Nếu chảy

máu thêm trong thai kỳ, lúc chuyển dạ, sau đẻ... thì tình trạng sản phụ nặng hơn so với sản phụ bình thường. Trong giai đoạn hậu sản, thiếu máu thường làm tăng nguy cơ nhiễm trùng hậu sản (viêm tắc tĩnh mạch).

- Đối với con: nguy cơ đẻ non, suy dinh dưỡng thai nhi, nguy cơ thai bất thường, hoặc tăng thể tích bánh rau.

Đái tháo đường

- Đái tháo đường thai nghén là sự giảm dung nạp glucose hoặc đái tháo đường được phát hiện lần đầu trong lúc mang thai không loại trừ người bệnh đã có giảm dung nạp glucose hoặc đái tháo đường từ trước nhưng chưa được phát hiện.

- Đái tháo đường thai nghén có tỷ lệ phát hiện chủ yếu ở giai đoạn muộn của thai kỳ, phần lớn các trường hợp sau sinh glucose có thể bình thường trở lại. Tuy nhiên những trường hợp có tiền sử đái tháo đường thai nghén này có nguy cơ phát triển thành đái tháo đường type 2 trong tương lai.

1.1.3. Nguyên nhân của bất thường sinh sản

Có nhiều cách phân loại nguyên nhân bất thường sinh sản, tuy nhiên các nguyên nhân được biết có thể chia thành các nhóm sau:^{2,3}

1.1.3.1. Bất thường sinh sản do rối loạn vật chất di truyền

BTSS do các rối loạn di truyền có thể xếp thành 3 nhóm sau đây:

Do đột biến nhiễm sắc thể

Đột biến nhiễm sắc thể (NST) làm thay đổi về số lượng hoặc cấu trúc của NST mà kết quả làm tăng hoặc giảm vật liệu di truyền. Đột biến NST có thể xảy ra ở NST thường hay NST giới tính. Ví dụ hội chứng Down là do thêm một NST 21 (trisomy 21), là bất thường NST thường gặp nhất ở người, được Langdon Down mô tả lâm sàng vào năm 1866 và đã trở thành dị tật bẩm sinh đầu tiên được cho là rối loạn NST.^{2,3}

Do đột biến đơn gen

Đột biến gen làm thay đổi cấu trúc gen gây ra bất thường chức năng hoạt động tế bào. Đột biến đơn gen được ghi nhận về mặt lâm sàng đầu tiên là trường hợp ngắn tay và các ngón (Brachydactyly) trong một gia đình ở Pennsylvania. Đột biến chỉ xảy ra ở một locus trên NST. Tùy theo đột biến là trội hay lặn mà bệnh biểu hiện ngay ra kiểu hình hay tiềm tàng ở trạng thái lặn hay không biểu hiện ra kiểu hình. Ví dụ tật thừa ngón, tật dính ngón, tăng cholesterol máu có tính gia đình thường do đột biến alen trội, các tật do rối loạn chuyển hóa, tật bạch tạng do đột biến alen lặn.^{2,3}

Do rối loạn di truyền đa nhân tố

Khái niệm về di truyền đa nhân tố giải thích bất thường sinh sản là do sự tương tác giữa môi trường và gen, được Boris Ephrussi đề xuất vào năm 1953 và hiện nay được chấp nhận rộng rãi. Ví dụ về các bất thường sinh sản do rối loạn di truyền đa nhân tố là rất nhiều, thường là dị tật một hệ thống cơ quan hoặc chân tay như là bệnh tim bẩm sinh, dị tật ống thần kinh, khe hở môi và/hoặc khe hở vòm miệng, tật bàn chân khoèo và loạn sản khớp háng.^{2,3}

Ngoài ba nhóm bệnh tật di truyền nêu trên còn nhóm bệnh do rối loạn di truyền ở tế bào sinh dưỡng (somatic cell genetic disorders), ví dụ như sự rối loạn di truyền trong ung thư. Bệnh do đột biến DNA ty thể cũng được các tác giả đề cập.³

1.1.3.2. Bất thường sinh sản do các tác nhân môi trường

Do các tác nhân vật lý

Các chất phóng xạ gây ra các bất thường sinh sản đã được báo cáo trong các nghiên cứu như: gây sảy thai,³⁰ hay gây ra các dị tật bẩm sinh,³¹ hậu quả của sự cố Chéc-nô-bun làm tăng gấp đôi lần tàn số dị tật bẩm sinh ở Belarus sau 10 năm.³² Các tia như tia tử ngoại cũng có thể gây nên các bất thường sinh sản.^{3,33} Tia X quang có thể gây sảy thai, thai chết lưu.³⁴ Sự thay đổi nhiệt độ của cơ thể mẹ khi mang thai cũng có thể gây các BTSS như sảy thai, thai chết lưu, sinh con bị tật bẩm sinh.³

Do các tác nhân hóa học

+ *Các độc chất môi trường*: Các độc chất môi trường được coi là tác nhân gây BTSS quan trọng.³⁵ Chúng rất nhiều, gồm các chất độc hóa học trong chiến tranh như chất da cam;³⁶ thuốc bảo vệ thực vật;³⁷ khói thuốc lá;³⁸ các chất gây ô nhiễm không khí;³⁹ chất khử trùng;⁴⁰ các dung môi hữu cơ;⁴¹ các chất phá vỡ nội tiết (EDCs: endocrine disrupting chemicals)⁴² và nhiều độc chất môi trường khác như chì,⁴³ formaldehyde.⁴⁴

+ *Các chất gây nghiện và một số loại thuốc điều trị*: Mẹ lạm dụng các chất gây nghiện trong khi mang thai, điển hình là ma túy,⁴⁵ rượu,⁴⁶ cà phê⁴⁷ cũng có tác hại đến phôi thai và có thể gây một số dạng bất thường sinh sản. Một số dược phẩm cũng gây ra BTSS như: Thalidomide gây thiếu chi toàn bộ hay một phần.⁴⁸ Thuốc kháng sinh *sulfonamides* liên quan đến tật vô não, hội chứng giảm sản tim trái, phòng động mạch chủ, tật lỗ mũi sau, ngắn chi, thoát vị cơ hoành; Nitrofurantoin có liên quan đến tật không có nhãn cầu hoặc nhãn cầu nhỏ, hội chứng giảm sản tim trái, thông liên nhĩ, khe hở môi và khe hở vòm miệng;⁴⁹ thuốc Methotrexate sử dụng trong thời gian mang thai gây sảy thai, thai chết lưu và một số dị tật bẩm sinh.⁵⁰

Do các tác nhân sinh vật học

Các vi sinh vật gây nhiễm trùng truyền từ mẹ sang con phổ biến được viết tắt là TORCH: Toxoplasmosis, Other organisms (các vi sinh vật khác: giang mai, varicella - zoster, parvovirus B19 ở người), Rubella, Cytomegalovirus và Herpes chiếm hầu hết các nhiễm trùng phổ biến nhất liên quan đến bất thường sinh sản.² Bệnh sốt rét cũng là nguyên nhân gây BTSS như sảy thai, thai chết lưu;⁵¹ nhiễm Chlamydia Trachomatis cũng có nguy cơ gây sảy thai.⁵²

1.1.3.3. Bất thường sinh sản do bất thường cơ thể bố mẹ

Bất thường cơ thể và tử cung của mẹ

Mẹ bị dị dạng tư thế như bàn chân vẹo, loạn sản khớp háng, hẹp khung chậu, gù vẹo cột sống... Tử cung dị dạng, sự đè ép hoặc co thắt tử cung, u tử cung hoặc buồng trứng có thể gây sảy thai, thai chết lưu. Sự dính màng ối, sự giảm lượng nước ối cũng có thể gây thai chết lưu.^{24,53}

Các bệnh lý của mẹ

Nhiều bệnh lý và rối loạn chuyển hóa ở mẹ được cho là có liên quan đến bất thường sinh sản. Đáng chú ý nhất là đái tháo đường phụ thuộc insulin trong thời kỳ mang thai, động kinh, tăng huyết áp, béo phì, suy dinh dưỡng đặc biệt là thiếu acid folic, iod, sự bất đồng nhóm máu giữa mẹ và con như trong trường hợp mẹ Rh⁻, con Rh⁺, bệnh tăng đông do di truyền hay mắc phải, rối loạn miễn dịch là nguyên nhân gây sảy thai, sảy thai liên tiếp, thai chết lưu, dị tật bẩm sinh.^{2,54} Tuổi của bố, mẹ cao cũng được cho là nguyên nhân của một số bất thường sinh sản. Mẹ ≥ 35 tuổi có nguy cơ cao sinh con bị Down, sảy thai, thai chết lưu.^{3,53} Tuy phân ra ba nhóm nguyên nhân, song trong thực tế thì việc tìm hiểu nguyên nhân cho nhiều trường hợp bất thường sinh sản là rất khó, những trường hợp đó được gọi là bất thường sinh sản chưa rõ nguyên nhân. Theo một số tác giả, nguyên nhân của BTSS như sau: do đột biến đơn gen 8%; do đột biến NST 10%; do môi trường 7%; do cả môi trường và di truyền 25% (đa nhân tố) và chưa rõ nguyên nhân 50%.³ Mỗi dạng rối loạn thuộc ba nhóm nêu trên dẫn đến kết quả phôi thai với những bất thường đặc trưng, tuy nhiên tất cả các bất thường đó đều có thể dẫn đến các bất thường sinh sản.

1.1.4. Cơ chế liên quan đến bất thường sinh sản

Tùy theo các nguyên nhân khác nhau, các bất thường khác nhau sẽ có cơ chế khác nhau. Trong khuôn khổ của luận án, ở nghiên cứu này, chúng tôi đề cập đến dạng của bất thường thai sản đó là thai chết lưu. Theo hướng dẫn quốc gia về các dịch vụ chăm sóc sức khỏe sinh sản năm 2016¹ định nghĩa là thai chết trong tử cung và theo hướng dẫn chẩn đoán và điều trị các bệnh sản

phụ khoa năm 2015²² thì được gọi là thai chết lưu trong tử cung.

1.1.4.1. Các bất thường từ phôi, thai gây thai chết lưu.

Các tác động gây rối loạn vật chất di truyền hoặc rối loạn quá trình phân bào có thể làm cho sự phát triển của một mô hoặc một số mô, cơ quan phát triển không bình thường dẫn đến kiểu hình quái thai. Tác động gây chết tế bào có định hướng làm cho mô, cơ quan tương ứng không hình thành hoặc hình thành không hoàn chỉnh. Việc xuất hiện các bất thường ở phôi thai còn phụ thuộc vào khả năng tự sửa chữa của tế bào. Ở mức độ phân tử người ta thấy quá trình nhân đôi DNA có khá nhiều sai sót, trong đó có sai sót do đặt nhầm nucleotid, tuy nhiên hầu hết những nucleotid đặt nhầm này được enzym cắt đi và thay vào đó là nucleotid đúng. Ở mức độ tế bào, những đứt gãy NST phần lớn tự hàn gắn lại, những tế bào có đột biến thường có khả năng sống kém, dễ bị chết. Ở mức độ cơ thể, từ khi hợp tử hình thành cho đến khi một trẻ ra đời trải qua nhiều giai đoạn. Ở mỗi thời điểm, mỗi giai đoạn, những hợp tử, phôi, thai bất thường nhiều sẽ bị chết gây nên thai chết lưu, những bất thường có thể tồn tại đến lúc sinh tạo ra cơ thể có bất thường bẩm sinh.³

Tác động của các tác nhân gây bất thường phôi thai còn phụ thuộc vào mô bị tác động, phụ thuộc vào quần thể bị tác động. Có tác nhân tác động mạnh vào mô, cơ quan này nhưng lại không ảnh hưởng tới cơ quan khác. Nhiều nghiên cứu cho thấy với cùng một tác động bất lợi, ở chủng tộc này xuất hiện đột biến với tần số cao nhưng với chủng tộc người khác thì lại ít bị ảnh hưởng. Thời kì các cơ quan dễ bị tổn thương nhất là lúc bắt đầu xảy ra sự biệt hóa của mô hay của cơ quan đó.³

1.1.4.2. Các cơ chế do nguyên nhân từ người mẹ gây thai chết lưu

Cơ chế miễn dịch

Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng một loạt các tự kháng thể như kháng thể

kháng phospholipid, kháng thể kháng tuyến giáp, kháng thể kháng nhân được tìm thấy với tỷ lệ cao trong nhóm phụ nữ có tình trạng thai chết lưu tái diễn cho thấy ảnh hưởng của các kháng thể tự miễn lên việc gây ra các bất thường sinh sản. Tuy nhiên chưa có bằng chứng rõ ràng về việc các tự kháng thể gây ảnh hưởng đến sự phát triển của thai nhi, chúng chỉ cho thấy dấu hiệu của xu hướng phá vỡ sự tự dung nạp miễn dịch và phản ứng tiền viêm ở những phụ nữ này.⁸

Elisabeth Clare Larsen⁸ cùng một số nghiên cứu khác đã chứng minh: ở chuột khi thiếu các yếu tố bổ sung đa dạng (bổ thể C3) đã kháng lại được tổn thương bào thai gây ra bởi việc tiêm kháng thể anti-phospholipid. Điều này chỉ ra rằng ít nhất trên chuột, kháng thể APS có ảnh hưởng có hại đến thai nhi thông qua cơ chế miễn dịch (kích hoạt bổ sung) chứ không thông qua cơ chế kháng đông trực tiếp. Tuy nhiên có một số bằng chứng yếu hơn cho thấy, Antiphospholipid cũng gây ra kích hoạt bổ sung trên người với hội chứng kháng phospholipid (APS).⁵⁵

Một loạt các nghiên cứu đã báo cáo về sự gia tăng các nồng độ của các cytokine loại tế bào T hoặc tế bào trợ giúp loại I⁵⁶ hoặc tăng số lượng tế bào giết tự nhiên (Natural killer cell, NK) trong máu⁵⁷ ở những người có thai chết lưu tái diễn. Có một số bằng chứng cho thấy các tế bào NK tử cung điều chỉnh sự hình thành mạch máu trong nội mạc tử cung không mang thai và do đó chúng có vai trò trong việc làm tổ và mang thai giai đoạn sớm.⁵⁸

Cơ chế nội tiết

Các thụ thể TSH (TSH-r) có phản ứng chéo với các thụ thể gonadotropin màng đệm ở người. Vì vậy ở phụ nữ mang thai, khi nồng độ β hCG tăng cao thì có phản ứng chéo với các thụ thể TSH gây nên sự ức chế của hormon tuyến giáp có thể dẫn đến giảm sản xuất progesterone và estrogen cần thiết cho việc hỗ trợ và duy trì thai kỳ trong ba tháng đầu. Có bằng chứng cho thấy các bệnh nhân có rối loạn chức năng tuyến giáp và bệnh tuyến giáp tự miễn, bệnh nhân

có hormon giáp bình thường nhưng hormon kích thích tuyến giáp TSH tăng cao có liên quan đến vô sinh, mất thai sớm.⁵

Hội chứng buồng trứng đa nang (Polycystic ovary syndrome, PCOS) là một rối loạn nội tiết hay gặp ở phụ nữ tuổi sinh sản. Những người bị PCOS, nồng độ của EGF (*Epidermal growth factor*) và TGF (*Transforming growth factor*) tăng cao, ngăn cản sự phát triển của nang noãn cũng như ức chế quá trình chuyển Androgen thành Estrogen của tế bào hạt. Bên cạnh đó, IGF-1 được tiết ra từ tế bào vỏ lại làm tăng quá trình tổng hợp Androgen. LH không bị ức chế tiếp tục tăng cao. PCOS có liên quan đến rối loạn rụng trứng và mất thai sớm. Tỷ lệ phụ nữ PCOS có mất thai tái phát dao động theo các nghiên cứu khác nhau từ 4,8% đến 82%.⁷

Cơ chế huyết khối

Các yếu tố gây huyết khối có xu hướng liên quan đến sảy thai và thai chết lưu tái phát có thể do di truyền hoặc mắc phải.⁹ Các ý kiến cho rằng sự liên quan này là do tăng nguy cơ hình thành huyết khối trong các mạch nhau thai dẫn đến giảm tưới máu nhau thai. Các yếu tố di truyền bao gồm sự thiếu hụt antithrombin, protein C và protein S, các yếu tố đột biến gen V Leiden, yếu tố II (G20210A) hoặc gen MTHFR.¹⁰ Bệnh huyết khối mắc phải là trạng thái tăng đông máu thứ phát sau các nguyên nhân khác nhau. Đặc biệt, khi mang thai, nguy cơ sảy thai, thai chết lưu càng tăng cao do những thay đổi sinh lý tiềm ẩn. Chứng tăng tăng đông phổ biến nhất liên quan đến mất thai tái diễn là hội chứng kháng phospholipid (APS).⁵⁹ Hội chứng hyperhomocystein là tình trạng tăng Hcy máu có thể là cả di truyền và mắc phải.⁵⁹ Nguyên nhân di truyền được xác định do sự đa hình gen dẫn đến sự tổng hợp thiếu hụt enzym MTHFR gây nên giảm chuyển hóa Hcy, nguyên nhân mắc phải được cho là do chế độ ăn uống thiếu các vitamin như vitamin B6, folate (B9) hay vitamin B12 gây nên rối loạn việc chuyển hóa Hcy thành methionin gây ứ đọng Hcy trong

máu.⁵⁹ Nồng độ Hcy trong máu tăng cao được chứng minh là có liên quan đến cơ chế đông máu gây nên tình trạng sảy thai, thai chết lưu tái phát.⁶⁰

1.2. Vai trò của homocystein, folat và đa hình gen MTHFR

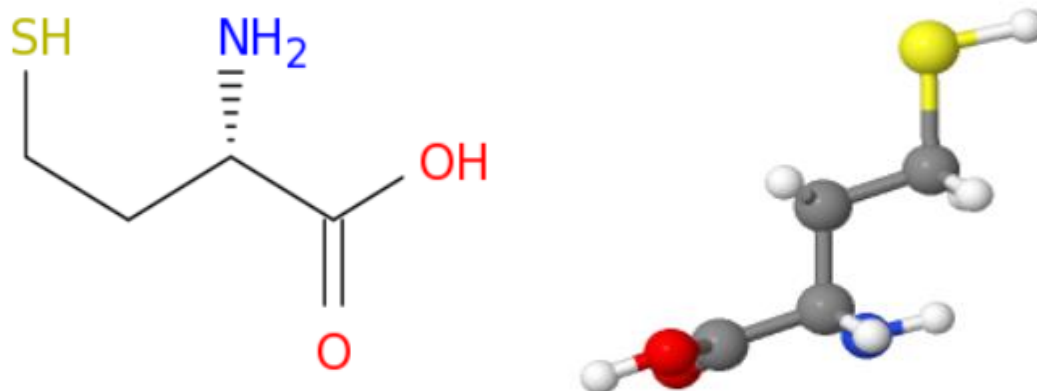
1.2.1. Vai trò của homocystein

Hcy là một acid amin có chứa lưu huỳnh được hình thành trong quá trình chuyển hóa methionin (Met) thành cystein (Cys). Hcy có cấu trúc tương đồng Cys nhưng nhiều hơn Cys một nhóm methylen. Hcy có thể được tái chuyển hóa thành Met hoặc chuyển thành Cys với sự hỗ trợ của một số loại vitamin nhóm B.

1.2.1.1. Cấu trúc phân tử của homocystein

Công thức hóa học là $C_4H_9NO_2S$, trọng lượng phân tử 135,181 g/mol.

Hcy tồn tại ở dạng pH trung tính



Hình 1.1: Cấu trúc 2 và 3 chiều của Homocystein

Nguồn: ChemEssen.com

Công thức hóa học $C_4H_9NO_2S$ có cấu trúc 17 nguyên tử bao gồm các liên kết hóa học và nhóm chức: 7 liên kết không phải H, 1 liên kết đa nguyên tử, 3 liên kết xoay, 1 liên kết đôi, 1 cacboxylic acid, 1 amin bậc một, 1 nhóm hydroxyl và 1 liên kết thiol.

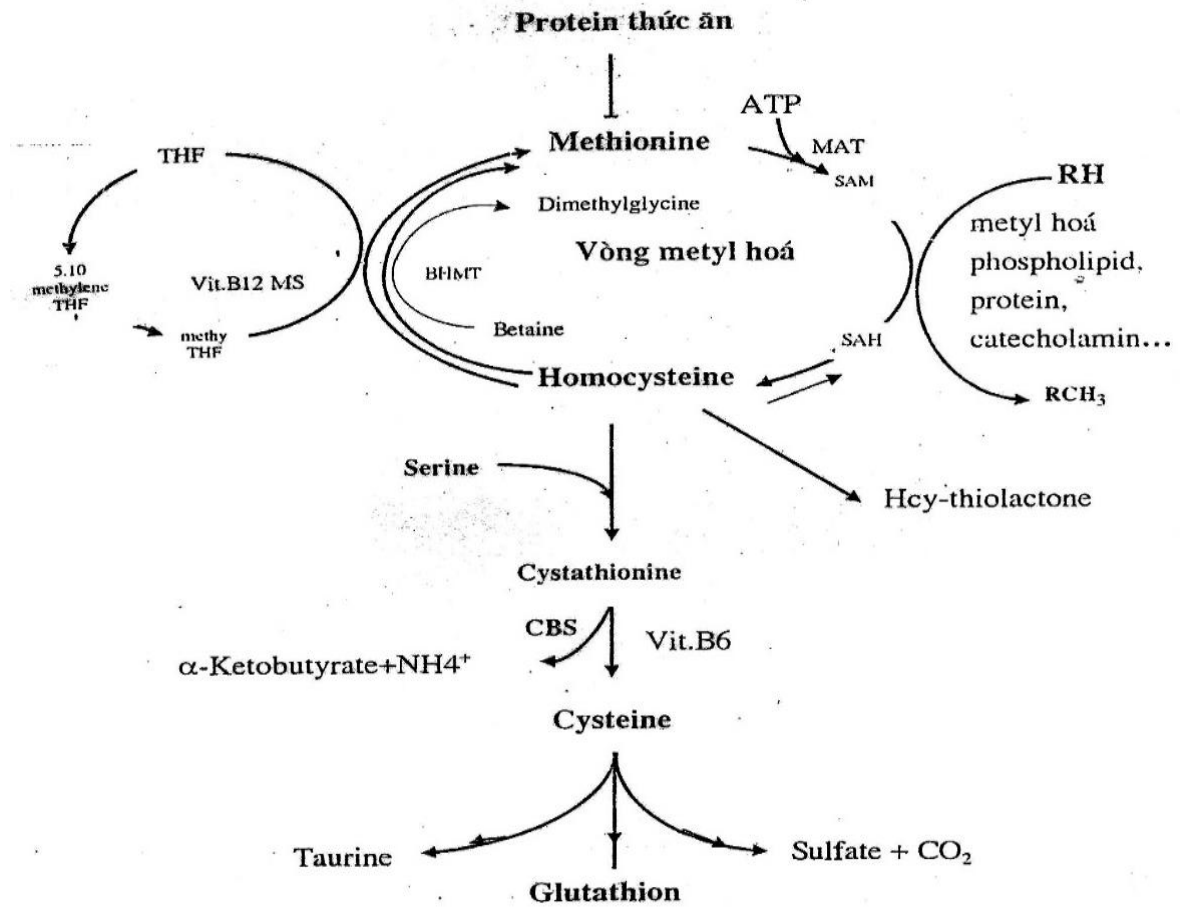
1.2.1.2. Chuyển hóa của homocystein

Homocystein được chuyển hóa chủ yếu ở gan và thận, chỉ có khoảng 1% được lọc qua cầu thận ra nước tiểu.⁶¹ Hcy toàn phần trong huyết thanh bao gồm:⁶²

- + Homocystein tự do: chiếm khoảng 1%.
- + Homocystein kết hợp: 2 phân tử Hcy liên kết với nhau bởi cầu nối disulfua (Homocystein – Homocystein), chiếm 5-10%.
- + Homocystein - Cystein: chiếm 5-10%.
- + Homocystein – Albumin: chiếm 70%.

Homocystein có thể được chuyển hóa theo 3 con đường: tạo thành Met (con đường remethylation) hoặc được chuyển hóa thành Cys (con đường chuyển hóa transsulfuration) hoặc có thể chuyển hóa thành homocystein thiolacton (HTL).

Chất điều hòa cả hai con đường chuyển hóa Hcy là S- Adenosylmethionin (SAM). Khi cân bằng methionin âm, nồng độ SAM thấp, Hcy sẽ chuyển trực tiếp con đường tái methyl hóa để tạo methionin dưới tác dụng của enzym *methionine synthetase* (MS) có cofactor là vitamin B12, cơ chất của phản ứng này là *Methyltetrahydrofolat* (methylTHF) được tạo thành dưới tác dụng xúc tác của *Methyltetrahydrofolate reductase* (MTHFR). Enzym này có ảnh hưởng gián tiếp, mạnh mẽ lên quá trình tái gắn methyl của Hcy.⁷²



CBS: Cystathionine β-synthase

MAT : Methionine adenosine transferase

MS : Methionine Synthase

MTHFR: 5,10 Methylene tetrahydrofolate reductase

BHMT : Betaine homocysteine methyltransferase

SAM : S-Adenosylmethionine

SAH: S-Adenosylhomocysteine

THF : Tetrahydrofolate

MethylTHF : Methyltetrahydrofolate

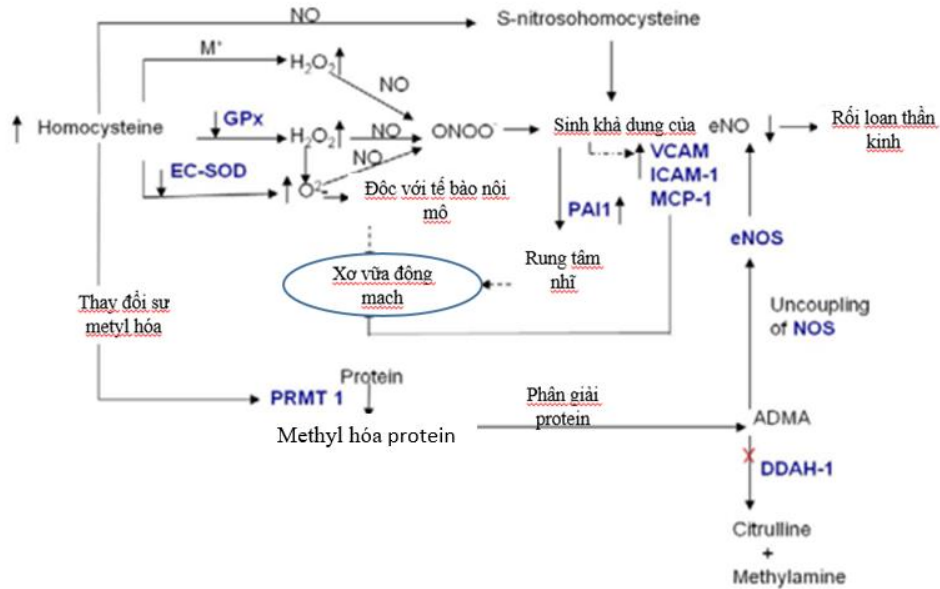
5,10 methylene THF: 5,10 Methylene tetrahydrofolate

Sơ đồ 1.1. Chuyển hóa của homocystein⁶³

Khi nồng độ SAM cao, Hcy được chuyển hóa trực tiếp theo con đường tạo cystathionin và cystein bởi hai phản ứng phụ thuộc vitamin B6. Những nghiên cứu trên chuột thấy SAM vừa là chất ức chế MTHFR vừa là chất kích thích enzym *cystathionine beta synthetase* (CBS).⁶²

1.2.1.3. Cơ chế gây xơ vữa động mạch, huyết khối của homocystein

Tăng nồng độ homocystein và stress oxy hoá

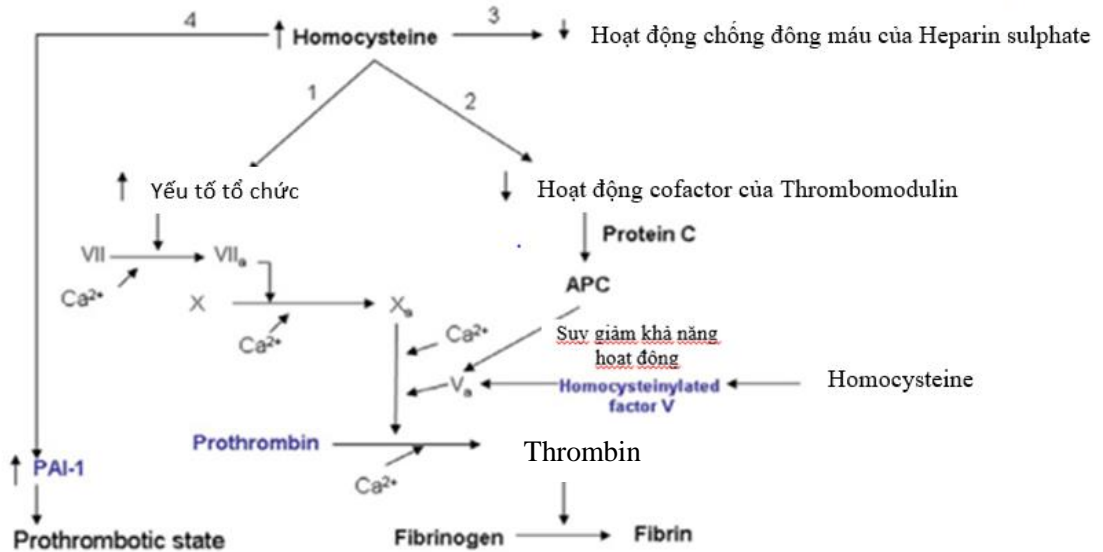


Hình 1.2: Cơ chế stress oxy hóa của Hcy

Nguồn (<http://www.lipidworld.com/content/5/1/1>)

Một trong những cơ chế được đưa ra về tác động có hại của Hcy là khả năng sinh ra các loại oxy phản ứng, do đó tạo ra stress oxy hóa (hình 1.2). Người ta thường cho rằng Hcy do có nhóm thiol nên có thể nhanh chóng tự oxy hóa trong vòng tuần hoàn dưới sự hiện diện của crruloplasmin-protein gắn đồng chủ yếu có trong huyết thanh hình thành nên Hcy và hydrogen peroxide (H₂O₂), do đó gây ra stress oxy hóa. Hcy có thể gián tiếp gây ra stress oxy hóa bằng cách giảm hoạt tính phenyl, dịch mã⁶⁴ và xúc tác của các enzym chống oxy hóa như glutathion peroxidase (GPx) và superoxide dismutase (SOD).⁶⁵ Stress oxy hóa liên quan đến Hcy chủ yếu là do tế bào bị giảm khả năng khử độc tính của H₂O₂ và peroxides lipid khác do giảm hoạt độ các enzym chống oxy hóa nội bào. Hơn nữa, giảm khả năng sinh dụng của oxide nitric có thể dẫn đến sự gia tăng biểu hiện của các cytokin tiền viêm và PAI1, dẫn đến các bệnh của mạch máu.¹⁴

Tăng homocystein máu và chuỗi phản ứng đông máu



Hình 1.3: Nồng độ homocystein và con đường đông máu

Nguồn: (<http://www.lipidworld.com/content/5/1/1>)

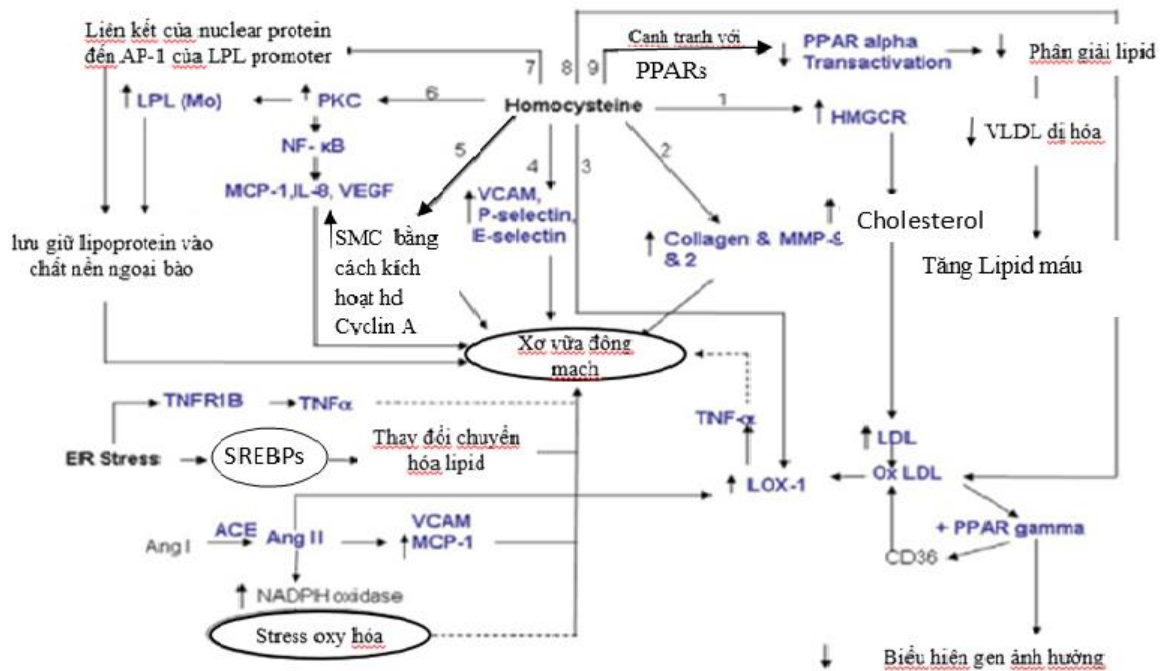
Trong tổn thương mạch, yếu tố mô – một glycoprotein gắn màng có liên quan tới phospholipid, sẽ hình thành một phức hợp (1:1) với yếu tố VII dẫn tới khởi⁶⁶ động chuỗi phản ứng đông máu (Hình 1.3). Hcy có thể tăng cường hoạt tính tiền đông máu bằng nhiều cách khác nhau. Sự tăng nồng độ Hcy được báo cáo làm tăng hoạt tính yếu tố mô tế bào.¹⁴ Mann và cộng sự cũng cho rằng Hcy có thể nhanh chóng gắn vào yếu tố V gây ra lỗi bất hoạt V_a do protein C đã hoạt hoá (APC- activated protein C). APC– một protein phụ thuộc vitamin K, được hình thành bởi hoạt động của thrombin với protein C khi có sự hiện diện của thrombomodulin, một cofactor gắn màng. Hcy cũng cho thấy khả năng ức chế hoạt tính cofactor của thrombomodulin. Như vậy, Hcy làm suy yếu con đường chống đông thrombomodulin-APC bằng cách ức chế hoạt tính cofactor của thrombomodulin dẫn tới giảm hình thành APC, và ức chế sự bất hoạt yếu

tố Va bằng APC. Ngoài ra, Hcy cũng gây ảnh hưởng tới một con đường chống đông nội mô khác: cơ chế chống đông nội mô glycosaminoglycans-antithrombin III tương tự heparin. Hcy cũng làm giảm khả năng gắn màng của yếu tố hoạt hoá plasminogen mô; làm tăng biểu hiện gen ức chế yếu tố hoạt hoá PAI-1 bài tiết từ các tế bào nội mô mạch máu và cơ trơn thông qua một cơ chế không phụ thuộc vào hoạt động cận tiết-tự tiết của TGF β và TNF α . Do đó, có thể cho rằng sự tăng nồng độ Hcy sẽ dẫn tới tình trạng huyết khối do tăng cường các con đường tiền đông máu và/hoặc ức chế các con đường chống đông.¹⁴

Tăng homocystein máu và xơ vữa động mạch.

Khi nồng độ Hcy tăng cao có thể gây xơ vữa động mạch thông qua các cơ chế:¹⁴

- Hcy gây ra rối loạn tổng hợp cholesterol làm tăng cholesterol máu.
- Hcy ảnh hưởng tới sự biểu hiện của LPL (lipoprotein lipase) và Lox-1 dẫn tới xơ vữa động mạch. Hcy dẫn tới sự biểu hiện cả ở mức độ phiên mã và dịch mã của LPL đại thực bào thông qua hoạt hoá PKC.
- Hcy điều hoà hoạt động của gen đáp ứng viêm trong tế bào nội mô. Trong tế bào nội mô, các cytokin tiền viêm tăng cường sự gắn của NF- κ B với DNA và gây ra sự tăng điều hoà của các gen phụ thuộc NF- κ B.
- Hcy gây kích thích biểu hiện của MCP-1, VCAM-1 và LOX-1 gây tăng huyết áp, tăng angiotensin II và xơ vữa động mạch.
- Hcy tăng quá trình tổng hợp và tích tụ của collagen ở tế bào cơ trơn và một vài nghiên cứu đã chứng minh rằng Hcy là yếu tố gây phân bào đối với tế bào cơ trơn động mạch. Hệ thống protein ngoại bào như collagen được biết đến như là thành phần quan trọng của mảng xơ vữa.



Hình 1.4. Cơ chế gây xơ vữa động mạch của homocystein¹⁴

Lớp nội mạc có vai trò tạo ra cân bằng nội môi mạch máu và tưới máu mô. Hcy gây ra xơ vữa động mạch bằng cách phá hủy nội mô, làm rối loạn khả năng bám dính của bạch cầu và tiểu cầu, huyết khối, tăng sinh cơ trơn, co thắt mạch, tích lũy lipid và cuối cùng là mảng xơ vữa.⁶⁷

Việc tổn thương nội mô đã được nghiên cứu bởi Wall RT⁶⁸ qua cơ chế oxy hóa của Hcy. Sự tự oxy hóa của Hcy được chứng minh bằng việc giảm sự oxy hóa khi điều trị bổ sung bằng *catalase*.⁶⁹ Hcy cũng gây tổn thương trực tiếp cơ chất mạch máu do ảnh hưởng sinh học và chức năng sinh tổng hợp tế bào mạch máu. Hcy thiolacton, phản ứng mạnh với các sản phẩm phụ oxy hoá Hcy, kết hợp với lipoprotein trọng lượng thấp tạo thành một hỗn hợp thu hút thực bào màng nội mạc và kết hợp với tế bào bọt trong mảng xơ vữa mới sinh.⁷⁰

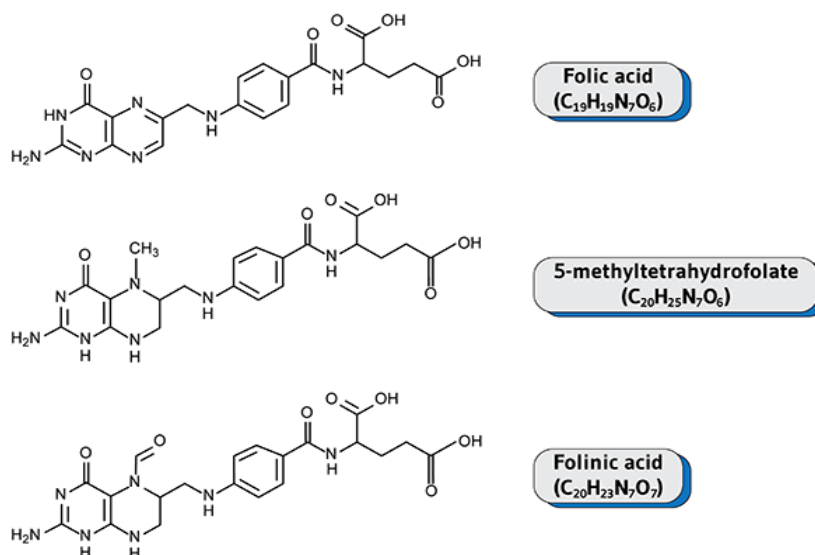
1.2.2. Vai trò của folat

Folat là một vitamin nhóm B tan trong nước, còn được gọi là vitamin B₉ hoặc folacin. Folat tự nhiên tồn tại ở nhiều dạng hóa học, folat được tìm thấy trong thực phẩm, cũng như trong các hình thức hoạt động trao đổi chất trong

cơ thể con người. Acid folic là dạng tổng hợp chính được tìm thấy trong thực phẩm bổ sung và các chất bổ sung vitamin. Các dạng tổng hợp khác bao gồm acid folinic (**Hình 1.7**) và acid levomefolic. Acid folic không có hoạt tính sinh học trừ khi được chuyển hóa thành folat.⁷¹ Trong khi folat là một loại vitamin có trong tự nhiên thì acid folic là một vitamin B tổng hợp được tìm thấy trong các chất bổ sung và thực phẩm tăng cường. Folat được hấp thụ một cách dễ dàng và tự nhiên ở ruột non. Mặt khác, cơ thể muốn hấp thụ acid folic đòi hỏi phải có reductase dihydrofolate - một enzym tương đối hiếm trong cơ thể.⁷²

1.2.2.1. Cấu trúc của folat

Cấu trúc phân tử: $C_{19}H_{19}N_7O_6$, trọng lượng phân tử: 441,404 g/mol.



Hình 1.5. Các dạng cấu trúc của acid folic⁷¹

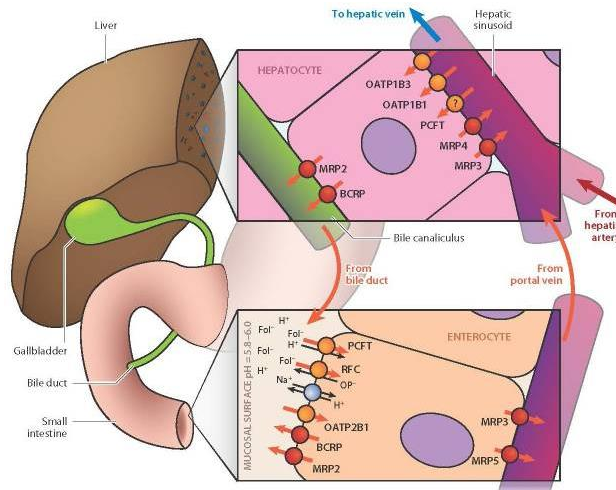
1.2.2.2. Chuyển hóa của folat trong cơ thể

Quá trình sinh tổng hợp và chuyển hóa của folat

Folat là một vitamin cần thiết cho cơ thể và được cơ thể hấp thụ từ thức ăn có chứa nhiều folat như các loại rau sẫm màu, trái cây như: súp lơ xanh, rau chân vịt, măng tây, khoai tây, các loại trái cây gồm bơ, cam, bưởi, lòng đỏ trứng, gan, thịt gà, ngũ cốc nguyên hạt.⁷¹ Khi vào trong cơ thể folat được hấp thụ ở tá tràng và hồi tràng dưới tác dụng của các loại vi khuẩn trong môi trường acid

ở bề mặt tế bào. Để hấp thu qua ruột, folat cần các chất mang để xuyên qua màng tế bào như: chất vận chuyển folat gắn cặp với proton (proton-coupled folate transporter: PCFT) và chất mang folat dạng khử (reduced folate carrier: RFC).⁷²

Sau khi vào tế bào ruột, folat được vận chuyển qua màng tế bào để vào mạch máu nhờ một số các chất vận chuyển như: MRP3, MRP5... Từ các mạch máu nhỏ được đổ về tĩnh mạch cửa và folat tiếp tục được vận chuyển qua màng tế bào để vào tế bào gan. Tại gan folat được sử dụng như một nguyên liệu tổng hợp nên acid amin DNA, RNA. 50% folat được dự trữ tại gan, một phần đổ vào mật và xuống tá tràng, bắt đầu một chu chuyển mới tại tá tràng.⁷²



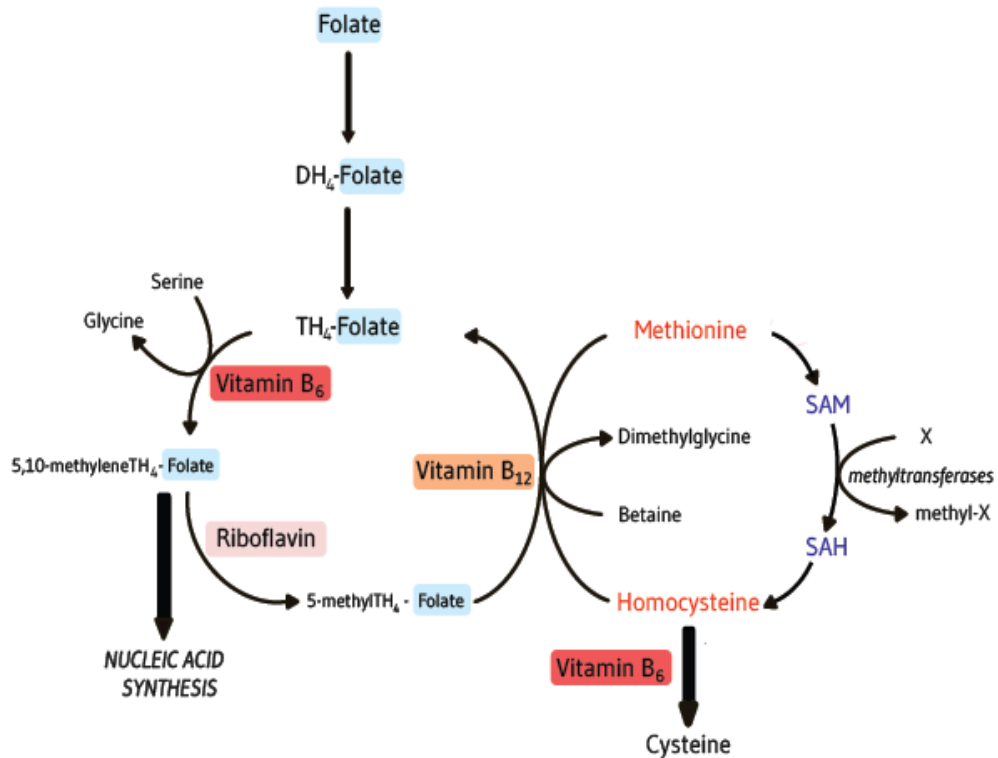
Hình 1.6. Sự hấp thu Folat trong cơ thể⁷³

Chất vận chuyển folat

Folat và coenzym của nó cần có chất vận chuyển để vượt qua màng tế bào. Các chất vận chuyển folat bao gồm chất mang folat, chất vận chuyển folat kết hợp proton, và các protein thụ thể folat bao gồm thụ thể α , thụ thể β và γ .⁷³ Sự cân bằng folat được hỗ trợ bởi sự phân bố phổ biến của chất vận chuyển folat mặc dù nồng độ và tầm quan trọng khác nhau giữa các mô.⁷⁴

1.2.2.3. Vai trò của folat trong sức khỏe và bệnh tật

⁷⁵



Hình 1.7. Chu trình folat trong chuyển hóa methionin⁷⁶

Folat giúp cho hàng trăm quá trình trao đổi chất và các quá trình sinh học tham gia vào quá trình sản xuất các acid amin không thiết yếu như methionin và glycin giúp cơ thể con người hoạt động một cách hiệu quả. Folat cũng đóng một vai trò quan trọng đối với sự hình thành, phục hồi và góp phần bảo vệ và tổng hợp DNA nên đóng vai trò thiết yếu trong quá trình phân chia tế bào giúp cho các tế bào đảm nhận chức năng di truyền.

Folat là cơ sở chính của nhiều coenzym. Trong nhiều phản ứng tổng hợp, những coenzym này tham dự vào quá trình trưởng thành và phân chia tế bào. Nó có vai trò quan trọng ở nhiều mức khác nhau :

- Tạo thành tế bào máu, thiếu folat dẫn đến thiếu máu hồng cầu to.
- Hệ thần kinh trung ương: thiếu folat có thể gây trầm cảm và suy giảm nhận thức vì folat tham gia vào quá trình tổng hợp nhiều chất dẫn truyền thần kinh như: Dopamin, adrenalin, noradrenalin.⁷⁷
- Tổng hợp acid nucleic (DNA, RNA) tạo nên gen.

- Trong methyl hóa acid nucleotid, điều này quan trọng trong ngăn ngừa ung thư.

- Tổng hợp methionin, acid amin đồng thời tăng cường chuyển hóa homocystein làm giảm huyết khối và xơ vữa động mạch.

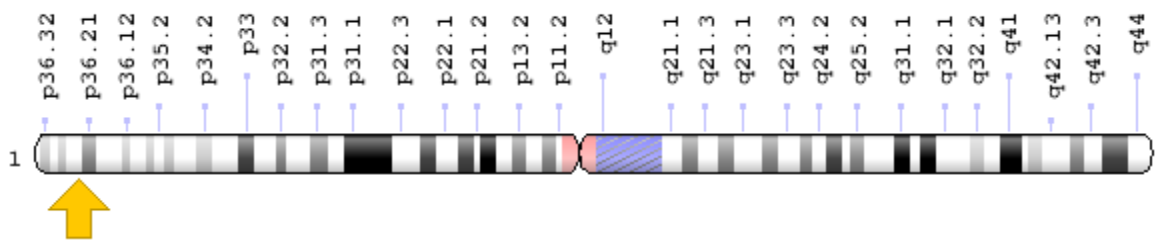
- Tổng hợp protein.

Giá trị bình thường: Folat: 3,1-20,5 ng/mL (*package insert Abbott*: Nghiên cứu được thực hiện theo hướng dẫn Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tài liệu C28-A3. Tình trạng dinh dưỡng của người hiến (quần thể tham chiếu) chưa được biết. Tất cả các mẫu được xét nghiệm khi nhin đói, ở nam giới khỏe mạnh và nữ giới không mang thai trên 18 tuổi từ quần thể United Kingdom).

1.2.3. Đa hình gen *MTHFR*

Gen *MTHFR* nằm trên nhánh ngắn NST số 1 vị trí p36.3, vị trí phân tử từ cặp base số 11,785,730 đến cặp 11,806,103.¹² Gen *MTHFR* mã hóa tổng hợp enzym *MTHFR*, là enzym xúc tác quá trình chuyển đổi 5,10-methylenetetrahydrofolat thành 5-methyltetrahydrofolat, một đồng cơ chất để tái methyl hóa Hcy thành methionin.¹²

1.2.3.1 Cấu trúc của gen *MTHFR*



Hình 1.8. Vị trí phân tử của gen *MTHFR* trên nhiễm sắc thể số 1 (NCBI)

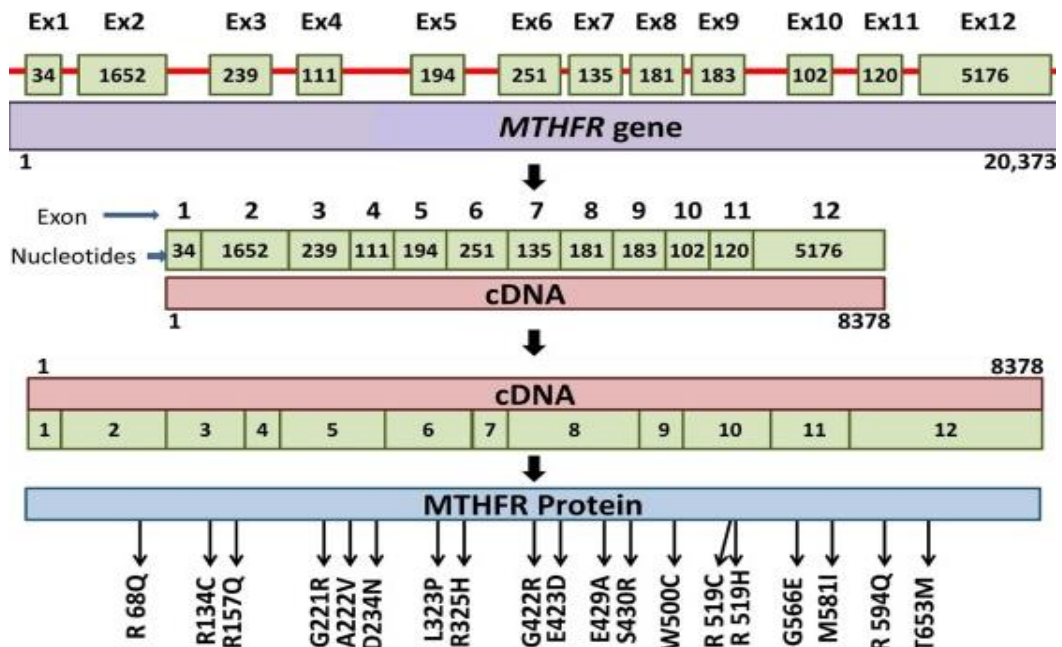
Nguồn: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR#location>

Theo nghiên cứu của Goyette năm 1994, gen *MTHFR* của người bao gồm 11 exon với kích thước mỗi exon từ 102 bp đến 432 bp. Kích thước intron dao động từ 250 bp đến 1,5 kb, tổng kích thước 20374 bp. Kích thước exon, vị trí

của ranh giới intron-exon, và kích thước intron khá giống với của chuột (90%).⁷⁸ Bằng phương pháp phân tích Northern blot, Gaughan và cộng sự (2000) đã xác định cấu trúc gen *MTHFR* khoảng 2,8 đến 7,2 kb trong tất cả các mô được thử nghiệm, và một khoảng 9,0 kb trong não, cơ, rau thai và dạ dày ở một thử nghiệm khác.⁷⁹

Năm 2010, theo công bố trong tài liệu GenAlas của HGNC (Ủy ban Phê duyệt tên và danh mục gen Quốc tế)⁸⁰ thì gen *MTHFR* có 12 exon. Tác giả Spellicy C.J. phát hiện 7 vị trí đa hình đơn nucleotide (SNP) trên gen. Các SNP được chọn trên gen *MTHFR* dựa trên gen tham chiếu NM_005957 từ bộ gen của Đại học California Santa Cruz (UCSC). 7 SNP trên gen *MTHFR* bao gồm rs3737965, rs2066470, rs9651118, rs1801133 (được gọi là C677T), rs1801131 (được gọi là A1298C), rs2274976 và rs4846049.⁸¹

Năm 2018, tác giả Mansi Desai và cộng sự cũng công bố cấu trúc gen *MTHFR* như sau:



Hình 1.9. Cấu trúc gen *MTHFR* và các protein được tổng hợp từ gen *MTHFR* (Mansi Desai 2018)⁸²

1.2.3.2. Chức năng gen *MTHFR*

Gen *MTHFR* quy định tổng hợp enzym *methylenetetrahydrofolate reductase* là một enzym điều tiết quan trọng trong chuyển hóa folat và homocystein bằng cách xúc tác chuyển đổi 5,10-methylenetetrahydrofolat thành 5-methyltetrahydrofolat, dạng tuần hoàn chính của folat được sử dụng trong con đường tái methyl hóa thành methionin của Hcy.⁸³

Đa hình gen *MTHFR* đã xác định có liên quan đến một số bệnh như: huyết khối, chứng đau nửa đầu, tăng huyết áp, vô sinh, sảy thai, thai chết lưu hay một số bệnh ung thư.⁸⁴

Có tổng cộng 34 đột biến hiếm gặp nhưng có hại trong gen *MTHFR* và 9 biến thể phổ biến đã được báo cáo. Biến thể 677C→T (A222V) và 1298 A→C (E429A) đặc biệt được chú ý vì nó đã được công nhận là nguyên nhân di truyền phổ biến nhất gây ra chứng tăng Hcy máu.⁸⁵

1.2.3.3. Các đa hình gen *MTHFR* và vai trò của các SNP

Gen *MTHFR* đã được nghiên cứu và phát hiện các biến đổi liên quan đến bệnh lý từ năm 1994 và cho đến nay đã có hàng trăm đa hình được phát hiện, tuy nhiên có 2 đa hình phổ biến và có ý nghĩa lâm sàng nhiều nhất là vị trí 677 và 1298.

Với kiểu gen C677T, khi cytosine (C) thay thế bởi thymine (T) ở nucleotide 677 thì Acid amin alanine (A) được thay thế bởi valine (V) ở vị trí 222.¹¹ Vị trí 677 nằm trong trình tự mã hóa vùng xúc tác (khử) của enzym. Đa hình này làm giảm ái lực của enzym với cofactor FAD, làm giảm 50-70% hoạt tính enzym, do đó làm tăng 25% nồng độ Hcy trong huyết thanh.¹² Tần suất đa hình C677T khác nhau ở các quần thể, địa lí và chủng tộc khác nhau. Theo nghiên cứu của Chango và cộng sự năm 2000, đa hình đồng hợp tử C > T xuất hiện với tần suất từ 5-28%. Tần số đồng hợp tử TT khoảng 10-12% ở một vài vùng của Châu Âu, trong khi đó tần suất này khoảng 6% ở Canada, 32% ở Mexico và 7.3% ở Australia.¹²

Những người có nồng độ folat trong huyết thanh thấp hơn có nguy cơ

tăng nồng độ Hcy huyết thanh. Trong các nghiên cứu về protein MTHFR tái tổ hợp ở người, protein được mã hóa bởi 677TT mất cofactor FAD nhanh hơn 3 lần so với protein kiểu hoang dã. 5-Methyl-THF làm chậm tốc độ giải phóng FAD ở cả enzym kiểu hoang dã MTHFR 677CC và enzym đa hình 677CT/TT, mặc dù nó ở mức độ lớn hơn nhiều ở enzym đa hình. Tình trạng folat thấp cùng với việc mất FAD làm tăng khả năng chịu nhiệt của enzym giải thích cho việc tăng nồng độ Hcy và giảm sự methyl hóa DNA. Ở những cá thể có kiểu gen đa hình đồng hợp tử 677TT nếu được bổ sung folat đầy đủ có thể giảm được nồng độ Hcy và methyl hóa DNA một cách bình thường.⁸⁶

Kiểu gen A1298C có sự thay thế adenine (A) bằng cytosine (C) ở vị trí 1298, làm acid glutamic chuyển thành alanine ở vị trí 429 trên phân tử protein. Sự thay đổi này làm ảnh hưởng tới vùng điều hòa của enzym.¹¹ Hoạt tính của enzym được mã hóa bởi gen đa hình bị giảm (xuống 68% so với enzym loại kiểu dại). Đồng hợp tử 1298CC được phát hiện khoảng 8% số cá thể trong các quần thể được nghiên cứu, phần lớn là người châu Âu (khoảng từ 4% đến 12% đối với hầu hết các quần thể nghiên cứu). Những người đồng hợp tử này dường như không có mức Hcy huyết thanh cao hơn so với nhóm chứng. Tuy nhiên, những cá thể là dị hợp tử kép đối với các alen 1298AC và 677CT có xu hướng có chỉ số sinh hóa gần với đặc điểm được thấy trong số các cá thể đồng hợp tử 677TT, với nồng độ Hcy huyết thanh tăng lên.⁸⁷

1.2.3.4. Sự liên quan của đa hình gen MTHFR đến các bất thường sinh sản

Đa hình gen MTHFR và tăng nồng độ Hcy huyết thanh có thể liên quan đến các biến chứng thai sản như: tiền sản giật, rau bong non, sẩy thai, thai chết lưu và một số DTBS như dị tật ống thần kinh, hội chứng Down, đột quỵ chu sinh.^{12,88-90} Nguy cơ này phụ thuộc vào từng cặp thai và mẹ. Tình trạng dinh dưỡng đầy đủ, hợp lý có thể làm thay đổi nguy cơ của biến chứng thai sản trên.⁹⁰ Sự kết hợp 2 kiểu đa hình khác nhau của gen MTHFR của mẹ và thai có thể ảnh

hưởng đến sự sống của thai. Nồng độ cao folat ảnh hưởng tới sự gắn với cofactor FAD trong quá trình xúc tác, ngăn ngừa chứng tăng Hcy huyết thanh. Như vậy, nồng độ folat thấp phối hợp với đa hình MTHFR trong cơ thể mẹ làm tăng nguy cơ bất thường sinh sản.⁹⁰

1.3. Các phương pháp định lượng nồng độ homocystein, folat và xác định đa hình gen MTHFR

1.3.1. Các phương pháp định lượng nồng độ Hcy

- Phương pháp miễn dịch hóa phát quang (CMIA).
- Phương pháp miễn dịch điện hóa phát quang (ECLIA).
- Phương pháp sắc kí lỏng khối phổ (LC-MS/MS).

1.3.1.1. Phương pháp miễn dịch hóa phát quang

- **Nguyên lý:** dựa trên phương pháp định lượng miễn dịch vi hạt CMIA. Khi kết hợp với một thuốc thử kích hoạt, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ tạo ra ánh sáng.

Dưới tác dụng của enzym, Hcy dạng kết hợp chuyển thành dạng Hcy tự do là S-adenosyl homocystein (SAH). Kháng thể đơn dòng kháng SAH có gắn acridinium sẽ cạnh tranh với SAH trong mẫu bệnh phẩm ở vị trí kết hợp đặc hiệu S-adenosyl cystein. Sau giai đoạn rửa và tách bằng từ tính, dung dịch kích hoạt (triger) và tiền kích hoạt (pre-triger) được thêm vào hỗn hợp phản ứng làm tăng độ phát quang. Hàm lượng Hcy trong mẫu bệnh phẩm được biểu thị bằng đơn vị phát quang tương ứng - RLU (Relative light units). (*package insert Abbott*).

- Xét nghiệm Hcy có thể được tiến hành tự động trên hệ thống máy miễn dịch của Abbott hoặc Siemens.

1.3.1.2. Phương pháp miễn dịch điện hóa phát quang

Nguyên lý: xét nghiệm nồng độ Hcy huyết thanh dựa trên nguyên lý xét nghiệm chu trình enzym mới, trong đó đánh giá sản phẩm chuyển đổi đồng cơ chất thay vì đánh giá đồng cơ chất hoặc sản phẩm chuyển đổi của Hcy. Trong

xét nghiệm này, trước tiên Hcy đã oxy hóa bị khử thành Hcy tự do, sau đó chất này phản ứng với một đồng cơ chất SAM, để tạo thành methionin và SAH, phản ứng xúc tác bởi Hcy S-methyltransferase. SAH được ước lượng bằng các phản ứng enzym bắt cặp trong đó SAH bị thủy phân thành adenosine và Hcy bởi SAH hydrolase. Hcy đi vào chu trình phản ứng chuyển đổi Hcy để tạo thành chu trình phản ứng khuếch đại tín hiệu phát hiện. Adenosine tạo thành lập tức bị thủy phân thành inosine và ammonia. Trong bước cuối cùng, enzym glutamate dehydrogenase (GLDH) xúc tác phản ứng của ammonia với 2-oxoglutarate và NADH để tạo thành NAD⁺. Nồng độ của Hcy trong mẫu tỷ lệ thuận với lượng NADH chuyển hóa thành NAD⁺ (ΔA_{340} nm).

Xét nghiệm được thực hiện trên hệ thống máy miễn dịch tự động của Roche bao gồm các modul E802, E601, E411...

1.3.1.3. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ

Nguyên lý: phương pháp khối phổ (Mass Spectrometry-MS) là phương pháp nghiên cứu các chất bằng cách đo, phân tích chính xác khối lượng phân tử của chất đó dựa trên sự chuyển động của các ion nguyên tử hay ion phân tử trong một điện trường hoặc từ trường nhất định. Tỷ số giữa khối lượng và điện tích (m/z) có ảnh hưởng rất lớn đối với chuyển động này của ion. Nếu biết được điện tích của ion thì ta dễ dàng xác định được khối lượng của ion đó.

Như vậy, trong nghiên cứu khối phổ của bất kỳ chất nào, trước tiên nó phải được chuyển sang trạng thái bay hơi, sau đó được ion hoá bằng các phương pháp thích hợp. Các ion tạo thành được đưa vào nghiên cứu trong bộ phân tích khối của máy khối phổ. Tùy theo loại điện tích của ion nghiên cứu mà người ta chọn kiểu quét ion dương (+) hoặc âm (-). Kiểu quét ion dương thường cho nhiều thông tin hơn về ion nghiên cứu nên được dùng phổ biến hơn.

Sau khi được tách trong hệ thống sắc ký lỏng, mẫu cần phân tích sẽ đi qua

một ống dẫn đến đầu dò MS. Tại đây diễn ra quá trình ion hóa trong buồng API với kiểu ESI, APCI hoặc APPI (là 3 nguồn ion hóa tại áp suất khí quyển). Ion sinh ra được tập trung và gia tốc bằng hệ quang học ion để đưa vào bộ phân tích khối. Tại bộ phân tích khối, tứ cực thứ nhất sẽ chọn ion mẹ có m/z xác định, các phân mảnh của ion này được tạo ra tại buồng va chạm (collision cell) nhờ tương tác với khí trơ và được phân tích nhờ tứ cực thứ ba, tạo ra tín hiệu đặc trưng tại bộ phận phát hiện ion. (nguồn Agilent 6410 Triple quad LC/MS/MS).

1.3.2. Các phương pháp xét nghiệm folat

- Phương pháp miễn dịch hóa phát quang.
- Phương pháp miễn dịch điện hóa phát quang.
- Phương pháp sắc kí lỏng khối phổ.

1.3.2.1. Phương pháp miễn dịch hóa phát quang

Nguyên lý: xét nghiệm Architect folat là xét nghiệm miễn dịch hai bước sử dụng công nghệ miễn dịch vi hạt hóa phát quang (CMIA) với quy trình xét nghiệm linh hoạt chemiflex để định lượng folat trong huyết thanh. Hai bước tiền xử lý giải phóng folat từ folat liên kết protein nội sinh. Một lượng mẫu đã tiền xử lý được chuyển vào RV thứ ba, sau đó thêm Folate Binding Protein (FBP) phủ trên vi hạt thuận từ và dung dịch pha loãng thuốc thử. Folate có trong mẫu gắn với các vi hạt phủ FBP. Sau khi rửa, chất kết hợp pteronic acid có đánh dấu acridinium được cho vào và gắn với các vị trí còn trống trên vi hạt phủ FBP. Sau đó, dung dịch Pre-Trigger và Trigger Solutions được thêm vào hỗn hợp phản ứng, phản ứng hóa phát quang hình thành được đo là đơn vị ánh sáng tương đối (RLUs). Sự tương quan tỉ lệ nghịch giữa lượng folat trong mẫu và RLUs sẽ được bộ phận quang học trong máy miễn dịch phát hiện.

Xét nghiệm folat được tiến hành tự động trên hệ thống máy miễn dịch của Abbott hoặc Siemens.

1.3.2.2. Phương pháp miễn dịch điện hóa phát quang

Nguyên lý xét nghiệm là nguyên lý miễn dịch cạnh tranh. Mẫu bệnh phẩm được ủ qua 3 bước: bước 1 ủ với chất tiền xử lý để giải phóng folat gắn protein; bước 2 ủ với protein gắn kết folat đánh dấu ruthenium; bước 3 ủ với các vi hạt phủ streptavidin và folat đánh dấu biotin hình thành phức hợp protein gắn kết folat đánh dấu ruthenium gắn kết với folat đánh dấu biotin. Toàn bộ phức hợp trở nên gắn kết với pha rắn thông qua sự tương tác giữa biotin và streptavidin. Hỗn hợp phản ứng được chuyển tới buồng đo, ở đó các vi hạt đối từ được bắt giữ trên bề mặt của điện cực. Những thành phần không gắn kết sẽ bị thải ra ngoài buồng đo bởi dung dịch ProCell/ProCell M. Cho điện áp vào điện cực sẽ tạo nên sự phát quang hóa học được đo bằng bộ khuếch đại quang tử. (package insert Cobas trên hệ thống Roche).

Xét nghiệm được thực hiện trên hệ thống miễn dịch tự động của Roche bao gồm các modul E802, E601, E411...

1.3.2.3. Phương pháp sắc kí lỏng khối phổ

Nguyên lý xét nghiệm folat bằng phương pháp sắc kí lỏng khối phổ tương tự như xét nghiệm Hcy. Các kết quả đo được dựa vào phổ khối của từng chất và ghi nhận tín hiệu ion chất cần phân tích bằng phân mềm. Phân tích dữ liệu bằng phần mềm để đọc kết quả định lượng cho từng chất.

1.3.3. Các phương pháp phát hiện đa hình gen MTHFR.

Phương pháp realtime PCR

Nguyên lý: phản ứng Realtime PCR được thực hiện trong một máy gia nhiệt có khả năng chiếu sáng mỗi một mẫu với một chùm ánh sáng có chiều dài bước sóng nhất định. Ngoài ra máy PCR còn xác định được bước sóng ánh sáng phát ra từ phân tử phát huỳnh quang bị kích hoạt trong ống PCR. Từ đó máy có thể xác định được tín hiệu huỳnh quang thay đổi sau mỗi chu kỳ do số lượng phân tử DNA được tổng hợp tăng lên. Vì vậy có thể tính được lượng sản phẩm DNA thu được sau phản ứng. Real time PCR gồm hai quá trình

diễn ra đồng thời: nhân bản DNA bằng phản ứng PCR và đo độ phát huỳnh quang tỷ lệ thuận hoặc nghịch với số đoạn DNA tạo thành.

Đánh giá kết quả: phản ứng Real-time PCR được thể hiện bằng biểu đồ khuếch đại real time PCR, gồm 3 giai đoạn:

- Giai đoạn ủ: tín hiệu huỳnh quang được tích lũy và chưa đạt được ngưỡng nhận biết của thiết bị. Khi đó, nồng độ chỉ ở mức 0 và là một đường thẳng (đường nền). Giai đoạn này chiếm khoảng 3-20 chu kì đầu.

- Giai đoạn lũy thừa: tín hiệu huỳnh quang tăng vọt lên và vượt qua đường ngưỡng do sự tăng nhanh của các bản sao. Thời điểm bản sao tăng nhanh vượt ngưỡng gọi là chu kì ngưỡng (Ct). Chu kì ngưỡng là thông số để đánh giá mức độ sao chép của gen MTHFR cần phát hiện.

- Giai đoạn bình nguyên: đồ thị đi theo đường ngang khi nồng độ bản sao đã bão hòa, không tăng lên được nữa do enzym Taq polymerase không còn hoạt động và lượng dNTP cũng hết.

Như vậy quy trình thực hiện kỹ thuật realtime PCR cũng theo nguyên tắc thông thường của phản ứng tổng hợp chuỗi. Tuy nhiên, đặc điểm khác biệt chính là đoạn DNA được nhân lên sẽ được phát hiện tại mỗi thời điểm diễn ra phản ứng. Vì vậy realtime PCR có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn phương pháp PCR thông thường và nó có thể định lượng được chính xác số bản sao được nhân lên trong các chu kì phản ứng.

Phương pháp sequencing

Nguyên lý: sequencing thực hiện dựa trên kỹ thuật phổ biến là “chain termination - kết thúc chuỗi” bằng việc sử dụng các deoxy nucleotide đã bị chỉnh sửa làm mất nhóm hydroxyl ở đầu 3’ của phân tử đường. Nhóm 3’-OH đóng vai trò cho phép gắn thêm một nucleotide mới vào chuỗi. Khi một ddNTP được thêm vào chuỗi, vì không có nhóm 3’-OH nên một nucleotide không được thêm vào, phản ứng tổng hợp sẽ dừng lại. Enzym polymerase xúc tác phản ứng

gắn các dNTP vào mạch đơn của DNA để kéo dài mạch ở vị trí 3' - OH và dừng lại nếu gắn các ddNTP vào chuỗi. Kỹ thuật giải trình tự DNA tự động (Dye termination sequencing) sử dụng các dNTP có đánh dấu huỳnh quang giúp cho việc sắp xếp trình tự DNA. Mỗi loại dNTP được gắn một màu có bước sóng phát xạ huỳnh quang khác nhau cho phép thực hiện giải trình tự trong một phản ứng duy nhất.

Nguyên tắc hoạt động của máy là trong suốt quá trình điện di, khi có một vạch điện di đi qua chùm tia laser thì vạch điện di sẽ phát sáng và được camera ghi nhận và lưu lại thành một cường độ đỉnh sáng (peak) trong biểu đồ. Từ biểu đồ của các đỉnh cường độ sáng này, máy sẽ so dòng của các đỉnh tương ứng với nhau và phân tích thành trình tự của đoạn DNA.

1.4. Các nghiên cứu về mối liên quan giữa homocystein, folat và đa hình gen MTHFR

1.4.1. Các nghiên cứu về mối liên quan giữa nồng độ homocystein, folat huyết thanh và đa hình gen MTHFR ở người khỏe mạnh

Để khảo sát mối liên quan giữa nồng độ Hcy, folat huyết thanh và đa hình gen MTHFR đã có nhiều nghiên cứu đã báo cáo về sự liên quan này trong cộng đồng làm cơ sở cho những nghiên cứu trên các bệnh lý khác nhau.

Alessio và cộng sự ⁹¹ đã nghiên cứu thấy rằng các đa hình 677T và A1298C ở gen MTHFR có sự liên quan có ý nghĩa thống kê với sự tăng nồng độ Hcy huyết thanh. Nồng độ folat không có khác biệt đáng kể trong mỗi nhóm đa hình. Nghiên cứu gợi ý rằng có yếu tố di truyền (gen MTHFR) ảnh hưởng đến nồng độ Hcy, mà không liên quan tới folat trong huyết thanh.

Yang và cs năm 2008 đã tiến hành một nghiên cứu qui mô lớn (n= 6793) và thấy trong những người mang đa hình MTHFR đã có Hcy huyết thanh cao hơn và mức folat huyết thanh thấp hơn nhóm không mang đa hình. Người mang đa hình gen MTHFR (C677T) có mức folat huyết thanh thấp hơn 22% và nồng

độ Hcy cao hơn 25,7% so với kiểu gen CC. Nghiên cứu cũng kết luận rằng việc bổ sung acid folic làm giảm nồng độ Hcy trong nhóm người mang đa hình gen MTHFR ($p < 0,001$).⁹² Một nghiên cứu khác gần đây của Juan Ni và cs⁹³ nghiên cứu trên đối tượng người khỏe mạnh bao gồm 330 tình nguyện viên (164 nam và 166 nữ). Tác giả đã khảo sát mối liên quan giữa nồng độ Hcy, folat huyết thanh và đa hình gen MTHFR vị trí 677 C→T trên đối tượng nghiên cứu và nhận thấy: có mối tương quan nghịch giữa nồng độ Hcy và folat huyết thanh với $r = -0,252$. Nam giới có nồng độ Hcy huyết thanh cao hơn đáng kể so với nữ giới ($p < 0,001$). Các cá thể có kiểu gen MTHFR 677TT có nồng độ Hcy trong huyết thanh cao hơn đáng kể so với các cá thể có kiểu gen CC và CT ($p < 0,001$). Như vậy, trên đối tượng người khỏe mạnh, các tác giả đã chứng minh có mối liên quan giữa nồng độ Hcy và các đa hình gen MTHFR đặc biệt là vị trí C677T, nồng độ Hcy và folat huyết thanh có mối tương quan nghịch nhưng không chặt chẽ.

1.4.2. Các nghiên cứu về mối liên quan giữa nồng độ Hcy, folat và đa hình gen MTHFR ở phụ nữ có bất thường sinh sản

Đã có nhiều nghiên cứu về mối liên quan giữa nồng độ Hcy, folat huyết thanh và đa hình gen MTHFR ở đối tượng có bất thường sinh sản trên thế giới. Tuy nhiên các chủng tộc hay các quốc gia khác nhau thì có các kết quả khác nhau, vì vậy vẫn còn nhiều tranh cãi xung quanh việc các đa hình gen MTHFR, nồng độ Hcy cao và folat thấp có thực sự là yếu tố nguy cơ của các bất thường sinh sản và là các yếu tố nguy cơ độc lập hay phụ thuộc trong việc tương tác trong quá trình chuyển hóa.

Manju Puri⁹⁴ phân tích tại Ấn Độ về đa hình gen MTHFR C677T, nồng độ folat, vitamin B12 và Hcy trong huyết thanh trên nhóm phụ nữ có tiền sử mất thai tái phát. Kết quả nghiên cứu trên 107 phụ nữ có tiền sử mất thai tái phát và 343 phụ nữ đã sinh con bình thường làm nhóm chứng cho thấy

không có sự khác biệt về tính đa hình gen với $p= 0.409$. Đa hình gen MTHFR có liên quan đến tăng Hcy trong nhóm bệnh với $p= 0,031$. Sự tăng nồng độ Hcy có liên quan đến tình trạng mất thai tái phát với tỷ suất chệch $OR=7,02$. Việc thiếu folat không rõ ràng ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng.

Wendell Vilas Boas ⁹⁵ nghiên cứu tại Brazil trên 89 phụ nữ có tiền sử sảy thai hoặc thai chết lưu và 150 phụ nữ khỏe mạnh từng sinh con làm nhóm chứng. Tác giả nhận thấy không có sự khác biệt giữa hai nhóm về tính đa hình của các gen C677T, A1298C và A2798G, nồng độ Hcy, folat và vitamin B12 huyết thanh cũng không có sự khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm chứng. Tuy nhiên, khi phân tích hồi quy tuyến tính thì nhận thấy có sự phụ thuộc của nồng độ folat huyết thanh trong việc duy trì nồng độ Hcy.

Zhong Lin ⁹⁶ nghiên cứu trên 403 phụ nữ có tiền sử mất thai tái phát và 342 phụ nữ khỏe mạnh được chọn ngẫu nhiên tại Trung Quốc. Kết quả cho thấy không có sự khác biệt về nồng độ folat giữa nhóm bệnh và nhóm chứng ($p= 0,072$) nhưng có sự khác biệt về nồng độ Hcy huyết thanh ($p= 0,018$). Tần suất xuất hiện alen T của SNP 677 gen MTHFR trên nhóm bệnh so với nhóm chứng có sự khác biệt rõ rệt ($p < 0,001$). Tần suất xuất hiện alen C của SNP 1298 gen MTHFR ở nhóm bệnh và nhóm chứng có sự khác biệt ($p= 0,046$).

Mới đây Radhika Kedar và cs đã mô tả mối liên quan giữa nồng độ Hcy, folat huyết thanh và đa hình gen MTHFR thông qua việc nghiên cứu 118 đối tượng là các bà mẹ đã sinh con mắc hội chứng Down và 118 bà mẹ đã sinh con khỏe mạnh cùng độ tuổi làm nhóm chứng. Kết quả chỉ ra rằng đa hình gen MTHFR vị trí 677 chiếm 64,4% trong nhóm bà mẹ có con mắc hội chứng Down nhưng chỉ chiếm 33% trong nhóm chứng với $OR = 4,1$. Nồng độ folat thấp hơn và nồng độ Hcy cao hơn ở nhóm bệnh so với nhóm chứng ($p < 0,01$).⁹⁷

Để đánh giá tác động của việc bổ sung các chế phẩm của folat lên nồng độ Hcy huyết thanh và sự tương tác trong các đa hình gen MTHFR, Azita

Hekmatdoost ⁹⁸ đã bổ sung cho nhóm phụ nữ có tiền sử mất thai tái phát bao gồm 220 đối tượng chia thành hai nhóm, 1 nhóm sử dụng acid folic và 1 nhóm sử dụng 5MTHF với hàm lượng 1mg/ ngày. Kết quả cho thấy nồng độ folat ở nhóm bổ sung 5MTHF tăng cao hơn đáng kể so với nhóm bổ sung acid folic ($p < 0,001$). Nồng độ Hcy giảm ở cả hai nhóm và không có sự khác biệt ở 2 nhóm ($p=0,47$). Không có sự khác biệt rõ ràng về nồng độ Hcy và folat sau bổ sung theo các đa hình C677T và A1298C của gen MTHFR.

Như vậy, các nghiên cứu trên thế giới còn chưa có sự đồng thuận, đa phần chỉ ra có sự liên quan của việc tăng nồng độ Hcy đến các bất thường sinh sản, đa hình gen MTHFR có liên quan không rõ ràng và chưa thấy có sự liên quan của việc giảm nồng độ folat huyết thanh đến các bất thường sinh sản.

1.4.3. Các nghiên cứu về mối liên quan giữa nồng độ Hcy, folat huyết thanh và đa hình gen MTHFR ở một số bệnh lý khác

Nồng độ Hcy cao được coi là một yếu tố nguy cơ của một số bệnh quan trọng. Trong bệnh xơ vữa và huyết khối mạch máu,⁹⁹ tác giả ước tính có tới 10% tổng số ca tử vong do bệnh mạch vành, tức là hơn 50.000 ca mỗi năm ở Hoa Kỳ có tăng nồng độ Hcy máu. Khi tăng nồng độ Hcy lên 5 μmol có thể làm tăng nguy cơ mắc bệnh mạch vành lên 60% ở nam giới và 80% ở phụ nữ¹⁰⁰. Sự gia tăng này cũng liên quan đến việc tăng 50% và 6,8 lần nguy cơ mắc các bệnh mạch máu não và động mạch ngoại vi. Các tác giả ghi nhận rằng nồng độ Hcy ở mức rất cao dẫn đến biến chứng nghiêm trọng và thường tử vong sớm. Nguyên nhân di truyền phổ biến nhất gây tăng Hcy trong dân số nói chung là đa hình gen C677T của gen MTHFR.¹⁰¹

Ingvar Bjelland (2003) đề cập liên quan đến chứng rối loạn lo âu, trầm cảm.¹⁰² Tác giả đã sử dụng thang điểm đánh giá chứng lo âu, trầm cảm (HADS) của bệnh viện tại Na Uy để đánh giá và lựa chọn được 5948 cá nhân tham gia nghiên cứu. Kết quả cho thấy, nồng độ Hcy trong máu cao $\geq 15 \mu\text{mol/L}$ ở nhóm có rối loạn lo âu trầm cảm so với nhóm bình thường với $\text{OR}=1,9$ với khoảng tin cậy 95% là 1,11-3,25. Đa hình gen MTHFR 677TT của nhóm bệnh so với

nhóm chứng là 1,69 95% CI = 1,09-2,62. Không tìm thấy sự khác biệt giữa nồng độ folat và vitamine B12 cho đối tượng mắc chứng lo âu, trầm cảm.

Intessar Emam (2006) mô tả liên quan đến bệnh tim mạch¹⁰³ và đưa ra kết quả: nồng độ Hcy huyết thanh ở nhóm bệnh nhân có xơ vữa mạch vành ($16,12 \pm 5,09 \mu\text{mol/L}$), ở bệnh nhân nhồi máu não ($16,79 \pm 5,93 \mu\text{mol/L}$) so với nhóm chứng ($10,43 \pm 2,57 \mu\text{mol/L}$) ($p < 0,01$). Nồng độ acid folic không có sự khác biệt giữa các nhóm. Khi đánh giá mối tương quan giữa nồng độ Hcy và các đa hình gen MTHFR tác giả nhận thấy nồng độ Hcy cao hơn đáng kể ở đối tượng có kiểu gen TT ($18,26 \pm 2,75 \mu\text{mol/L}$) và đối tượng kiểu gen CT ($17,60 \pm 7,22 \mu\text{mol/L}$) so với đối tượng kiểu gen CC ($12,94 \pm 4,16 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,01$). Tuy nhiên đa hình gen MTHFR A1298C không có sự khác biệt về nồng độ Hcy huyết thanh giữa các nhóm.

Agustin Oterino (2009) mô tả trên bệnh nhân đau nửa đầu,¹⁰⁴ tác giả nhận thấy nồng độ Hcy cao hơn ở nhóm bệnh nhân đau nửa đầu so với nhóm chứng. Đa hình gen MTHFR 677TT có thể hữu ích để xác định những bệnh nhân có nguy cơ cao mắc chứng đau nửa đầu.

Một số nghiên cứu hồi cứu cho thấy nồng độ Hcy toàn phần trong huyết thanh tăng ở bệnh nhân suy thận và mức lọc cầu thận thấp hơn có liên quan đến nồng độ Hcy huyết thanh cao hơn. Những người có kiểu gen TT vị trí 677 của gen MTHFR so với những người có kiểu gen CC có mức nồng độ Hcy cao hơn 25% và nguy cơ mắc bệnh tim thiếu máu cục bộ cao hơn 16%.¹⁰⁵ Ngoài ra, đa hình C677T là yếu tố nguy cơ phát triển bệnh thận do đái tháo đường ở bệnh nhân đái tháo đường type 2.¹⁰⁶

Sự biến đổi của nồng độ Hcy, folat và đa hình gen MTHFR được nghiên cứu trong nhiều bệnh lý khác nhau, trong khuôn khổ của luận án, chúng tôi nghiên cứu trên nhóm đối tượng có tiền sử mất thai tái diễn.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng nghiên cứu

❖ Tiêu chuẩn cho nhóm bệnh

Đối tượng nghiên cứu là phụ nữ trong độ tuổi sinh sản từ 18-45 tuổi, có tiền sử thai chết lưu liên tiếp hai lần trở lên đã được loại trừ các nguyên nhân gây thai chết lưu thường gặp bao gồm:

- Có kết quả âm tính với hội chứng antiphospholipid;
- Không có bất thường tử cung, buồng trứng;
- Nội tiết tố bình thường (FSH, LH);
- Rh (+)
- NST đồ của cả hai vợ chồng bình thường;
- Tinh dịch đồ của chồng bình thường, tỷ lệ đứt gãy DNA tinh trùng < 15%;
- Chiều cao $\geq 150\text{cm}$ và cân nặng $\geq 40\text{kg}$ hoặc có BMI từ 18,5 đến 25
- Không dùng các chế phẩm có acid folic ít nhất 4 tuần.

❖ Tiêu chuẩn cho nhóm chứng

Đối tượng nghiên cứu trong nhóm chứng là phụ nữ ở độ tuổi 18-45 đã từng sinh con khỏe mạnh ngay lần có thai đầu tiên, không có tiền sử sảy thai, thai chết lưu và không có tiền sử mang thai dị tật.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

Bệnh nhân có bệnh lý tâm thần;

Bệnh nhân có bệnh lý suy giảm miễn dịch HIV/AIDS;

Bệnh nhân mắc bệnh lý mạn tính: đái tháo đường, tăng huyết áp, bệnh lý tim mạch; suy gan, suy thận.

2.1.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

❖ Thời gian: nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1 năm 2017 đến tháng 6 năm 2020.

❖ Địa điểm: Bộ môn Y sinh học - Di truyền Trường Đại Học Y Hà Nội và Bệnh viện Đa khoa MEDLATEC.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu được thiết kế theo phương pháp nghiên cứu bệnh – chứng.

2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

Cỡ mẫu được ước tính theo 3 biến số nghiên cứu là nồng độ Hcy, nồng độ folat và đa hình gen MTHFR theo những nghiên cứu trước đó. Theo các nghiên cứu đã báo cáo, đa hình vị trí 677 có ý nghĩa hơn vị trí 1298 trong mối liên quan đến các bất thường sinh sản vì vậy chúng tôi không lựa chọn tính cỡ mẫu theo đa hình vị trí 1298.

2.2.2.1. Ước tính cỡ mẫu theo đa hình gen MTHFR C677T.

Ước tính cỡ mẫu cho tỷ số nguy cơ giữa bệnh nhân có đa hình C677T và tình trạng thai chết lưu tái phát.

- Công thức tính cỡ mẫu:¹⁰⁷

$$n = \left(\frac{r+1}{r}\right) \frac{(\bar{p})(1-\bar{p})(Z_{\beta} + Z_{\alpha/2})^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

- Trong đó:

+ $r = 1$ là tỷ số giữa nhóm chứng so với nhóm bệnh.

+ $p_1 = 0,724$ là tỷ lệ bệnh nhân có đa hình C677T trong nhóm phụ nữ có tiền sử thai chết lưu tái phát.¹⁰⁸

+ $p_2 = 0,528$ là tỷ lệ bệnh nhân có đa hình C677T trong nhóm không có tiền sử thai chết lưu tái phát mà có thai bình thường ngay lần đầu mang thai.¹⁰⁸

+ \bar{p} là giá trị trung bình của p_1 và p_2 .

+ $Z_{\alpha/2}$, Z_{β} là hằng số được rút ra từ phân phối chuẩn. Từ đó ta có được bảng giá trị $(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2$ như sau:

Bảng 2.1: Hằng số C liên quan đến sai sót loại I và II

$\alpha =$	$\beta = 0.20$ (Power = 0.80)	$\beta = 0.10$ (Power = 0.90)	$\beta = 0.05$ (Power = 0.95)
0.10	6.15	8.53	10.79
0.05	7.85	10.51	13.00
0.01	13.33	16.74	19.84

- Từ các số liệu trên ta tính được cỡ mẫu như sau:

$$n = \frac{(1+1)}{1} \times \frac{0,626 \times 0,374}{(0,724 - 0,528) \times (0,724 - 0,528)} \times (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2$$

- Kết quả tính cỡ mẫu tương ứng cho mỗi nhóm với mức α , β như sau:

Bảng 2.2: Ước tính cỡ mẫu theo đa hình gen liên quan đến thai chết lưu tái phát theo mức sai sót loại I và II

$\alpha \backslash \beta$	0,20 (power = 0,80)	0,10 (power = 0,90)	0,05 (power = 0,95)
0,10	76	104	132
0,05	96	128	159
0,01	163	204	242

Lựa chọn α và β đều bằng 0,1 thì cỡ mẫu là $n=104$ cho mỗi nhóm.

2.2.2.2. Ước tính cỡ mẫu theo biến đổi nồng độ Hcy huyết thanh

- Áp dụng công thức tính cỡ mẫu:¹⁰⁷

$$n = \left(\frac{r+1}{r}\right) \frac{\sigma^2 (Z_{\beta} + Z_{\alpha/2})^2}{(\text{difference})^2}$$

- Trong đó:

+ $r = 1$ là tỷ số giữa nhóm chứng so với nhóm bệnh.

+ $\sigma = 2,61$ độ lệch chuẩn rút ra từ nghiên cứu trước đó.¹⁰⁹

+ Difference là sự khác biệt giữa giá trị trung bình của nồng độ Hcy giữa nhóm thai chết lưu tái phát và nhóm chứng (8,95 – 7,32) $\mu\text{mol/L}$.^{109,110}

- Áp dụng công thức chúng ta thu được kết quả như sau:

Bảng 2.3: Ước tính cỡ mẫu theo sự biến thiên của homocystein liên quan đến sẩy thai và/hoặc thai chết lưu tương ứng với các mức sai sót loại I và II

$\alpha \backslash \beta$	0,20 (power = 0,80)	0,10 (power = 0,90)	0,05 (power = 0,95)
0,10	32	44	56
0,05	36	55	67
0,01	70	87	103

Lựa chọn α và β đều bằng 0,1 thì cỡ mẫu là n=44 cho mỗi nhóm

2.2.2.3. Ước tính cỡ mẫu theo nồng độ folat

- Áp dụng công thức tương tự công thức tính theo nồng độ Hcy.¹¹⁶

- r = 1 là tỷ số giữa nhóm chứng so với nhóm bệnh.

- $\sigma = 9,00$ độ lệch chuẩn rút ra từ nghiên cứu trước đó.¹¹¹

- difference là sự khác biệt giữa giá trị trung bình của nồng độ folat huyết thanh của nhóm bệnh và nhóm chứng (22,00 – 27,00) nmol/L .¹¹¹

Bảng 2.4. Kết quả tính cỡ mẫu tương ứng cho mỗi nhóm với mức α , β

$\alpha \backslash \beta$	0,20 (power = 0,80)	0,10 (power = 0,90)	0,05 (power = 0,95)
0,10	40	56	70
0,05	51	69	85
0,01	87	109	129

Từ công thức tính cỡ mẫu đã đưa ra và đánh giá tính khả thi của đề tài

chúng tôi đã sử dụng mức $\alpha = 0,10$, $\beta = 0,10$ (power = 0,90), lựa chọn cỡ mẫu lớn nhất theo 3 biến là 104 cho nhóm bệnh và ước tính 15% đối tượng có thể bị loại khỏi nghiên cứu. Từ đó tính được cỡ mẫu lựa chọn cho nhóm bệnh là 120, tỷ lệ nghiên cứu lựa chọn là 1:1 như vậy cỡ mẫu cho mỗi nhóm bệnh và nhóm chứng là 120, tổng số đối tượng tham gia nghiên cứu là 240.

Kết quả thực tế chúng tôi đã thu thập được 128 bệnh nhân nhóm bệnh và 126 bệnh nhân nhóm chứng.

2.3. Thu thập mẫu và biến số nghiên cứu

2.3.1. Các bước tiến hành

- Bước 1: 128 đối tượng nhóm bệnh và 126 đối tượng nhóm chứng đáp ứng tiêu chí chọn bệnh nhân tại mục 2.1.1 và không vi phạm tiêu chuẩn loại trừ tại mục 2.1.2 sẽ được thăm khám và khai thác thông tin vào bệnh án nghiên cứu (phụ lục 1 và 2). Các thông tin thu thập bao gồm: tuổi, nghề nghiệp, tiền sử thai sản, số lần mang thai, số lần có bất thường thai sản, các xét nghiệm đã có, các bệnh mạn tính đã được chẩn đoán, các thuốc đã dùng.

- Bước 2: đối tượng nghiên cứu được lấy máu tĩnh mạch vào 2 ống, một ống chống đông EDTA để làm xét nghiệm gen và một ống không có chống đông để tách huyết thanh làm xét nghiệm Hcy và folat.

- Bước 3: đối với mẫu chống đông bằng EDTA thì lưu trữ lạnh -20°C và làm tập trung tại bộ môn Y sinh học di truyền, Trường Đại học Y Hà Nội để xác định đa hình gen MTHFR. Mẫu làm xét nghiệm Hcy và folat được bảo quản lạnh và chuyển về Bệnh viện Đa khoa MEDLATEC trong vòng 4 giờ để ly tâm và thực hiện xét nghiệm. Đối với các mẫu máu không thực hiện được xét nghiệm trong vòng 4 giờ thì ly tâm ngay tách huyết thanh, bảo quản ở nhiệt độ -20°C và làm xét nghiệm trong vòng 7 ngày.

- Bước 4: đối với mẫu phân tích gen MTHFR sẽ được tách chiết theo phụ

lục 3 và xác định đa hình gen bằng phương pháp real time theo phụ lục 4. Đối với mẫu xét nghiệm Hcy và folat thực hiện theo hướng dẫn thực hiện xét nghiệm trên hệ thống miễn dịch Achitech (phụ lục 5).

- Bước 5: kết quả phân tích gen MTHFR được kiểm chứng lại 20 mẫu ngẫu nhiên bao gồm 10 mẫu nhóm bệnh và 10 mẫu nhóm chứng bằng phương pháp giải trình tự trên hệ thống máy ABI 3500.

- Bước 6: phân tích các kết quả nồng độ Hcy, folat và đa hình gen MTHFR để đánh giá kết quả nghiên cứu.

2.3.2. Biến số nghiên cứu

- Tuổi phụ nữ: độ tuổi sinh sản tốt nhất ở phụ nữ là 18-35, tuy nhiên độ tuổi có khả năng sinh sản là 15-49 tuổi (WHO). Theo vấn đề pháp lý và khả năng sinh sản tại Việt Nam, độ tuổi được lựa chọn nghiên cứu là 18-45 tuổi cho cả hai nhóm bệnh và chứng. Phụ nữ ≥ 35 tuổi được cho là có nguy cơ cao trong việc mang thai và sinh con. Vì vậy, chúng tôi cũng phân tích so sánh các kết quả nghiên cứu theo 2 nhóm tuổi < 35 tuổi và ≥ 35 tuổi.

- Chiều cao, cân nặng: Jose GB Derraik (2016)¹¹² đã chỉ ra rằng các phụ nữ có chiều cao $< 155\text{cm}$ hoặc $< -2\text{SD}$ dưới mức trung bình của dân số có tỷ lệ sinh non so với nhóm phụ nữ cao hơn với $\text{OR} = 1,65$. Saba W Masho (2013)¹¹³ cũng chỉ ra các bà mẹ thiếu cân hoặc thừa cân cũng có khả năng ảnh hưởng đến thai kì. Ở Việt Nam chưa có các nghiên cứu về chiều cao và cân nặng của mẹ ảnh hưởng đến quá trình mang thai, tuy nhiên nhóm nghiên cứu cũng thống nhất lấy nhóm phụ nữ cả nhóm bệnh và nhóm chứng là có chiều cao $\geq 150\text{cm}$ và cân nặng $\geq 40\text{kg}$ hoặc có BMI từ 18,5 đến 25.

- Số lần thai chết lưu: theo Hiệp hội Y học sinh sản Hoa Kỳ (ASRM), sảy thai, thai chết lưu tái diễn (Recurrent Pregnancy Loss - RPL/ gọi chung là mất thai tái diễn) được định nghĩa là mất thai từ hai lần trở lên (sự mất thai được ghi nhận bởi bác sĩ sản phụ khoa thông qua hồ sơ).

- Nồng độ Hcy, folat huyết thanh;

- Các dạng đa hình gen MTHFR.

2.4. Trang thiết bị, dụng cụ và hóa chất nghiên cứu

2.4.1. Trang thiết bị, dụng cụ

- Hệ thống phân tích tự động của Abbott (modul I2000 Architech plus).
- Máy li tâm Hettich model Rotanta 460.
- Máy real time CFX 960.
- Máy giải trình tự Analyzer ABI3500.
- Máy li tâm để bàn Eppendorf (Đức).
- Máy Voltex – Genie 2.
- Máy quang phổ kế Nano drop 2000C.
- Tủ lạnh (Sam sung).
- Tủ lạnh sâu: - 20°C Sanyo.
- Micropipet (Eppendorf) các mức thể tích.
- Đầu côn các loại thể tích.
- Ống eppendorf thể tích 1,5 mL và 0,2 mL vô trùng.
- Nồi hấp ước.

2.4.2. Hóa chất

Hóa chất cho xét nghiệm folat:

+ Microparticles: Anti-Folate Binding Protein (chuột, kháng thể đơn dòng) bắt cặp với vi hạt gắn ái lực với Folate Binding Protein (bò), trong dung dịch đệm TRIS với chất ổn định protein (albumin huyết thanh bò và dê). Nồng độ tối thiểu: 0,08% rắn. Chất bảo quản: Sodium Azide và các tác nhân kháng khuẩn.

+ Conjugate: Pteric Acid (PTA) chất kết hợp có đánh dấu acridinium trong dung dịch đệm MES với chất ổn định protein (lợn). Nồng độ tối thiểu: 4 ng/mL.

+ Assay specific diluent: dung dịch pha loãng xét nghiệm Folat chứa dung

dịch đệm borate. Chất bảo quản: Sodium Azide và các tác nhân kháng khuẩn.

+ Pre treatment reagent 1: Folate Pre-Treatment Reagent 1 chứa potassium hydroxide.

+ Pre treatment reagent 2: Folate Pre-Treatment Reagent 2 chứa dithiothreitol (DDT) trong dung dịch đệm acid acetic với EDTA.

+ Specimen diluent: Folate Specimen Diluent chứa dung dịch đệm TRIS với chất ổn định protein (albumin huyết thanh người). Chất bảo quản: Sodium Azide.

Hóa chất cho xét nghiệm Hcy:

+ Kit thuốc thử Architech Hcy gồm 4 lọ: vi hạt (Microparticles), chất liên hợp (Conjugate), men (Enzym), chất khử (reductant).

+ Một số dung dịch cần thiết khác: chất kích hoạt (trigger), tiền kích hoạt (pre-trigger), dung dịch đệm, dung dịch rửa máy, các dung dịch định chuẩn Hcy và huyết thanh kiểm tra.

Hóa chất cho phân tích gen MTHFR:

+ Hóa chất tách chiết: DNA Qia gen blood mini kit.

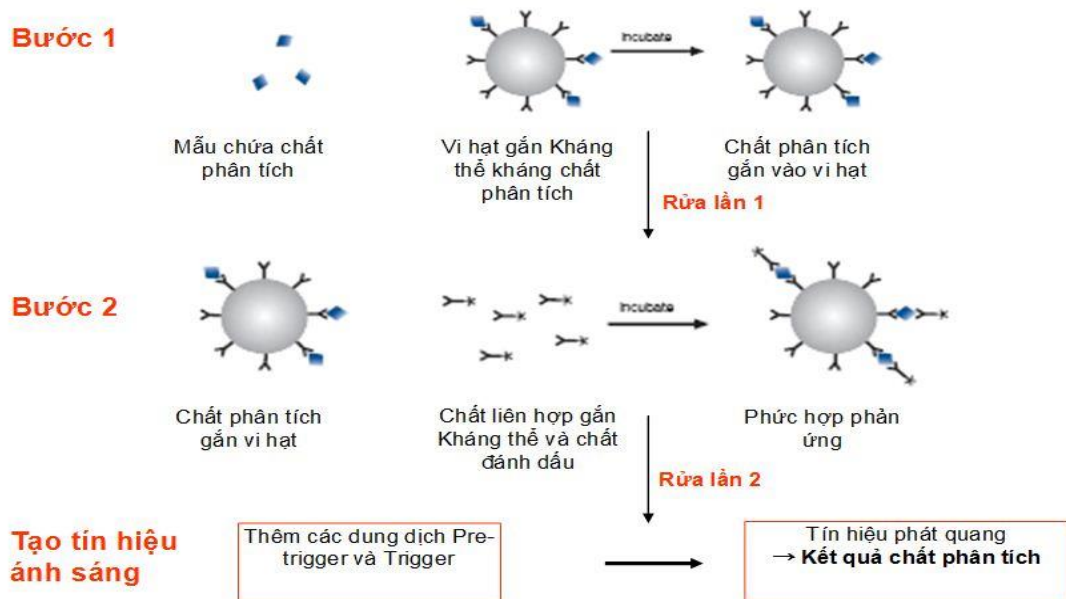
+ Taq 2X Master Mix (New England Biolab, Ipswich, MA).

+ ABI Big Dye Terminator v 3.1 Sequencing Standard Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

2.5. Quy trình kỹ thuật

2.5.1. Quy trình xét nghiệm Hcy, folat

- Xét nghiệm Hcy và folat đều thực hiện trên máy miễn dịch tự động Architech của Abbott theo hướng dẫn của phụ lục 5.



Hình 2.1. Mô phỏng các bước trong quy trình xét nghiệm Hcy và folat

2.5.2. Kiểm soát chất lượng và báo cáo kết quả

Kiểm soát chất lượng

- Mẫu nội kiểm được thực hiện đầu ngày theo lịch quy định gồm ba mẫu QC là Control L, Control M, Control H. Đây là những mẫu QC dạng nước, bảo quản ở 2-8°C. Đầu ngày làm việc, hóa chất QC được lấy ra ngoài khỏi tủ lạnh phải để ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút, trước khi thực hiện QC phải trộn đều.

- Kiểm soát kết quả nội kiểm bằng cách đánh giá kết quả phân tích QC hàng ngày ở các mức theo quy tắc của Westgard, đặc biệt là 8 quy tắc thường dùng 1_{2s} , 1_{3s} , R_{4s} , 2_{2s} , 4_{1s} , 10_x , hiện tượng lệch (Shift), hiện tượng trượt (Trend).

- Định kỳ thực hiện Cal lại xét nghiệm theo thời gian khuyến cáo, sau khi thay lô hóa chất mới hay sau khi bảo dưỡng máy có tác động trực tiếp đến hệ thống phân tích hoặc khi có kết quả QC không đạt.

Kết quả và báo cáo kết quả

- Theo dõi kết quả từ máy phân tích đồ ra. Kiểm tra các lỗi cảnh báo, nếu nghi ngờ kết quả cần xem xét lại máy, hóa chất và chạy lặp lại để khẳng định kết quả.

- Khoảng tham chiếu: (*package insert của nhà sản xuất*)

Folat: + Đơn vị đo: ng/mL

+ Khoảng tham chiếu: 3.1 – 20.5 ng/mL

Homocystein:

+ Đơn vị đo: $\mu\text{mol/L}$

+ Khoảng tham chiếu cho nữ: 4,44 -13,56 $\mu\text{mol/L}$

2.5.3. Phát hiện đa hình gen *MTHFR*

2.5.3.1. Phương pháp realtime PCR

- Mẫu máu toàn phần từ các đối tượng nghiên cứu được chống đông bằng EDTA. DNA được tách từ máu bằng kit tách chiết DNA Qiagen blood mini kit.

- Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được xác định bởi máy Nanodrop, tỷ lệ OD 260/280 và 260/230 có kết quả từ 1,8 đến 2,0 là mẫu DNA đạt tiêu chuẩn.

- Sử dụng bộ kit real time PCR SNP-Express-RT của hãng Lytech (Moscow, Russia). Phân tích đa hình gen được thực hiện trên máy Biorad CF96 (USA)

Bảng 2.5. Thành phần phản ứng

Thành phần	Thể tích/ phản ứng
Master Mix: Taqman probe FAM, HEX, môi F, môi R, dNTP, Taq polymerase	25 μL
DNA mẫu	5 μL (500ng DNA)
Tổng thể tích	30 μL

Bảng 2.6. Chu kỳ nhiệt của phản ứng realtime PCR

Chu kì	Nhiệt độ	Thời gian
Biến tính	95°C	15 phút
Khuyếch đại: 25 chu kì bao gồm		
Biến tính	94°C	30 giây
Gắn môi	62°C	1 phút
Kéo dài	72°C	1 phút
Kết thúc	72°C	15 phút

Phân tích kết quả: Chu kì ngưỡng (Ct) xuất hiện trước chu kì 30 được đánh giá là đạt chất lượng.

Chất huỳnh quang HEX (xanh lá cây) được gắn với probe đặc hiệu tại C677 MTHFR hoặc A1298 MTHFR, chất huỳnh quang FAM (xanh lam) được gắn với probe đặc hiệu tại T677 MTHFR hoặc C1298 MTHFR.

- Đồng hợp tử bình thường: tín hiệu huỳnh quang màu HEX vượt đường base line trước chu kì 30, tín hiệu màu FAM không vượt ngưỡng base line.

- Dị hợp tử đa hình: Cả màu HEX và FAM đều có tín hiệu vượt đường base line trước chu kì 30.

- Đồng hợp tử đa hình: tín hiệu huỳnh quang màu FAM vượt đường base line trước chu kì 30, tín hiệu màu HEX không vượt ngưỡng base line.

2.5.3.2. Phương pháp giải trình tự

DNA được tách từ máu toàn phần bằng kit DNA Qiagen blood mini kit theo quy trình khuyến cáo của nhà sản xuất gồm 10 bước (phụ lục 3). Sau đó DNA trong mẫu bệnh phẩm được khuếch đại trong phản ứng PCR (Bảng 2.7 và 2.8). Tinh sạch sản phẩm PCR, sử dụng phương pháp rửa Ethanol/EDTA. Phản ứng giải trình tự sử dụng kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems Inc, ABI, Foster City, CA, USA). Giải trình tự 1 chiều. Sản phẩm sau giải trình tự tiếp tục được tinh sạch bằng phương pháp rửa Ethanol/EDTA và điện di trên

Genetic Analyzer ABI3500 (ABI). Kết quả giải trình tự được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích v5.1 DNA Sequencing của ABI và so sánh với trình tự đã được công bố trên Gene Bank.

Bảng 2.7. Trình tự môi của phản ứng sequencing

Gen MTHFR	Trình tự môi
C677T	5'TGGGAAGAACTCAGCGAACT3' F 5' GGAAGGTGCAAGATCAGAGC 3' R
A1298C	5' ACAGGATGGGGAAGTCACAG 3' F 5'TCTACCGTACCCAGGAGTGG 3' R

Thành phần phản ứng bao gồm:

- Genomic DNA: 25 µl chứa 25–50 ng.
- Môi F: 0,5 pmol.
- Môi R: 0,5 pmol.
- Taq 2X Master Mix: 12,5 µL.
- Tổng thể tích: 37,5 µL.

Bảng 2.8. Chu kỳ nhiệt của sequencing

STT	Chu kỳ	Nhiệt độ	Thời gian
1	Khởi đầu	95°C	2 phút
2	Biến tính	95°C	30 s
3	Gắn môi	60°C	30 s
4	Kéo dài	72°C	1 phút
5	Kéo dài ổn định	72°C	5 phút
6	Bảo quản	4°C	

Nhận định kết quả:

- Màu sắc các đỉnh tín hiệu huỳnh quang tương ứng với các loại nucleotid

như sau: Adenin (A): màu xanh lá cây, Cytosin (C): màu xanh dương, Thymin (T): màu đỏ, G (Guanin): màu đen.

Kết quả phân tích gen MTHFR tại vị trí 677 là đồng hợp tử bình thường khi chỉ có 1 peak màu xanh dương tương ứng với CC, dị hợp tử khi 1 peak có màu xanh dương, 1 peak có màu đỏ tương ứng với CT và đa hình đồng hợp tử khi chỉ có 1 peak màu đỏ tương ứng với TT.

Kết quả gen MTHFR tại vị trí 1298 là đồng hợp tử bình thường khi chỉ có 1 peak màu xanh lá cây (AA), dị hợp tử khi có 1 peak màu xanh lá cây, 1 peak có màu xanh dương (AC) và đa hình đồng hợp tử khi chỉ có 1 peak màu xanh dương (CC).

2.6. Xử lý và phân tích số liệu

2.6.1. Xử lý số liệu

Số liệu thu được trong nghiên cứu được phân tích theo phương pháp xác suất thống kê y sinh học. Phần mềm được dùng để xử lý số liệu là R language version 3.6.3.

Các thuật toán sử dụng trong nghiên cứu:

- Giá trị trung bình (\bar{X});
- Độ lệch chuẩn (SD);
- Tỷ lệ (%);
- So sánh hai giá trị trung bình bằng T – Student test;
- So sánh các tỷ lệ bằng kiểm định χ^2 ;
- So sánh các tỷ lệ trong cùng một nhóm Wilcoxon test hoặc sign test.

Sự khác biệt giữa hai nhóm có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$. Phân tích được thực hiện với package compare Groups và tidyverse.

2.6.2. Xây dựng ngưỡng cắt tối ưu cho chẩn đoán tăng nồng độ homocystein và folat huyết thanh

Ngưỡng cắt tối ưu cho Hcy được xác định bằng phương pháp đánh giá 8 tiêu chí của ma trận lẫn lộn (confusion matrix) bao gồm: độ nhạy (sensitivity – TPR), độ đặc hiệu (specificity – SPC), giá trị dự đoán dương tính (positive predicted value – PPV), giá trị dự đoán âm tính (negative predicted value – NPV), độ chính xác cân bằng (balanced accuracy – BAC), chỉ số trung bình điều hòa giữa PPV và TPR (F1 score), thước đo chính xác dự đoán cân đối giữa độ nhạy và độ đặc hiệu (bookmaker informedness – BM), khoảng cách Euclide giữa độ nhạy và độ đặc hiệu ký hiệu (d-distance) là ngắn nhất.

Các phân tích trên được thực hiện với packages pROC trên phần mềm R language version 3.6.3.

Tình trạng thực tế		
Tình trạng dương tính	Tình trạng âm tính	
Dương tính - đúng (TP)	Dương tính - sai (FP)	Độ nhạy $\frac{TP}{TP + FN}$ (TPR)
Âm tính - sai (FN)	Âm tính - đúng (TN)	Độ đặc hiệu $\frac{TN}{TN + FP}$ (SPC)
Giá trị dự báo dương tính $\frac{TP}{TP + FP}$ (PPV)	F1 Score $\frac{2TP}{(2TP + FP + FN)}$ (F1 Score)	Khoảng cách Euclid $\sqrt{(1-TPR)^2 + (1-SPC)^2}$ (distance)
Giá trị dự báo âm tính $\frac{TN}{TN + FN}$ (NPV)	Accuracy cân bằng $\frac{TPR + SPC}{2}$ (BAC)	Chỉ số Informedness TPR + SPC - 1 (BM)

Hình 2.2. Các tiêu chí để xây dựng ngưỡng cắt cho nồng độ Hcy, folat

2.7. Xây dựng mô hình tiên lượng

Phương pháp suy luận Bayes được áp dụng để xác định mô hình tối ưu dựa vào xác suất hậu định của mô hình và chỉ số BIC (Bayesian Information Criterion). Đánh giá chất lượng mô hình bằng độ nhạy, độ đặc hiệu, đánh giá dao động dư của mô hình bằng cook's distance, hat-values, studentized residuals. Từ đó xây dựng mô hình dự báo cho nhóm bệnh và nhóm chứng. Phân tích được thực hiện với package BMA trên R language version.

2.8. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

- Nghiên cứu này đã được thông qua hội đồng đạo đức của Trường Đại

Học Y Hà Nội theo quyết định số 208/ HĐDDĐHYHN ngày 30 tháng 12 năm 2016.

- Tất cả các bệnh nhân trước khi tham gia nghiên cứu đều được giải thích rõ về lợi ích của nghiên cứu, các quyền lợi cũng như rủi ro của bệnh nhân.

- Việc tiến hành nghiên cứu được thực hiện đúng như mục tiêu nghiên cứu, không gây nguy hiểm cho người bệnh, chỉ phục vụ cho sự nghiệp khoa học và chăm sóc sức khỏe nhân dân.

2.9. Các biện pháp tránh sai số

- Sai số do lấy mẫu:

Cách khắc phục: tập huấn cho nhóm lấy mẫu lấy đúng số lượng, loại chất chống đông, bảo quản và vận chuyển theo quy trình được quy định tại đơn vị làm xét nghiệm.

- Sai số do nhầm mẫu:

Cách khắc phục: Mỗi bệnh nhân được mã hóa bằng một mã code có thể nhận dạng duy nhất trong khoảng thời gian ít nhất một năm và ghi số năm thu thập mẫu vào danh sách bệnh nhân.

- Sai quy trình kỹ thuật:

Cách khắc phục: tất cả các xét nghiệm trong nghiên cứu đều có quy trình thực hiện theo tiêu chuẩn SOP. Quy trình chạy real time PCR đều có chứng âm, chứng wildtype và chứng đồng hợp tử đa hình, chứng dị hợp tử đa hình kèm theo, kết quả giải trình tự được so sánh với ngân hàng gen *MTHFR* (NM_005957).

- Sai thông tin nghiên cứu:

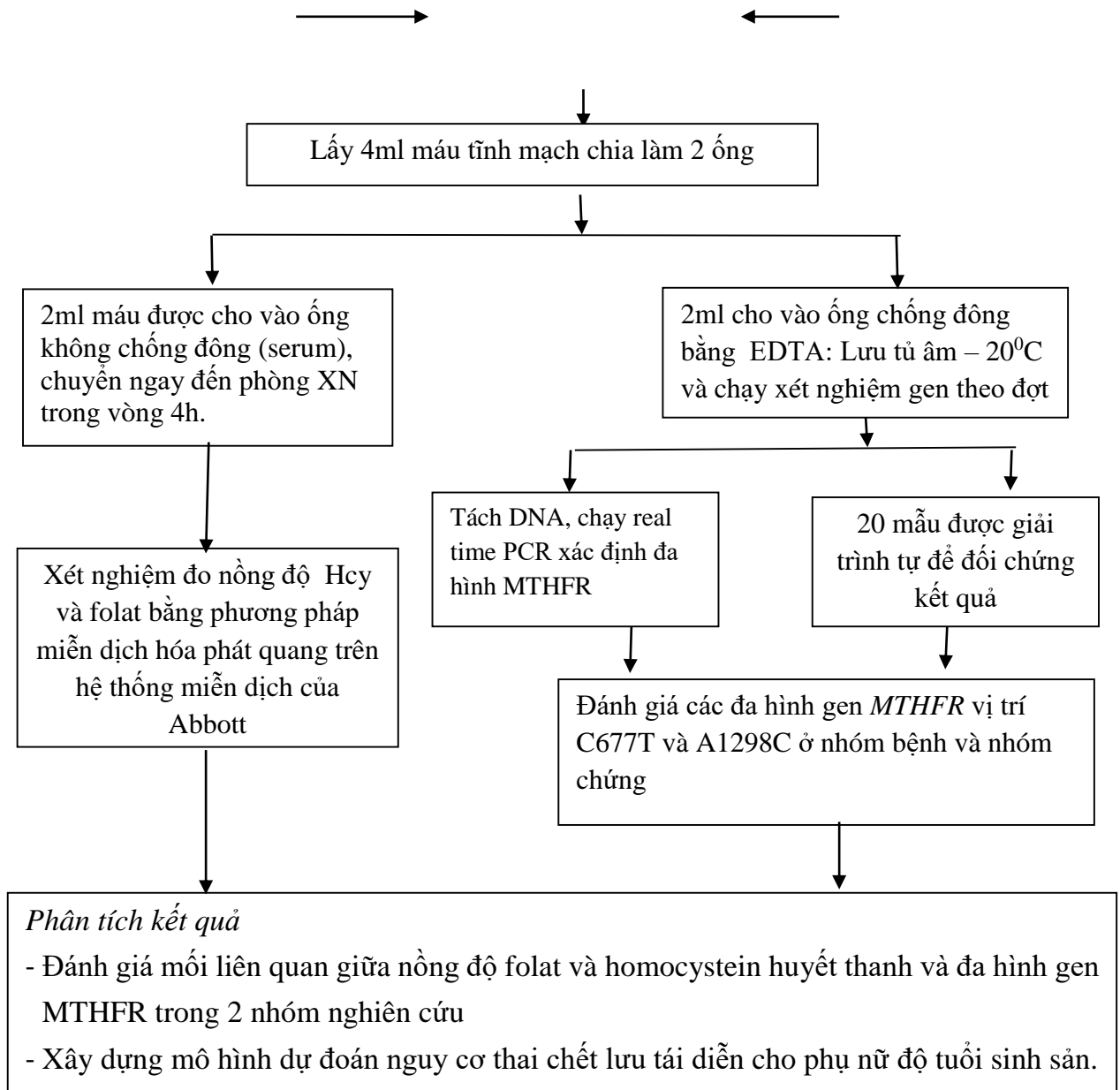
Cách khắc phục: ghi đầy đủ thông tin cần khai thác lên phiếu thu thập mẫu nghiên cứu bao gồm cả mã bệnh nhân, ngày, giờ làm xét nghiệm và tư vấn kết quả.

2.10. Sơ đồ nghiên cứu

126 đối tượng
nhóm chứng

- Thăm khám lâm sàng
- Thu thập thông tin lâm
bệnh án nghiên cứu

128 đối tượng
nhóm bệnh



Sơ đồ 2.1. Thiết kế nghiên cứu

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kết quả nghiên cứu thu được trên 128 bệnh nhân có tiền sử thai chết lưu tái diễn và 126 đối tượng đã sinh con khỏe mạnh làm đối chứng được trình bày trong các bảng và biểu đồ dưới đây:

3.1. Đặc điểm của nhóm đối tượng nghiên cứu

Bảng 3.1. Đặc điểm về tuổi của nhóm nghiên cứu

Tuổi (năm)	NNC	Nhóm chứng (n=126)		Nhóm bệnh (n=128)		p
		Mean	SD	Mean	SD	
Mean ± SD		31,1	4,67	30,5	5,17	0,31
Min		20		20		
Max		40		44		

Kết quả bảng 3.1 cho thấy tuổi trung bình của hai nhóm chứng và nhóm bệnh lần lượt là $31,1 \pm 4,67$ và $30,5 \pm 5,17$. Không có sự khác biệt về độ tuổi trung bình giữa hai nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$).

Bảng 3.2. So sánh nồng độ Hcy và folat huyết thanh theo tuổi

Nồng độ	Nhóm tuổi	< 35	≥ 35	p
		n=193	n=61	
Hcy (μmol/L)		$9,06 \pm 5,47$	$8,89 \pm 2,39$	0,053
Folat (ng/mL)		$11,42 \pm 3,23$	$11,72 \pm 3,07$	0,52

Từ bảng 3.2 cho thấy không có sự khác biệt giữa nồng độ Hcy và folat huyết thanh ở nhóm phụ nữ <35 tuổi và nhóm phụ nữ ≥ 35, $p > 0,05$

3.2. Nồng độ homocystein, folat huyết thanh và đa hình gen MTHFR

3.2.1. Nồng độ homocystein và folat huyết thanh ở nhóm nghiên cứu

Bảng 3.3. So sánh kết quả Hcy và folat của nhóm bệnh và nhóm chứng

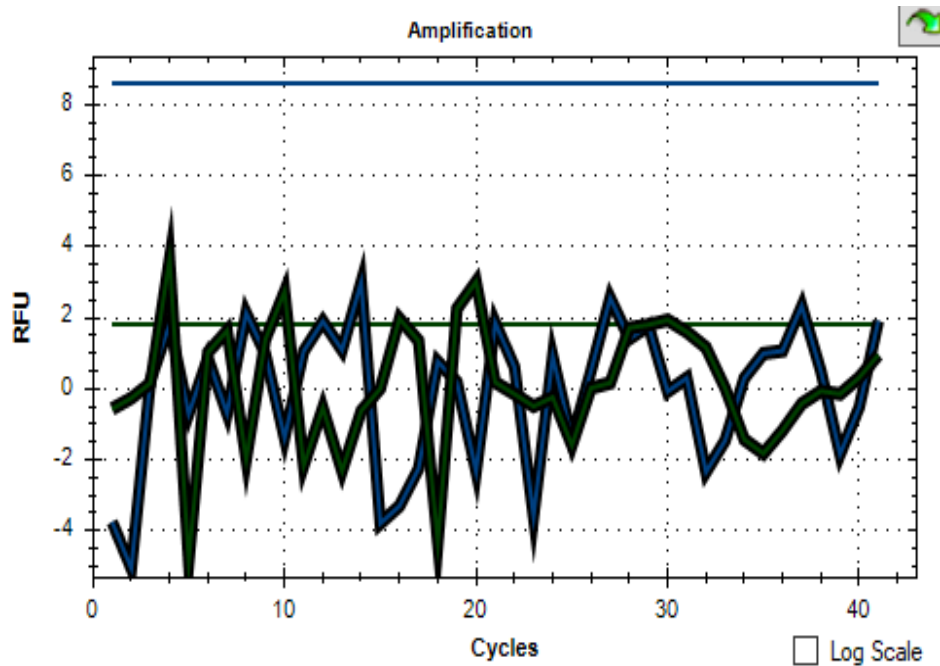
Nồng độ \ NNC	Nhóm chứng (n=126)	Nhóm bệnh (n=128)	p
Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	$7,64 \pm 1,78$	$11,73 \pm 6,08$	< 0,001
Folat (ng/mL)	$11,53 \pm 3,21$	$11,45 \pm 3,17$	0,84

Bảng 3.3 cho thấy kết quả nồng độ trung bình của Hcy ở nhóm chứng và nhóm bệnh tương ứng là $7,64 \pm 1,78$ ($\mu\text{mol/L}$) và $11,73 \pm 6,08$ ($\mu\text{mol/L}$) có sự khác biệt rõ rệt có ý nghĩa thống kê, $p < 0,001$. Nồng độ folat ở nhóm chứng là $11,53 \pm 3,21$ (ng/mL) và nhóm bệnh là $11,45 \pm 3,17$ (ng/mL) sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với, $p=0,84$.

3.2.2. Đánh giá đa hình gen MTHFR

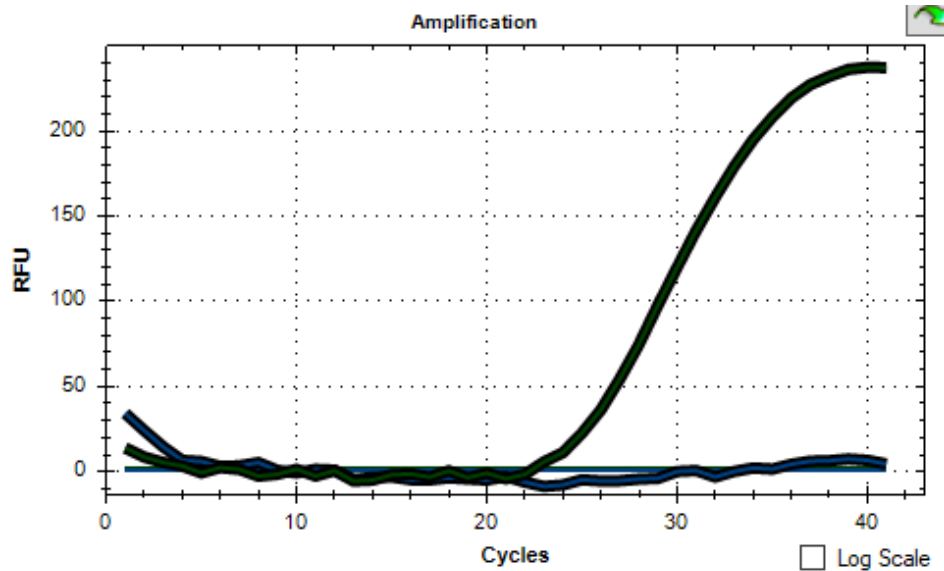
3.2.2.1. Phát hiện đa hình C677T và A1298C của gen MTHFR bằng phương pháp realtime PCR

Để kiểm soát quá trình nhiễm chéo và đánh giá chất lượng bộ kit, mỗi lần chạy realtime PCR đều có kèm theo các chứng âm và chứng dương cho từng kiểu đa hình.



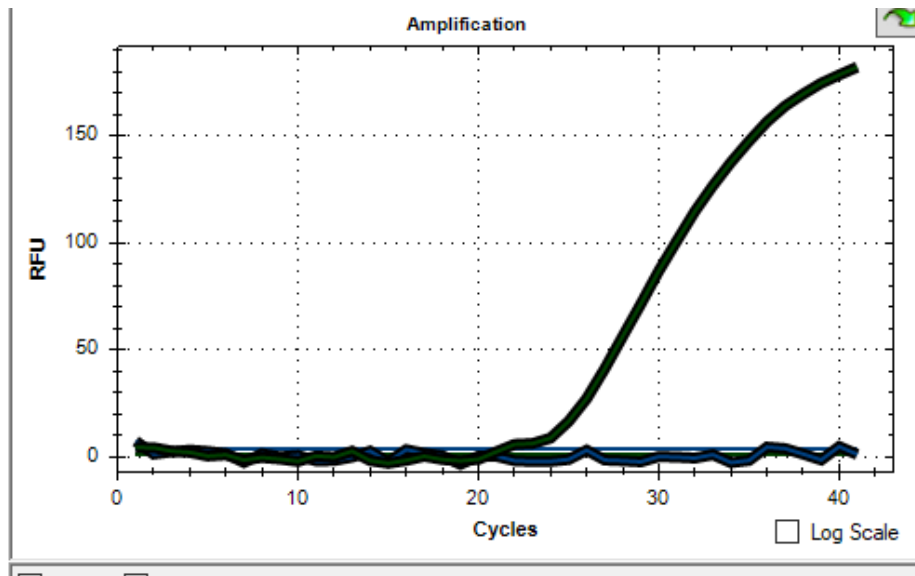
Hình 3.1: Chứng âm không có DNA

Mẫu chứng cho kết quả tốt, mẫu chứng âm không có DNA không có tín hiệu huỳnh quang chứng tỏ không có hiện tượng nhiễm chéo.



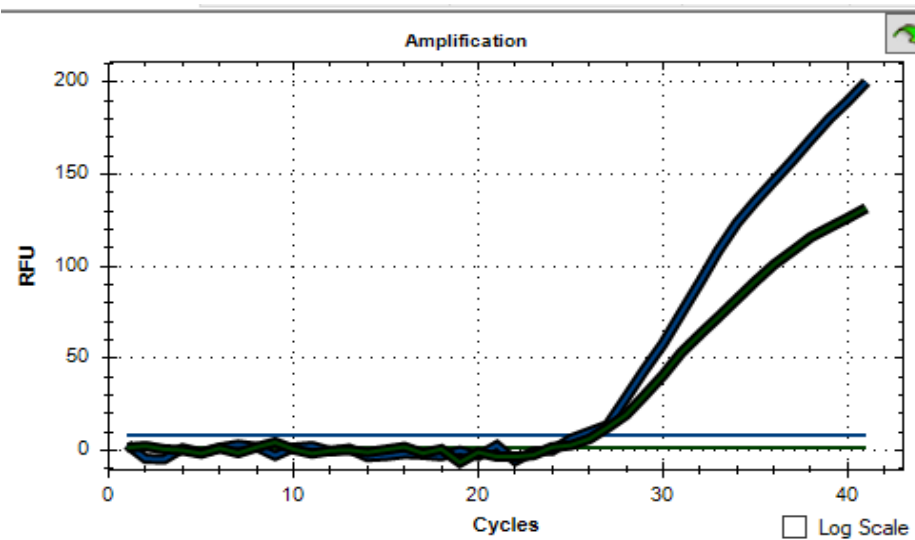
Hình 3.2. Kết quả chứng kiểu gen MTHFR 677CC

Kết quả mẫu chứng kiểu gen MTHFR 677CC là một đường tín hiệu màu xanh lá cây rõ nét lên ở chu kỳ 22 cho thấy kết quả phân tích đạt kết quả tốt.



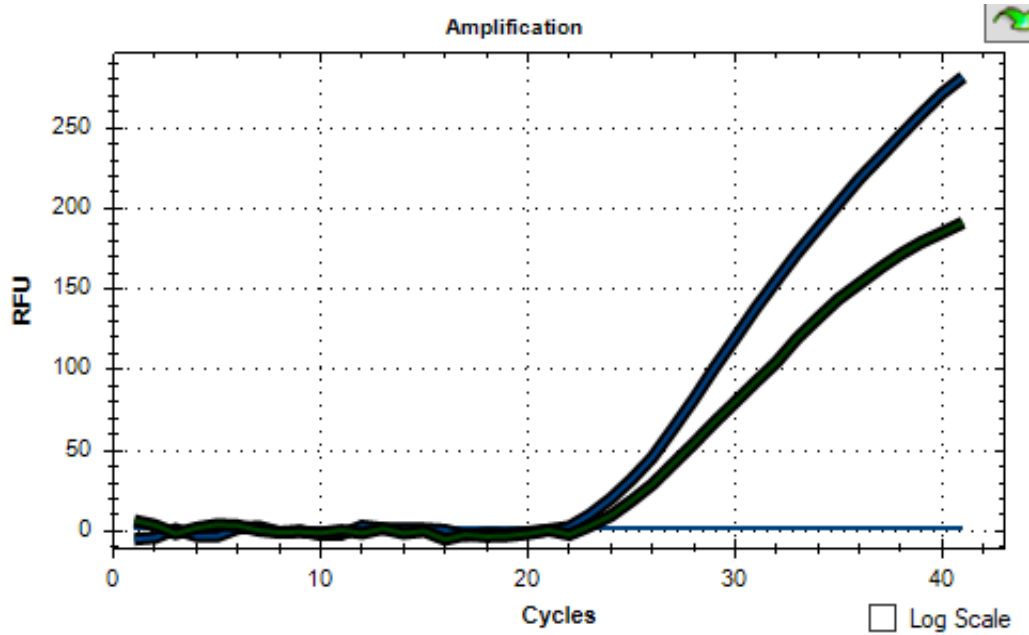
Hình 3.3. Kết quả chứng kiểu gen MTHFR 1298AA

Kết quả mẫu chứng kiểu gen MTHFR 1298AA là một đường tín hiệu màu xanh lá cây lên ở chu kỳ 24 cho kết quả phân tích đạt yêu cầu.



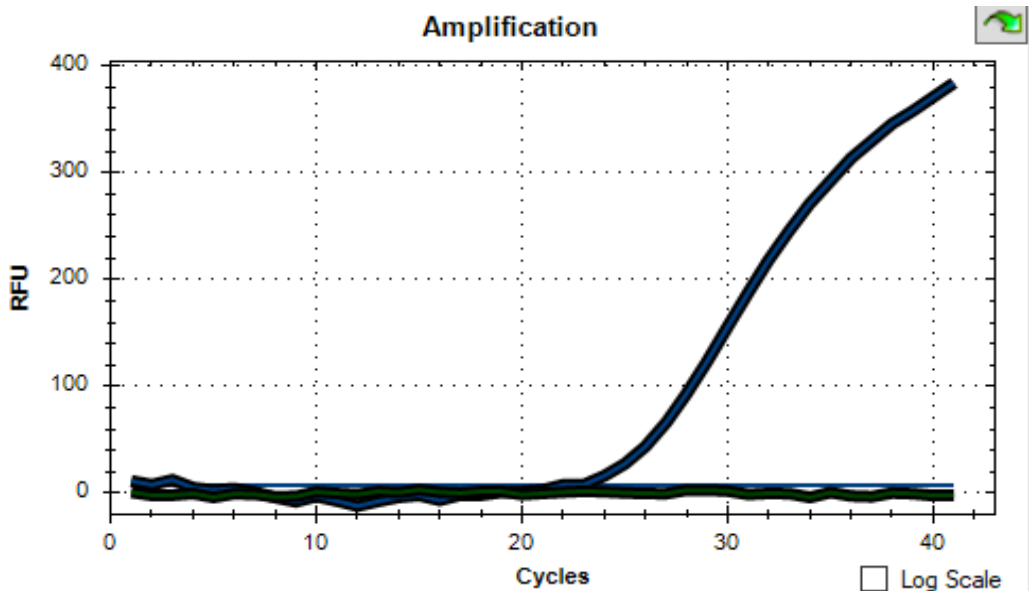
Hình 3.4. Kết quả chứng dị hợp tử gen MTHFR 677CT

Kết quả mẫu chứng dị hợp tử gen MTHFR 677CT là hai đường tín hiệu lên ở chu kỳ 26 bao gồm 1 đường tín hiệu màu xanh lam và 1 đường tín hiệu màu xanh lá cây.



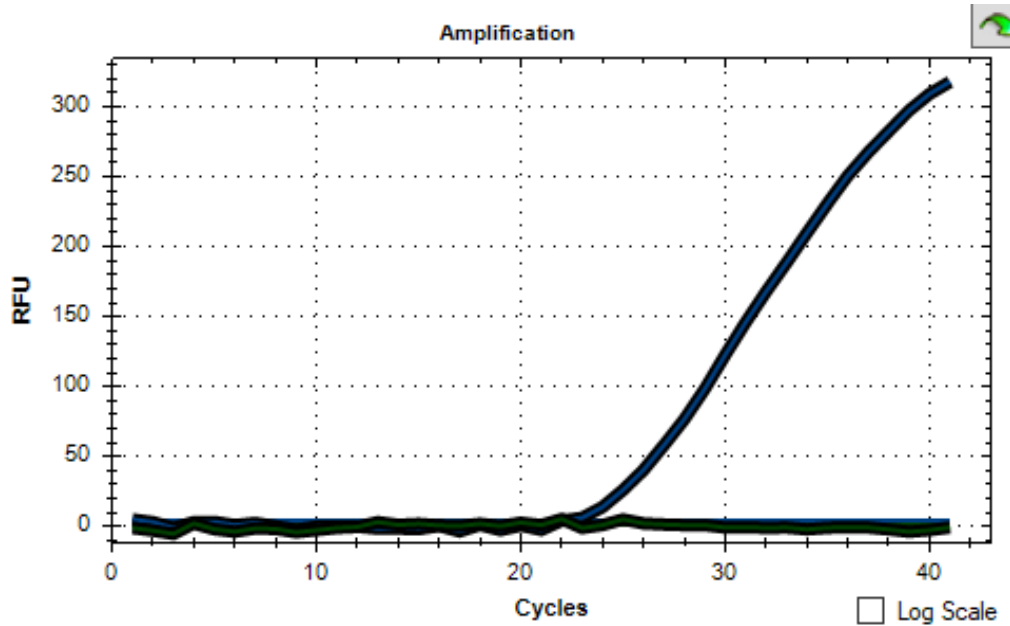
Hình 3.5. Kết quả chứng dị hợp tử gen MTHFR 1298AC

Kết quả mẫu chứng dị hợp tử gen MTHFR 1298AC là hai đường tín hiệu lên ở chu kỳ 24 bao gồm 1 đường tín hiệu màu xanh lam và 1 đường tín hiệu màu xanh lá cây.



Hình 3.6. Kết quả chứng đồng hợp tử gen MTHFR 677TT

Kết quả mẫu chứng đồng hợp tử gen MTHFR vị trí 677TT là một đường tín hiệu màu xanh lam lên ở chu kỳ 23.



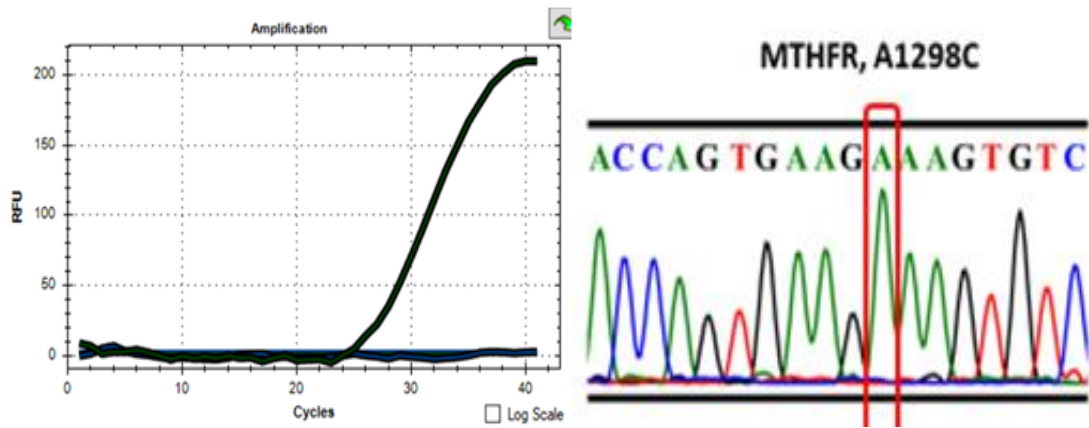
Hình 3.7. Kết quả chứng đồng hợp tử gen MTHFR 1298CC

Kết quả mẫu chứng đồng hợp tử gen MTHFR vị trí 1298CC là một đường tín hiệu màu xanh lam lên ở chu kỳ 23.

Kết quả mẫu bệnh phẩm cho các đường tín hiệu và màu sắc tương tự các mẫu chứng: không có đa hình gen thì có 1 đường tín hiệu màu xanh lá cây, kiểu dị hợp tử cho 2 đường tín hiệu và kiểu đa hình đồng hợp tử cho 1 đường màu xanh lam.

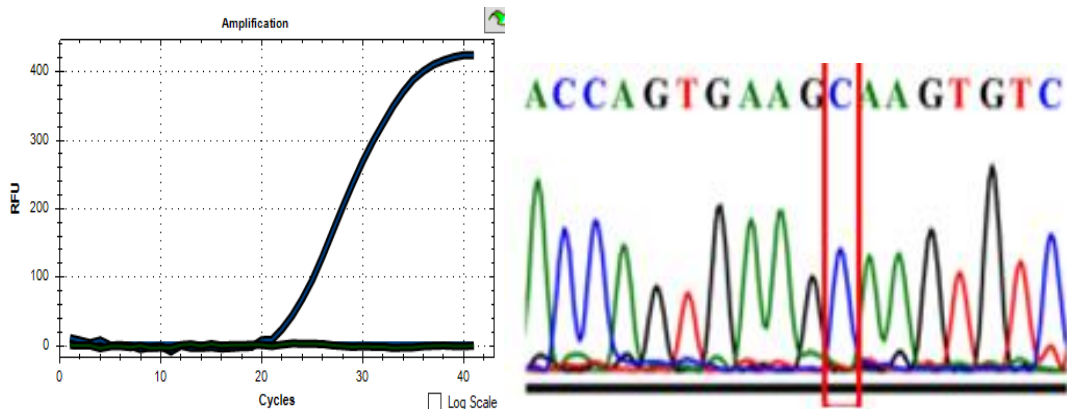
3.2.2.2. So sánh phương pháp giải trình tự gen với kết quả realtime PCR trong phát hiện đa hình gen MTHFR

Để khẳng định kết quả của kỹ thuật realtime PCR khi xác định đa hình gen MTHFR chúng tôi đã so sánh với kết quả giải trình tự gen trên máy ABI 3500. Danh sách 20 mẫu phân tích đối chứng theo phụ lục 6.



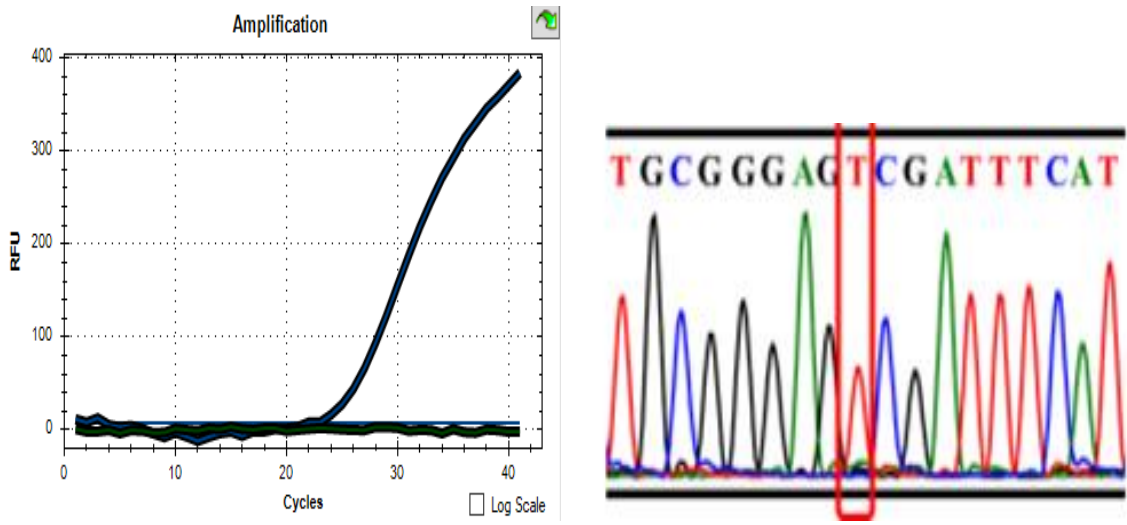
Hình 3.8. Hình ảnh realtime PCR (bên trái) và giải trình tự của kiểu gen 1298AA (bên phải) của cùng mẫu đối tượng nhóm chứng số 12

Kết quả mẫu có kiểu gen MTHFR 1298AA bằng phương pháp real time cho 1 đường tín hiệu màu xanh lá cây, khi thực hiện bằng phương pháp giải trình tự thì vị trí 1298 lên 1 đỉnh màu xanh lá tương ứng với nucleotid A của kiểu gen AA.



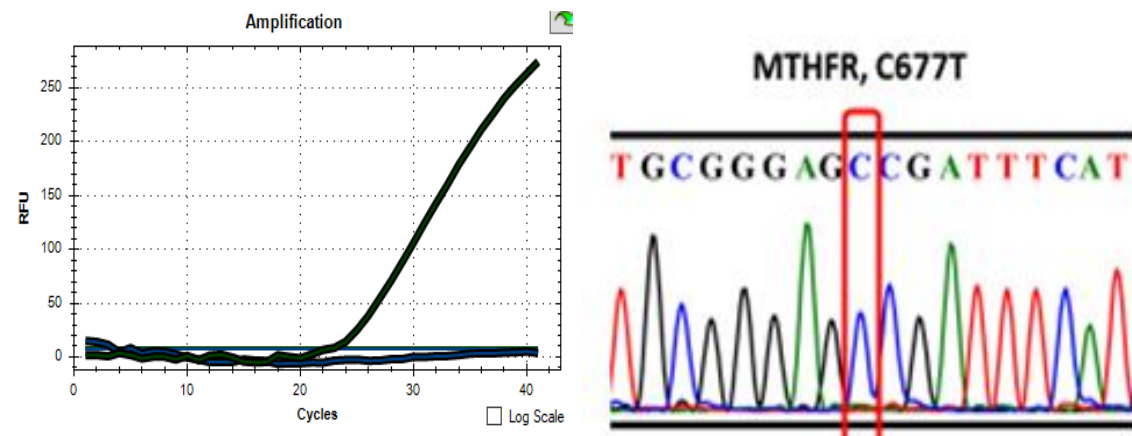
Hình 3.9. Hình ảnh realtime PCR (bên trái) và giải trình tự của kiểu gen 1298CC (bên phải) của cùng mẫu đối tượng nhóm chứng số 20

Kết quả mẫu có kiểu gen MTHFR 1298CC bằng phương pháp real time cho 1 đường tín hiệu màu lam, khi thực hiện bằng phương pháp giải trình tự thì vị trí 1298 lên 1 đỉnh màu xanh lam tương ứng với nucleotid C của kiểu gen CC.



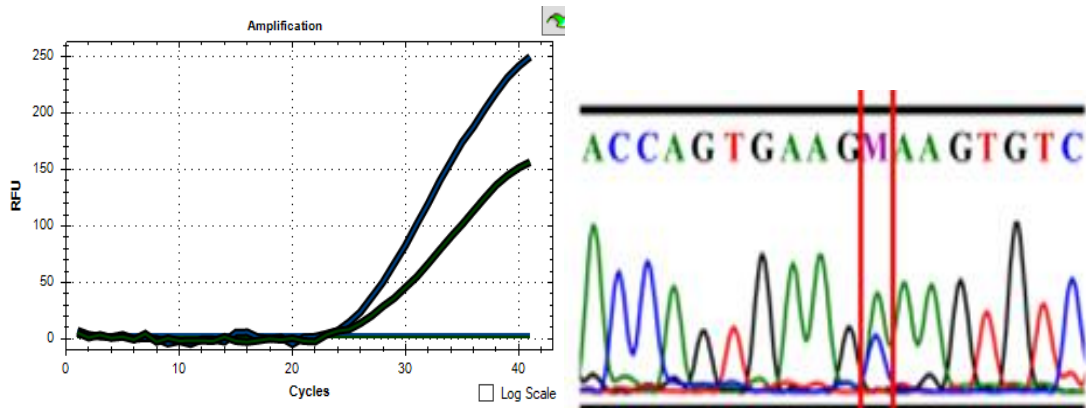
Hình 3.10. Hình ảnh realtime PCR (bên trái) và giải trình tự của kiểu gen 677TT (bên phải) của cùng mẫu đối tượng nhóm chứng số 12

Kết quả real time cho 1 đường tín hiệu màu xanh lam thể hiện mẫu có kiểu gen đồng hợp tử MTHFR 677TT. Kết quả phương pháp giải trình tự cho thấy vị trí 677 lên 1 đỉnh màu đỏ tương ứng với kiểu gen đồng hợp TT.



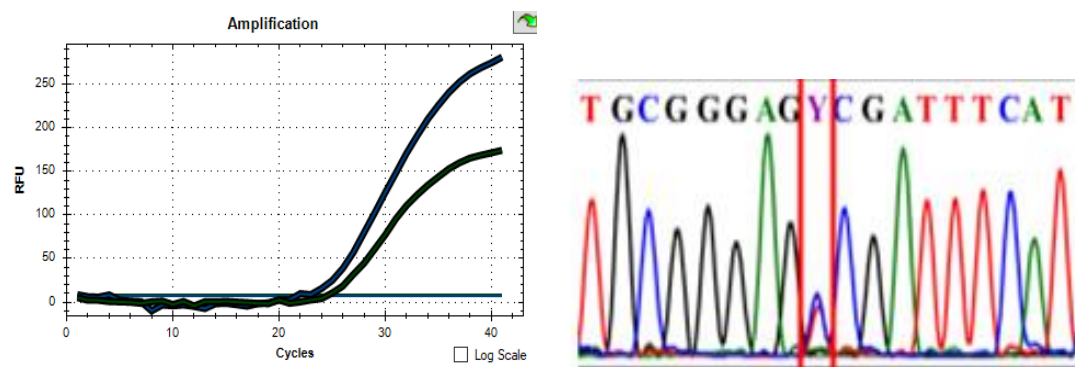
Hình 3.11. Hình ảnh realtime PCR (bên trái) và giải trình tự của kiểu gen 677CC (bên phải) của cùng mẫu đối tượng nhóm bệnh số 56

Kết quả mẫu có kiểu gen MTHFR 677CC bằng phương pháp real time cho 1 đường tín hiệu màu xanh lá cây, khi thực hiện bằng phương pháp giải trình tự thì vị trí 677 lên 1 đỉnh màu lam tương ứng với nucleotid C của kiểu gen CC.



Hình 3.12. Hình ảnh realtime PCR (bên trái) và giải trình tự của kiểu gen 1298AC (bên phải) của cùng mẫu đối tượng nhóm bệnh số 58

Kết quả mẫu có kiểu gen MTHFR dị hợp tử 1298AC bằng phương pháp real time cho 2 đường tín hiệu: 1 màu xanh lá cây, 1 màu xanh lam. Khi thực hiện bằng phương pháp giải trình tự thì vị trí 1298 lên 2: 1 đỉnh màu lam tương ứng với nucleotid C và 1 đỉnh màu xanh lá tương ứng với nucleotid A của kiểu gen AC.



Hình 3.13. Hình ảnh realtime PCR (bên trái) và giải trình tự của kiểu gen 677CT (bên phải) của cùng mẫu đối tượng nhóm bệnh số 58

Kết quả mẫu có kiểu gen MTHFR dị hợp tử 677CT bằng phương pháp real time cho 2 đường tín hiệu: 1 màu xanh lá cây, 1 màu xanh lam. Khi thực hiện bằng phương pháp giải trình tự thì vị trí 677 lên 2: 1 đỉnh màu lam tương ứng với nucleotid C và 1 đỉnh màu đỏ tương ứng với nucleotid T của kiểu gen CT.

Việc lựa chọn ngẫu nhiên 10 mẫu nhóm bệnh và 10 mẫu nhóm chứng cho kết quả tương đồng 100% giữa giữa 2 phương pháp đã khẳng định kết quả của phương pháp realtime PCR là đáng tin cậy.

3.2.3. Đa hình gen MTHFR trên đối tượng nghiên cứu

Bảng 3.4. Tỷ lệ xuất hiện của alen C và T vị trí 677

NNC Alen	Nhóm chứng (n=126)		Nhóm bệnh (n=128)		Tổng		p
	n	%	n	%	n	%	
C	216	85,71	172	67,19	388	76,38	<0,001
T	36	14,29	84	32,81	120	22,62	

Từ bảng 3.4 nhận thấy, tỷ lệ xuất hiện alen T ở nhóm chứng chỉ chiếm 14,29%, ở nhóm bệnh là 32,81% và tỷ lệ xuất hiện chung ở cả hai nhóm là 22,62%, $p < 0,001$.

Bảng 3.5. Phân bố kiểu gen MTHFR C677T trong nhóm nghiên cứu

NNC Kiểu gen	Nhóm chứng (n=126)		Nhóm bệnh (n=128)		Tổng		p
	n	%	n	%	n	%	
CC	92	73,02	56	43,75	148	58,27	<0,001
CT	32	25,40	60	46,88	92	36,22	
TT	2	1,59	12	9,38	14	5,51	

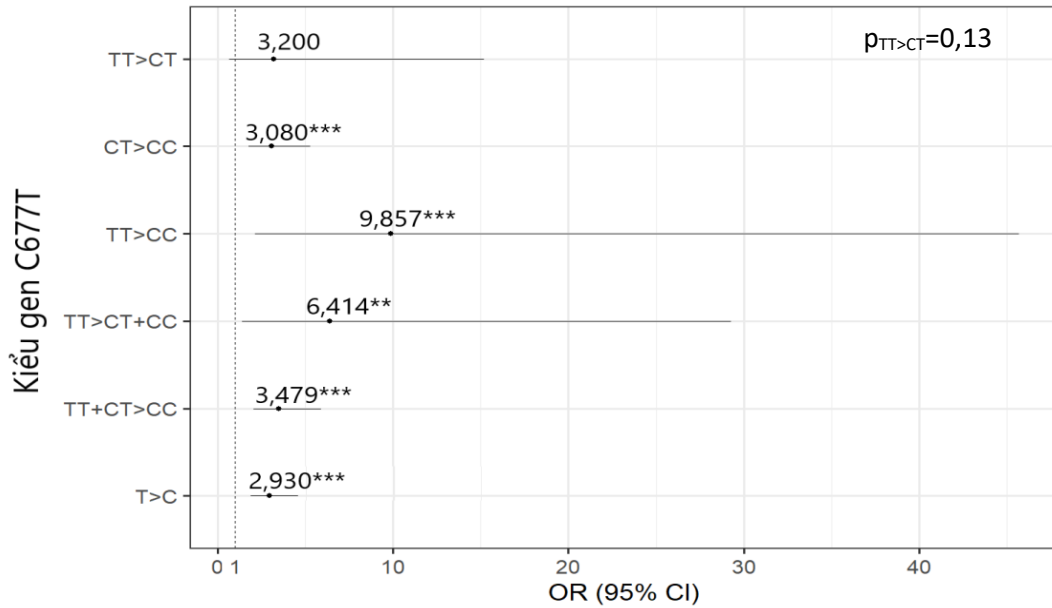
Bảng 3.5 cho thấy sự phân bố kiểu gen có sự khác nhau ở nhóm bệnh và nhóm chứng. Kiểu gen C677CC (kiểu đại) gặp 73,02% ở nhóm chứng và 43,75% ở nhóm bệnh trong khi đó chỉ gặp 1,59% kiểu gen đa hình đồng hợp tử 677TT ở nhóm chứng và tỷ lệ đa hình đồng hợp tử ở nhóm bệnh 9,38%. Sự phân bố của các kiểu gen trong nhóm nghiên cứu có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p < 0,001$.

Bảng 3.6. Nguy cơ thai chết lưu tái diễn theo đa hình gen MTHFR vị trí 677

Kiểu gen \ NNC	Nhóm chứng	Nhóm bệnh	OR
667 CC	92 (73,02%)	56 (43,75%)	OR = 3,48; 95% CI = (2,06 – 5,89)
677 CT/TT	34 (26,98%)	72 (56,25%)	
Tổng	126	128	

Từ bảng 3.6 chúng ta nhận thấy: người có đa hình gen 677CT/677 TT có nguy cơ mắc bệnh cao gấp 3,48 lần nhóm người không có đa hình gen, có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% CI = (2,06 – 5,89).

Để đánh giá sự ảnh hưởng độc lập hay sự kết hợp của các alen có tác động nhiều hơn đến nguy cơ có bệnh chúng tôi phân tích biểu đồ sau:



*: < 0,05; **: < 0,01; ***: < 0,001

Biểu đồ 3.1. Đánh giá nguy cơ có thai chết lưu theo các đa hình MTHFR vị trí 677

Biểu đồ 3.1 so sánh khả năng nguy cơ có thai chết lưu tái diễn theo tỷ suất chênh của các kiểu gen khác nhau tại vị trí C677T của gen MTHFR. Việc xuất hiện đa hình C>T có ý nghĩa trong tiên lượng nguy cơ thai chết lưu tái diễn có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% với OR từ 2,93-9,86. Nguy cơ có tiền sử thai chết lưu tái diễn của kiểu gen đa hình đồng hợp tử T677T so với kiểu gen đa hình dị hợp tử C677T với tỷ suất chênh OR= 3,2, tuy nhiên không có sự khác biệt với $p=0,13$. Nguy cơ có tiền sử thai chết lưu tái diễn được đánh giá theo tỷ suất chênh của kiểu gen lần lượt là: C677T so với kiểu đại C677C OR= 3,08, $p< 0,001$; T677T so với C677C OR= 9,86, $p< 0,001$; kiểu gen T677T so với nhóm C677T và C677C có OR= 6,4, $p<0,01$; nhóm kiểu gen T677& C677T so với C677C OR= 3,48 với $p< 0,001$.

Bảng 3.7. Tỷ lệ xuất hiện alen C ở vị trí 1298

Alen \ NNC	Nhóm chứng		Nhóm bệnh		Tổng		p
	n	%	n	%	n	%	
A	205	81,35	169	66,02	374	73,62	<0,001
C	47	18,65	87	33,98	134	26,38	

Từ bảng 3.7 cho chúng ta thấy tỷ lệ xuất hiện alen C ở nhóm chứng là 18,65%, nhóm bệnh là 33,98%, $p < 0,001$. Tỷ lệ chung ở cả 2 nhóm nghiên cứu là 26,38%.

Bảng 3.8. Phân bố kiểu gen MTHFR A1298C trong nhóm nghiên cứu

Kiểu gen \ NNC	Nhóm chứng (n=126)		Nhóm bệnh (n=128)		Tổng		p
	n	%	n	%	n	%	
AA	82	65,08	57	44,53	139	54,72	<0,001
AC	41	32,54	55	42,97	96	37,80	
CC	3	2,38	16	12,50	19	7,48	

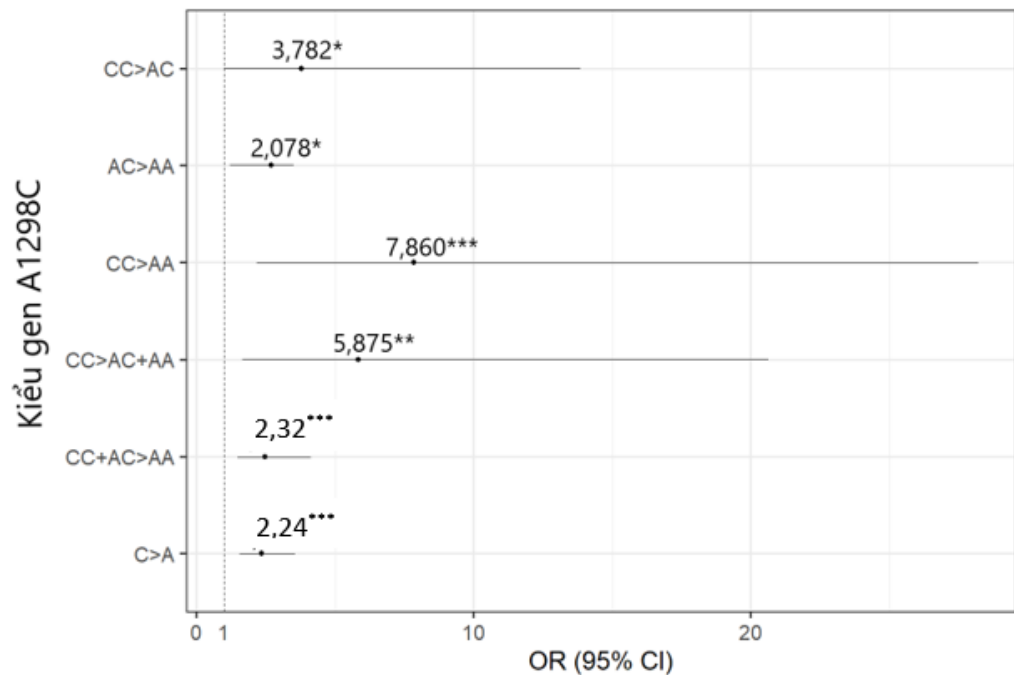
Bảng 3.8 cho thấy sự phân bố kiểu gen có sự khác nhau ở nhóm bệnh và nhóm chứng. Kiểu gen 1298AA (kiểu đại) gặp 65,08% ở nhóm chứng và 44,53% ở nhóm bệnh trong khi đó chỉ gặp 2,38% kiểu gen đa hình đồng hợp tử 1298CC ở nhóm chứng và tỷ lệ đa hình đồng hợp tử ở nhóm bệnh 12,5%. Sự phân bố của các kiểu gen trong nhóm nghiên cứu có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p < 0,001$.

Bảng 3.9. Nguy cơ có bệnh theo đa hình MTHFR vị trí 1298

Kiểu gen \ NNC	Nhóm chứng (n=126)	Nhóm bệnh (n=128)	OR
1298 AA	82 (65%)	57 (45%)	OR = 2,32; 95% CI = (1,40 – 3,85)
1298AC/CC	44 (35%)	71 (55%)	

Kết quả từ bảng 3.9 cho thấy: người có đa hình gen MTHFR vị trí 1298 bao gồm cả thể dị hợp tử và đồng hợp tử có nguy cơ mắc bệnh cao gấp 2,32 lần nhóm người không bị đa hình gen, có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%.

Để so sánh mức độ ảnh hưởng đến nguy cơ có bệnh của các đa hình trên nhóm nghiên cứu chúng tôi phân tích tỷ số OR theo biểu đồ sau:



*: < 0,05; **: < 0,01; ***: < 0,001

Biểu đồ 3.2. Đánh giá nguy cơ có tình trạng thai chết lưu theo các đa hình MTHFR vị trí 1298

Biểu đồ 3.2 so sánh khả năng có tình trạng thai chết lưu tái diễn theo tỷ suất chênh của các kiểu gen khác nhau tại vị trí 1298 của gen MTHFR. Tất cả các biến đổi từ A sang C đều có ý nghĩa dự đoán nguy cơ thai chết lưu với $p < 0,05$. Tỷ suất chênh của alen A so với alen C $OR = 2,24$, $p < 0,001$. Tỷ suất chênh của các kiểu gen MTHFR vị trí 1298 lần lượt như sau: C1298C so với C1298A $OR = 3,78$, $p < 0,05$; A1298C so với A1298A $OR = 2,078$, $p < 0,05$; kiểu gen đa hình đồng hợp tử C1298C so với gen kiểu dại A1298A $OR = 7,86$, $p < 0,001$; kiểu gen đa hình đồng hợp tử C1298C so với nhóm A1298C và A1298A có $OR = 5,87$; nhóm kiểu gen đa hình C1298C và A1298C so với kiểu dại A1298A có $OR = 2,32$, $p < 0,001$. Qua đó chúng ta cũng thấy ở dạng đồng hợp tử, đa hình gen có giá trị đánh giá nguy cơ bệnh nhân thai chết lưu cao hơn biến đổi ở dạng dị hợp tử.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của đa hình gen khi kết hợp cả 2 vị trí đa hình trên gen MTHFR

Kiểu gen		NNC	Nhóm chứng	Nhóm bệnh	Tổng	OR	95% CI
677	CC		92	56	148	3,48	2,06
	CT/TT		34	72	106		5,89
1298	AA		82	57	131	2,32	1,40
	AC/CC		44	71	113		3,85
677+	CC + AA		55	11	66	8,24	4,05
1298	CT/TT + AC/CC		71	117	188		16,78

Từ bảng 3.10 chúng ta nhận thấy khi kết hợp cả 2 đa hình gen 677 và 1298 thì khả năng dự đoán nguy cơ có bệnh tăng lên với $OR = 8,24$ với độ tin cậy 95% từ 4,05-16,78.

3.3. Mối tương quan giữa nồng độ Hcy và folat huyết thanh theo đa hình gen MTHFR

3.3.1. So sánh nồng độ Hcy theo các đa hình gen MTHFR

Bảng 3.11. Nồng độ Hcy ($\mu\text{mol/L}$) theo các đa hình gen MTHFR

Kiểu gen \ NNC		Nhóm bệnh			Nhóm chứng		
		n	($\bar{X} \pm \text{SD}$)	p	n	($\bar{X} \pm \text{SD}$)	p
C677T	CC	56	12,20 \pm 5,59	0,035	92	7,59 \pm 1,84	0,57
	CT	60	10,58 \pm 4,27		32	7,86 \pm 1,66	
	TT	12	15,31 \pm 12,28		2	6,66 \pm 0,91	
A1298C	AA	57	11,22 \pm 6,72	0,42	82	7,58 \pm 1,88	0,80
	AC	55	12,54 \pm 6,02		41	7,78 \pm 1,67	
	CC	16	10,79 \pm 3,13		3	7,32 \pm 0,63	

Từ bảng 3.11 chúng ta thấy không có sự khác biệt nồng độ Hcy huyết thanh ở các đa hình của nhóm chứng vị trí 677 và các đa hình vị trí 1298 ở cả nhóm chứng và nhóm bệnh trên gen MTHFR. Tuy nhiên có sự khác biệt nồng độ Hcy huyết thanh theo các đa hình gen tại vị trí 677 ở nhóm bệnh.

3.3.2. So sánh nồng độ folat theo các đa hình gen MTHFR

Bảng 3.12. Nồng độ folat (ng/mL) theo các đa hình gen MTHFR

Kiểu gen		NNC		Nhóm bệnh			Nhóm chứng		
		n	($\bar{X} \pm SD$)	p	n	($\bar{X} \pm SD$)	p		
C677T	CC	56	11,56 ± 2,96	0,81	92	11,55 ± 3,30	0,57		
	CT	60	11,27 ± 3,46		32	11,61 ± 2,99			
	TT	12	11,82 ± 2,8		2	9,15 ± 2,05			
A1298C	AA	57	10,89 ± 3,27	0,19	82	11,63 ± 3,40	0,62		
	AC	55	11,97 ± 3,18		41	11,23 ± 2,84			
	CC	16	11,65 ± 2,61		3	12,90 ± 3,12			

Bảng 3.12 cho thấy không có sự khác biệt nồng độ folat huyết thanh ở cả nhóm chứng và nhóm nghiên cứu ở các đa hình cả 2 vị trí 677 và 1298.

3.3.3. Mối tương quan giữa nồng độ Hcy và folat với tổ hợp đa hình 2 vị trí C677T và A1298C trên gen MTHFR

Bảng 3.13. So sánh nồng độ Hcy và folat huyết thanh theo các tổ hợp đồng hợp tử kiểu dại và dị hợp tử kép

Kiểu gen	NNC		Nhóm chứng (Mean ± SD)			n
			Nhóm bệnh (Mean ± SD)			
	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	Folat (ng/mL)	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	Folat (ng/mL)		
677CC+1298AA	7,48 ± 1,99	11,74 ± 3,47	55	10,93 ± 3,06	10,54 ± 2,61	11
677CT+1298AC	7,94 ± 1,92	11,9 ± 1,26	6	11,98 ± 4,93	11,68 ± 3,42	20
p	0,59	0,91		0,528	0,347	

Kết quả bảng trên cho thấy: không có sự khác biệt giữa nồng độ Hcy và folat giữa tổ hợp gen đồng hợp tử kiểu dại với tổ hợp gen dị hợp tử kép với $p > 0,05$.

Bảng 3.14. So sánh nồng độ homocystein và folat huyết thanh theo tổ hợp gen dị hợp tử kép và đa hình đồng hợp tử kép

Kiểu gen \ NNC	Nhóm chứng (Mean ± SD)		n	Nhóm bệnh (Mean ± SD)		n
	Hcy (μmol/L)	Folat (ng/mL)		Hcy (μmol/L)	Folat (ng/mL)	
677CT+1298AC	7,94 ± 1,92	11,9 ± 1,26	6	11,98 ± 4,93	11,68 ± 3,42	20
677TT+1298CC	0	0	0	11,09 ± 5,62	14,05 ± 2,33	2
p				0,81	0,51	

Bảng 3.14 cho thấy không có sự khác biệt giữa nồng độ Hcy, folat của tổ hợp gen dị hợp tử kép với đa hình đồng hợp tử kép, tuy nhiên chỉ có 2 đối tượng có tiền sử thai chết lưu tái diễn có tổ hợp gen đa hình đồng hợp tử kép và không có trường hợp nào có tổ hợp đa hình đồng hợp tử kép ở nhóm chứng.

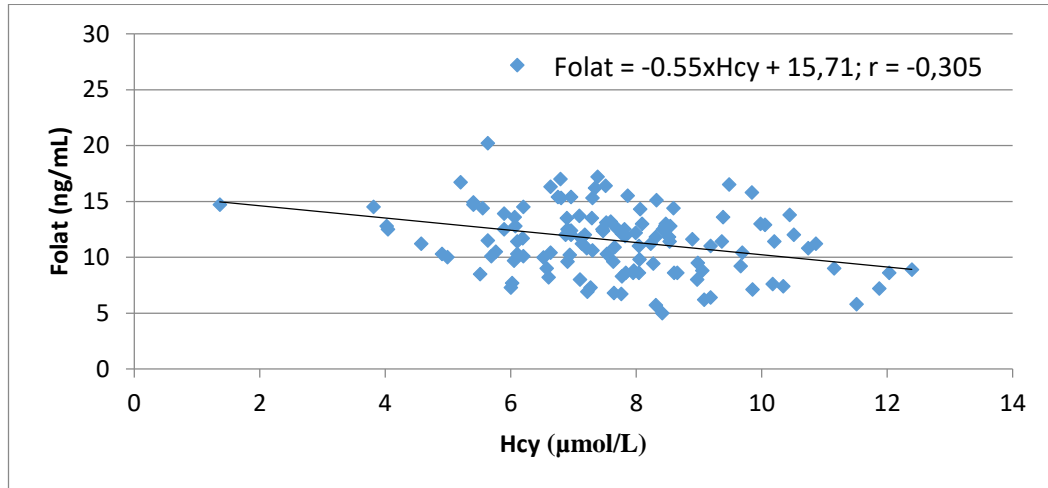
Bảng 3.15. So sánh nồng độ homocystein và folat huyết thanh theo tổ hợp gen đồng hợp tử kiểu đại kép với đa hình đồng hợp tử kép

Kiểu gen \ NNC	Nhóm chứng (Mean ±SD)		n	Nhóm bệnh (Mean ± SD)		n
	Hcy (μmol/L)	Folat (ng/mL)		Hcy (μmol/L)	Folat (ng/mL)	
677CC+1298AA	7,48 ± 1,99	11,74 ± 3,47	55	10,93 ± 3,06	10,54 ± 2,61	11
677TT+1298CC	0	0	0	11,09 ± 5,62	14,05 ± 2,33	2
p				0,951	0,05	

Bảng 3.15 cho thấy không có sự khác biệt giữa nồng độ Hcy, folat của tổ hợp gen đồng hợp tử kiểu đại kép với đa hình đồng hợp tử kép, tuy nhiên chỉ có 2 bệnh nhân có tiền sử thai chết lưu tái diễn có tổ hợp gen đa hình đồng hợp tử kép và không có trường hợp nào có tổ hợp đa hình đồng hợp tử kép ở nhóm chứng.

3.3.4. Mối tương quan nồng độ Hcy và folat huyết thanh

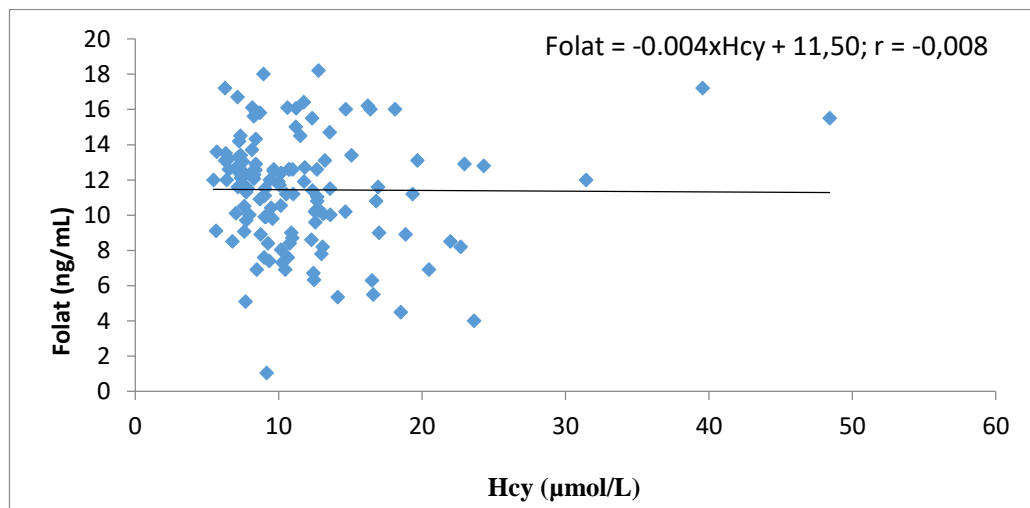
3.3.4.1. Mối tương quan giữa nồng độ Hcy và folat ở nhóm chứng



Biểu đồ 3.3. Đánh giá tương quan giữa nồng độ Hcy và folat ở nhóm chứng

Qua kết quả trên chúng ta thấy nồng độ Hcy và folat huyết thanh có mối tương quan nghịch với $r = -0,305$.

3.3.4.2. Mối tương quan giữa nồng độ Hcy và folat ở nhóm bệnh



Biểu đồ 3.4. Đánh giá tương quan giữa nồng độ Hcy và folat ở nhóm bệnh

Qua kết quả trên chúng ta thấy nồng độ Hcy và folat huyết thanh không có mối tương quan với $r = -0,008$

3.3.5. Đánh giá mô hình nghiên cứu

3.3.5.1. Tổng hợp chung

Bảng 3.16. Đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

	Nhóm bệnh	Nhóm chứng	p.overall
	<i>n=128</i>	<i>n=126</i>	
Tuổi (năm)	30,5 (5,17)	31,1 (4,67)	0,311
Homocystein ($\mu\text{mol/L}$)	11,73 (6,08)	7,64 (1,78)	<0,001
Folat (ng/mL)	11,45 (3,17)	11,53 (3,21)	0,840
C677T			<0,001
CC (Không đa hình)	56 (43,75%)	92 (73,01%)	
CT (Đa hình dị hợp tử)	60 (46,87%)	32 (25,40%)	
TT (Đa hình đồng hợp tử)	12 (9,38%)	2 (1,59%)	
A1298C			<0,001
AA (Không đa hình)	57 (44,53%)	82 (65.1%)	
AC (Đa hình dị hợp tử)	55 (42,97%)	41 (32.5%)	
CC(Đa hình đồng hợp tử)	16 (12,50%)	3 (2,38%)	
Số lần mất thai	3,17 (1,29)	< 1	-

Bảng 3.16 cho thấy nhóm bệnh có độ tuổi trung bình là 30,5 và nhóm chứng có độ tuổi trung bình là 31,1 tuổi, sự khác biệt giữa hai nhóm không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

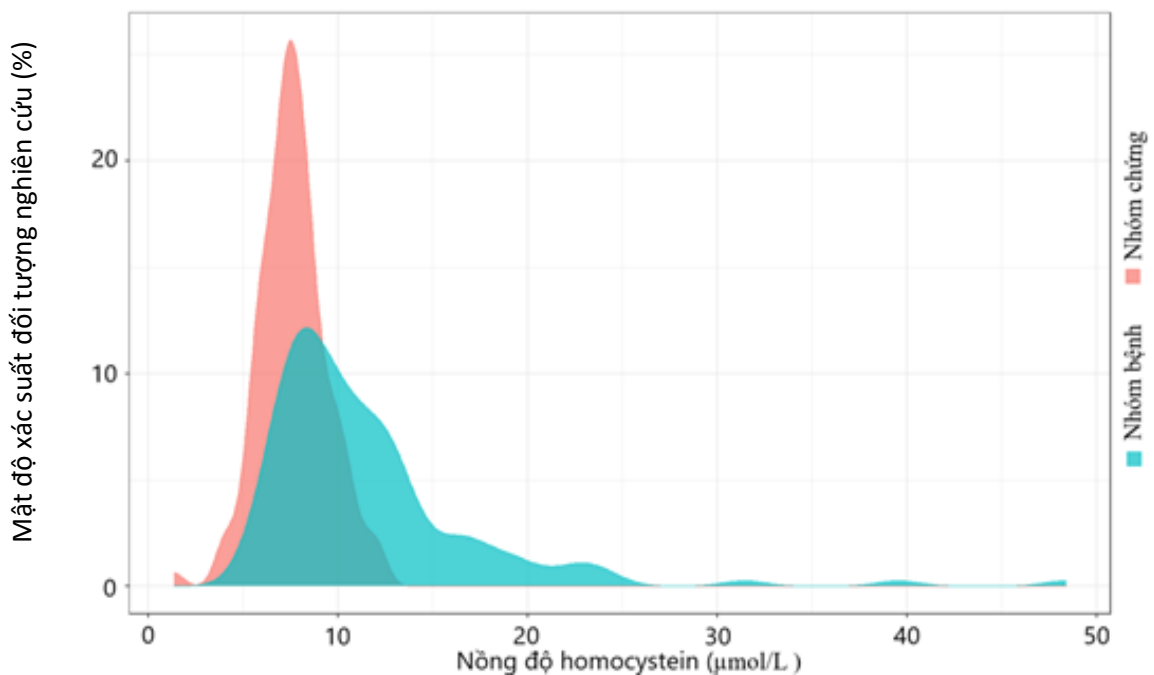
Nồng độ Hcy huyết thanh của nhóm bệnh là 11,73 ($\mu\text{mol/L}$) cao hơn nhóm chứng là 7,64 ($\mu\text{mol/L}$), sự khác biệt giữa hai nhóm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

Nồng độ folat huyết thanh của nhóm bệnh là 11,45 (ng/mL) so với nhóm chứng là 11,53 (ng/mL), sự khác biệt giữa hai nhóm không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Đánh giá về đa hình C677T trong nhóm bệnh tỷ lệ không đa hình là 43,75% thấp hơn so với nhóm chứng là 73,01%, tỷ lệ đa hình dị hợp của nhóm bệnh cao hơn nhóm chứng, đặc biệt là tỷ lệ đa hình đồng hợp của nhóm bệnh cao gấp 6 lần so với nhóm chứng. Sự khác biệt giữa hai nhóm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

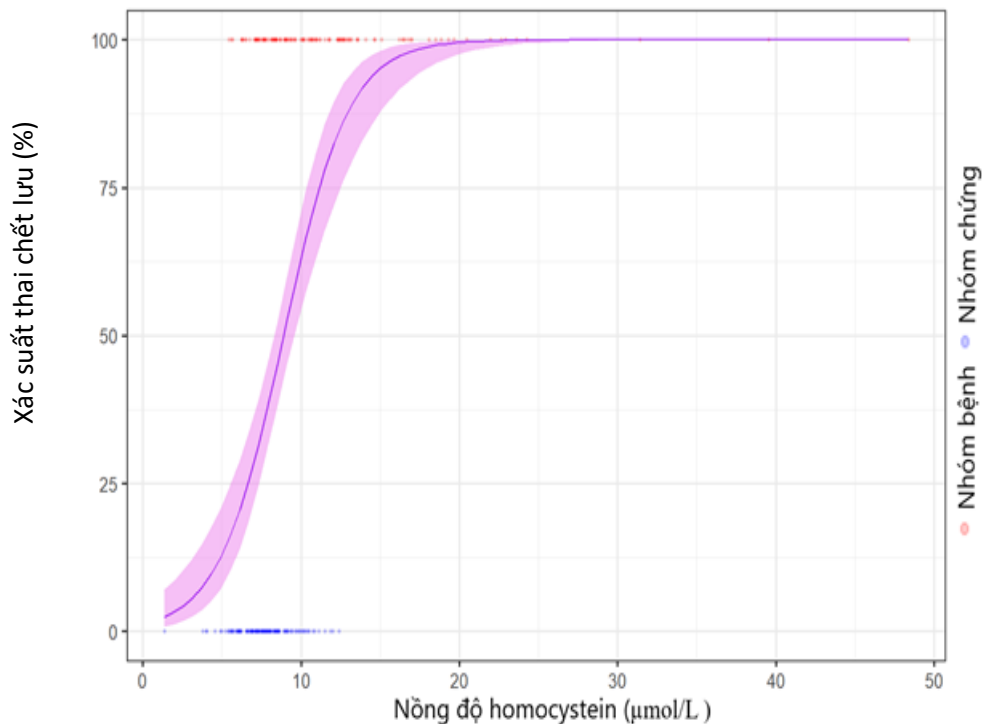
Đánh giá về đa hình A1298C trong nhóm bệnh tỷ lệ không đa hình là 44,53% thấp hơn so với nhóm chứng là 65,1%, trong nhóm bệnh tỷ lệ đa hình đồng hợp tử cao gấp 5 lần nhóm chứng. Sự khác biệt giữa hai nhóm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

3.3.5.2. Xác định điểm cắt của nồng độ Hcy trong dự đoán nguy cơ thai chết lưu tái diễn



Biểu đồ 3.5 Phân bố nồng độ Hcy giữa nhóm bệnh và nhóm chứng

Biểu đồ 3.5 cho thấy sự phân bố nồng độ Hcy của nhóm bệnh cao hơn đáng kể so với nhóm chứng, trong khi nhóm chứng có mức phân bố nồng độ phổ biến từ 5 – 11 $\mu\text{mol/L}$ thì nhóm bệnh giá trị phổ biến là từ 8 đến 15 $\mu\text{mol/L}$. Tồn tại khu vực chồng lấp đáng kể giữa các giá trị trong nhóm bệnh và nhóm chứng. Như vậy, có thể thấy rằng sẽ không tồn tại ngưỡng cắt hoàn hảo giúp phân tách được 100% các đối tượng nhóm bệnh và nhóm chứng.

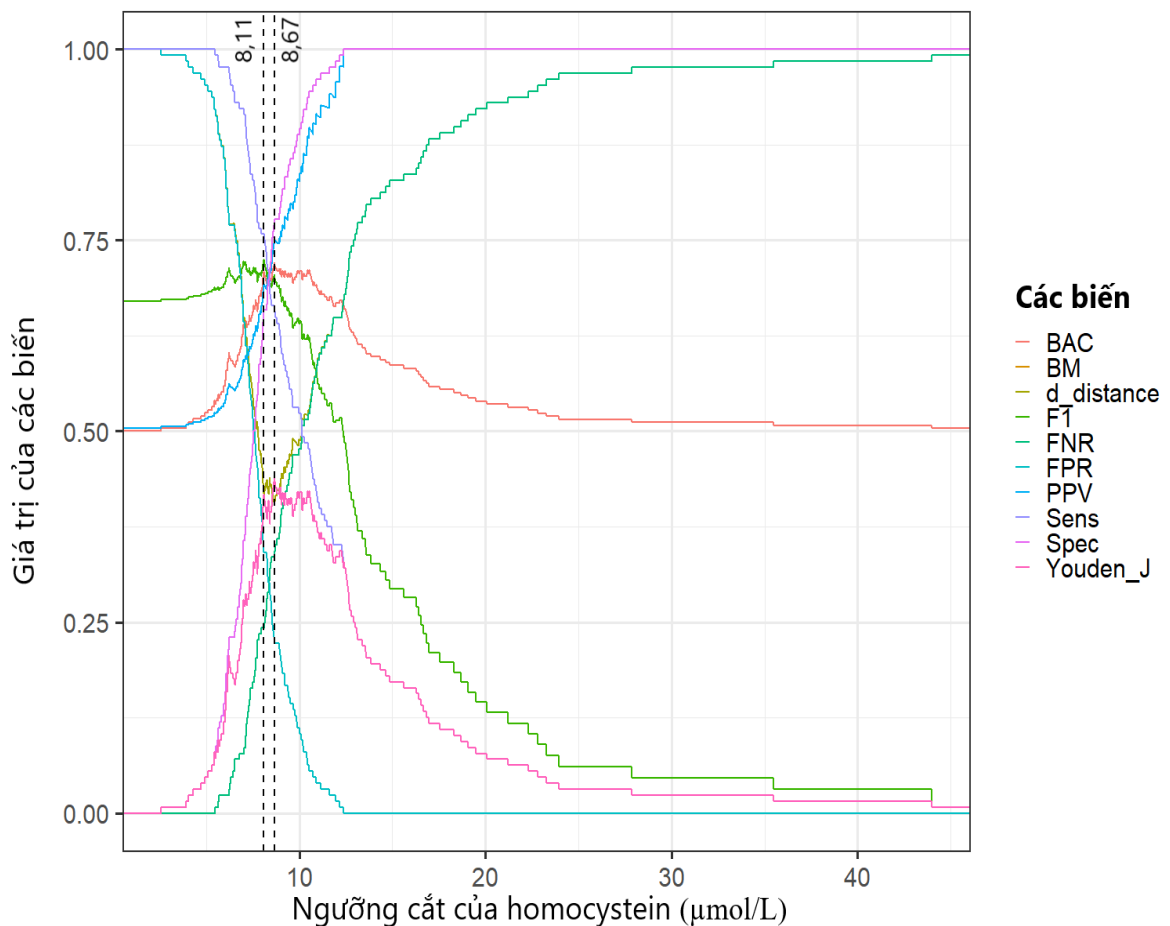


Biểu đồ 3.6. Phân bố kết quả xét nghiệm theo nhóm bệnh và nhóm chứng với phân bố đồ thị logistic

Biểu đồ 3.6 cho thấy có sự khác biệt tương đối rõ ràng giữa nhóm bệnh và nhóm chứng khi phân bố xét nghiệm của bệnh nhân nhóm bệnh tập trung ở ngưỡng cao hơn so với nhóm chứng. Kết quả này cho thấy Hcy là dữ liệu phù hợp khi xây dựng mô hình tiên lượng nguy cơ có tình trạng thai lưu tái diễn.

Xây dựng ngưỡng chẩn đoán tăng homocystein

Từ dữ liệu 254 đối tượng tham gia nghiên cứu, chúng tôi xác định được 221 ngưỡng cắt của nồng độ Hcy để dự đoán nguy cơ thai chết lưu tái diễn (phụ lục 7). Mỗi ngưỡng cắt này đều được đánh giá trên 8 tiêu chí là: độ nhạy (sensitivity – TPR), độ đặc hiệu (specificity – SPC), giá trị dự đoán dương tính (positive predicted value – PPV), giá trị dự đoán âm tính (negative predicted value – NPV), độ chính xác cân bằng (balanced accuracy – BAC), chỉ số trung bình điều hòa giữa PPV và TPR (F1 score), thước đo chính xác dự đoán cân đối giữa độ nhạy và độ đặc hiệu (bookmaker informedness BM), khoảng cách Euclide giữa độ nhạy và độ đặc hiệu là ngắn nhất (d-distance).



Biểu đồ 3.7. Lựa chọn ngưỡng cắt tối ưu

Dựa vào 8 chỉ số đánh giá chất lượng mô hình đã nêu trên có thể thấy ngưỡng cắt cho dự đoán bệnh bằng Hcy dao động xung quanh ngưỡng 7,5 – 10 ($\mu\text{mol/L}$). Tuy nhiên để đánh giá chi tiết và khách quan hơn cho ngưỡng dự đoán bằng nồng độ Hcy chúng tôi dựa vào 4 chỉ số đánh giá sự cân bằng của mô hình là d-distance, BM, F1 score, BAC. Từ đó nhóm nghiên cứu xác định được 2 ngưỡng cắt tối ưu như sau:

Bảng 3.17. Xác định ngưỡng cắt tối ưu theo d-distance, BM, F1 score, BAC

Tiêu chí	F1 score	BM lớn	d-distance	BAC lớn
Giá trị	lớn nhất	nhất	nhỏ nhất	nhất
Ngưỡng cắt tối ưu	8,11	8,67	8,67	8,67
TPR	0,76	0,66	0,66	0,66
SPC	0,65	0,77	0,77	0,77
FPR	0,35	0,23	0,23	0,23
FNR	0,24	0,34	0,34	0,34
BAC	0,7	0,72	0,72	0,72
PPV	0,69	0,75	0,75	0,75
NPV	0,73	0,69	0,69	0,69
F1	0,72	0,7	0,7	0,7
d_distance	0,42	0,41	0,41	0,41
BM	0,41	0,43	0,43	0,43

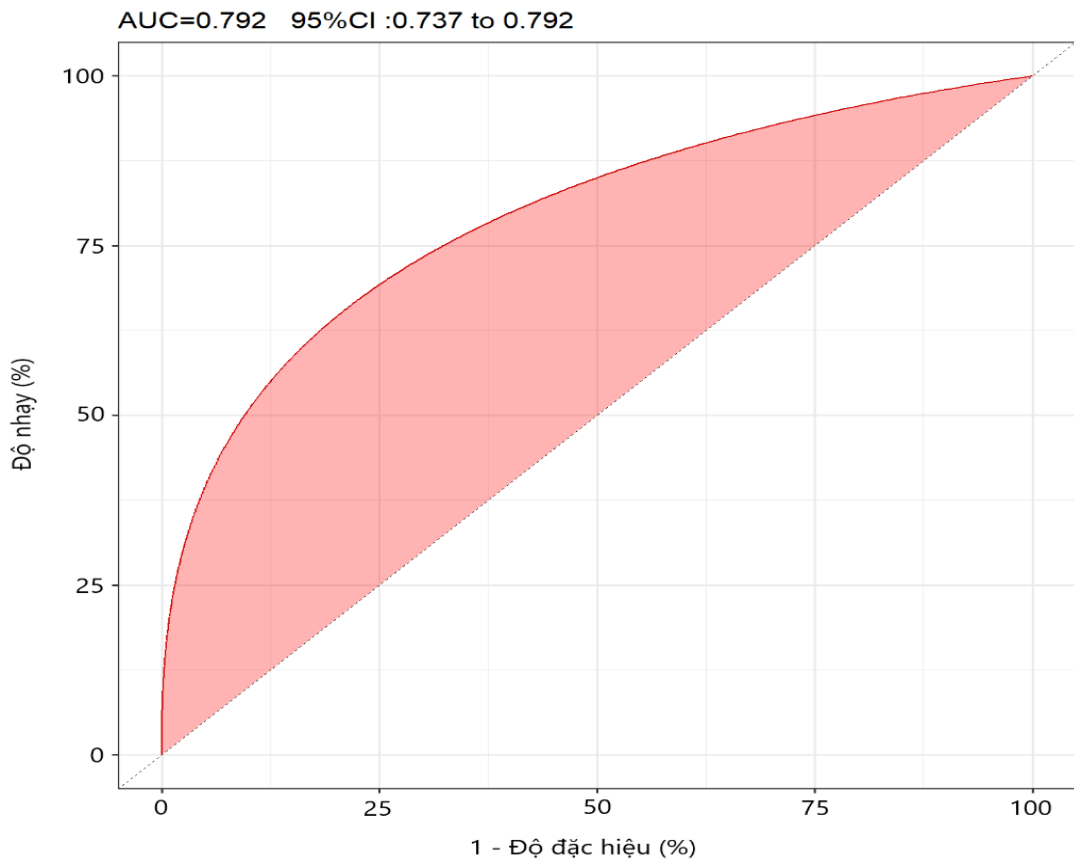
Bảng 3.17 cho thấy với 3 tiêu chí lựa chọn ngưỡng cắt tối ưu là BM tối đa, d-distance tối thiểu và BAC tối đa đều cho thấy ngưỡng cắt tối ưu để chẩn đoán tăng nồng độ Hcy trong đối tượng có nguy cơ thai chết lưu tái diễn này là 8,67 ($\mu\text{mol/L}$). Với ngưỡng chẩn đoán tăng nồng độ Hcy là 8.67 ($\mu\text{mol/L}$) độ nhạy đạt 66% và độ đặc hiệu đạt 77% và chỉ số F1 score là 70% và giá trị chẩn đoán dương tính đạt 75%, giá trị chẩn đoán âm tính đạt 69% (chi tiết theo phụ lục 7).

Trong khi lấy tiêu chí F1 score tối đa làm tiêu chí chính thì ngưỡng của nồng độ Hcy được lựa chọn là 8,11 ($\mu\text{mol/L}$), độ nhạy đạt được là 76% tăng hơn 10% so với ngưỡng 8,67 ($\mu\text{mol/L}$) nhưng độ đặc hiệu lại giảm xuống 12% chỉ đạt 65% và giá trị chẩn đoán dương tính chỉ đạt 69%.

Từ kết quả này chúng ta có thể thấy rằng ngưỡng cắt tối ưu của nồng độ Hcy để dự đoán nguy cơ có tình trạng thai chết lưu tái diễn là 8,67 ($\mu\text{mol/L}$).

3.3.5.3. Đánh giá mô hình nghiên cứu

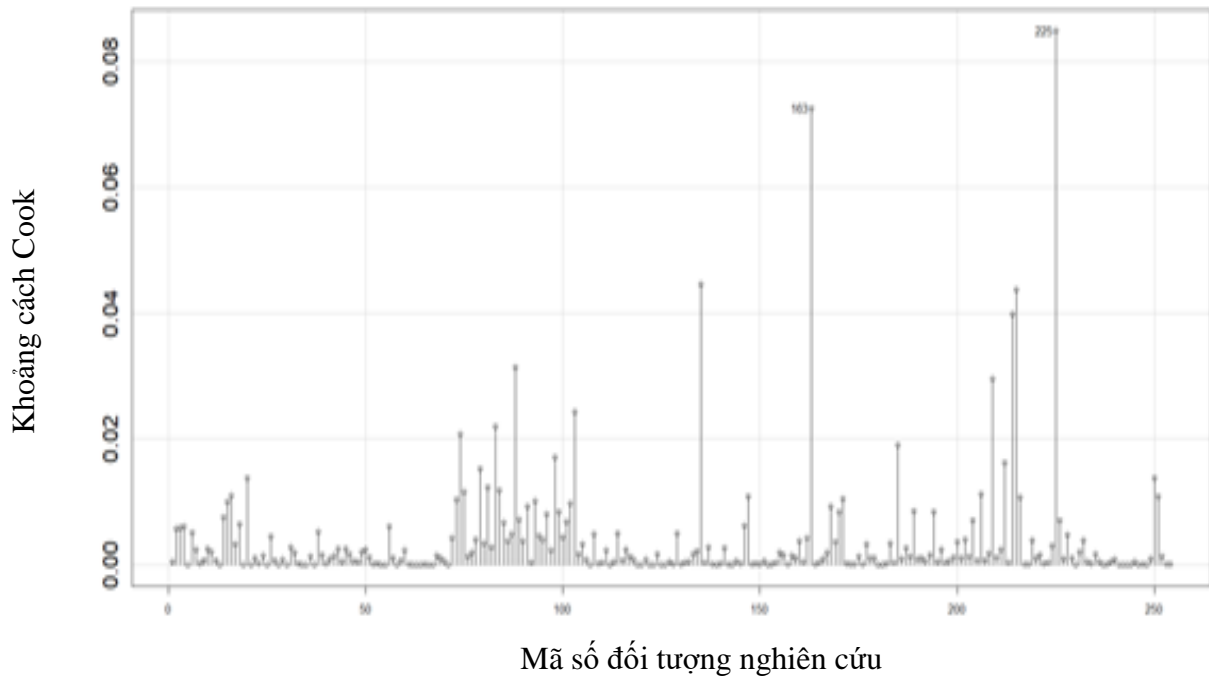
Đánh giá ngưỡng tăng của nồng độ Hcy trên nhóm bệnh bằng AUC



Biểu đồ 3.8. Biểu đồ ROC cho dự đoán nguy cơ có bệnh bằng nồng độ Hcy

Biểu đồ 3.8 cho thấy với giá trị nồng độ Hcy với ngưỡng 8,67 ($\mu\text{mol/L}$) giúp dự đoán nguy cơ thai chết lưu tái diễn với diện tích dưới đường cong ROC (Area Under the Curve – AUC) là 79,2% và khoảng tin cậy 95% của giá trị này dao động từ 73,5% đến 79,1%.

Xác định giá trị ngoại lai bằng chỉ số Cook's Distance



Biểu đồ 3.9. Xác định giá trị ngoại lai bằng mô hình đơn biến bằng Cook's Distance

Biểu đồ 3.9 cho thấy chỉ số Cook's Distance chủ yếu nằm trong khoảng nhỏ hơn 0,04. Hai đối tượng có ID là 163 và 225 được gọi ý là giá trị ngoại lai trong dữ liệu. Tuy nhiên khi đánh giá chi tiết chỉ số này vẫn nằm trong mức giới hạn cho phép.

Như vậy, có thể thấy mô hình dự đoán với nồng độ $\geq 8,67(\mu\text{mol/L})$ là phù hợp và có tính ổn định cao.

3.3.5.4. Xây dựng mô hình tiên lượng thai chết lưu tái diễn

Các nghiên cứu đã được công bố cho thấy có mối liên hệ giữa tuổi, đa hình gen MTHFR vị trí A1298C, C677T, sự tăng nồng độ Hcy, giảm nồng độ folat huyết thanh với tình trạng thai lưu tái diễn. Từ đó, nhóm nghiên cứu tiến hành xây dựng mô hình hồi quy logistic đa biến dựa trên giả định đã nêu. Chúng tôi sử dụng phương pháp suy luận Bayes để xác định mô hình tối ưu dựa trên chỉ số BIC và xác suất hậu định của mô hình.

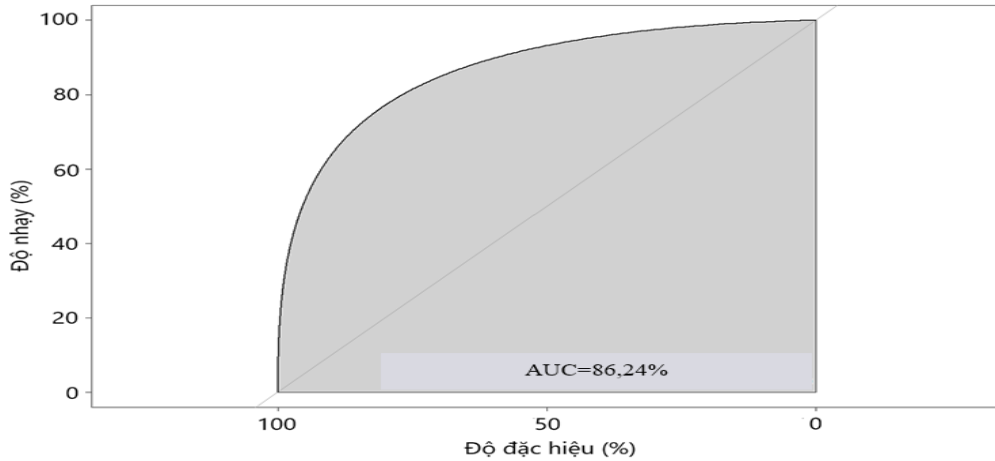
Xác định mô hình tối ưu

Bảng 3.18. Xác định mô hình tối ưu dựa trên các biến nghiên cứu

Mô hình Các biến số NC	Mô hình đã xây dựng		Mô hình tối ưu		
	p!=0	EV (SD)	Mô hình 1	Mô hình 2	Mô hình 3
Intercept	100	-5,87 ± 1,06	-5,78	-6,94	-4,78
Tuổi (năm)	8	0,00 ± 0,01	-	-	-0,03
Homocystein (µmol/L)	100	0,50 ± 0,08	0,50	0,53	0,50
Folat (ng/mL)	15	0,01 ± 0,04	-	0,08	-
C677T	100				
CC (Không đa hình)		<i>Tham chiếu</i>	<i>Tham chiếu</i>	<i>Tham chiếu</i>	<i>Tham chiếu</i>
CT (Đa hình dị hợp tử)		1,81 ± 0,37	1,80	1,81	1,84
TT (Đa hình đồng hợp tử)		2,70 ± 0,91	2,68	2,80	2,66
A1298C	100				
AA (Không đa hình)		<i>Tham chiếu</i>	<i>Tham chiếu</i>	<i>Tham chiếu</i>	<i>Tham chiếu</i>
AC (Đa hình dị hợp tử)		1,00 ± 0,37	1,01	0,97	1,06
CC (Đa hình đồng hợp tử)		2,51 ± 0,75	2,52	2,50	2,49
Số lượng biến			3	4	4
BIC			-1143,00	-1140,00	-1139,00
post prob			0,77	0,15	0,08

Bảng 3.18 cho thấy mô hình tối ưu được xác định là mô hình bao gồm 3 biến là nồng độ Hcy, C677T và A1298C, do nó có xác suất hậu định cao nhất 77% (nghĩa là nếu tái lập nghiên cứu tương tự khả năng thu được mô hình gồm 3 biến này đạt mức 77%).

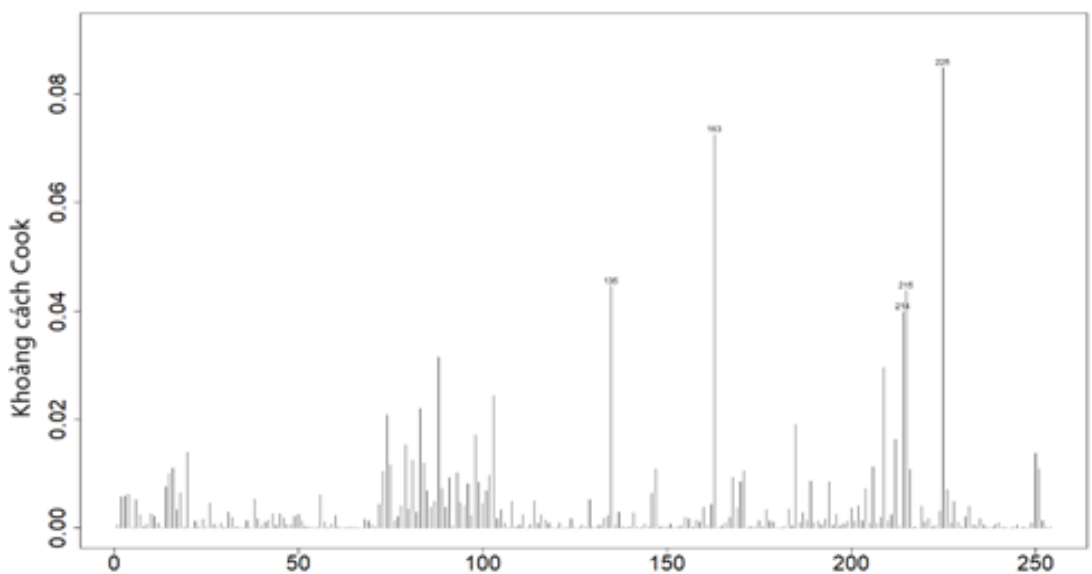
Đánh giá chất lượng của mô hình theo 3 biến: nồng độ Hcy, đa hình C677T và A1298C



Biểu đồ 3.10. Đánh giá chất lượng mô hình với đường cong ROC

Biểu đồ 3.10 mô hình 1 với ba biến được sử dụng để xây dựng mô hình là nồng độ Hcy, C677T và A1298C cho kết quả phân loại tốt khi đạt mức AUC là 86,24%.

Xác định giá trị ngoại lai với chỉ số Cook's Distance

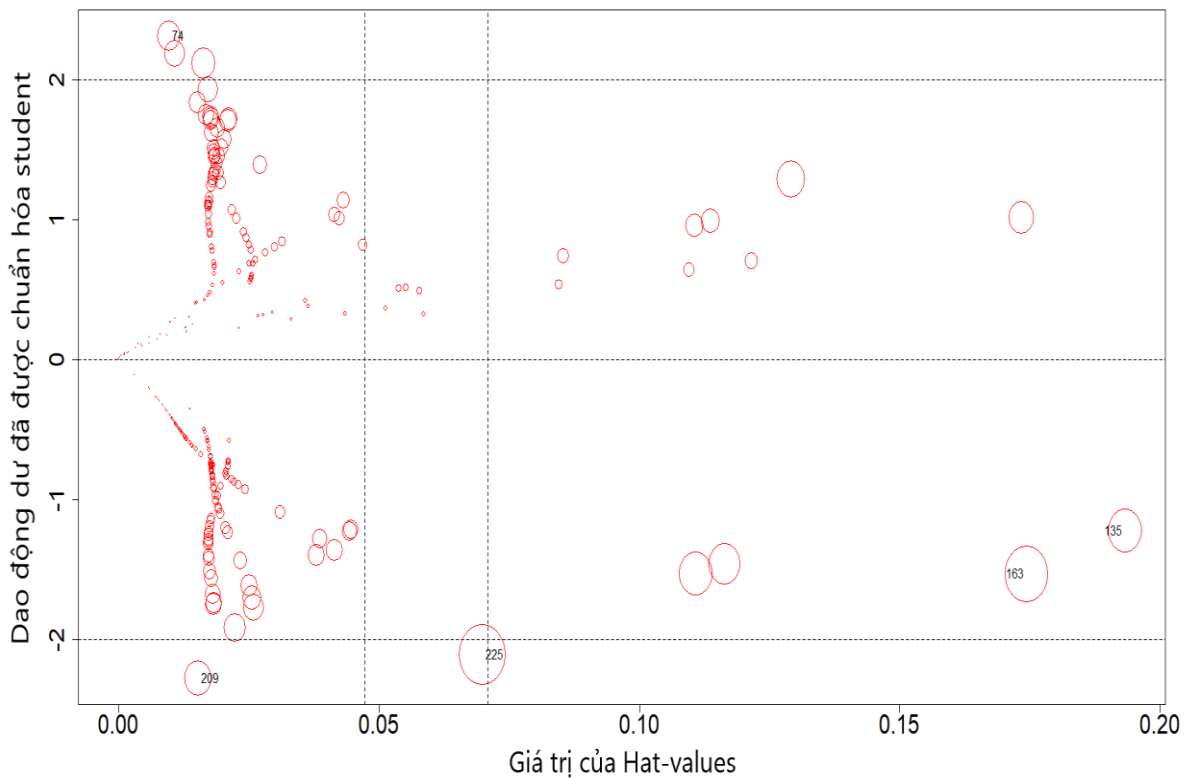


Mã số đối tượng nghiên cứu

Biểu đồ 3.11. Xác định giá trị ngoại lai bằng mô hình đa biến bằng Cook's Distance

Biểu đồ 3.11 cho thấy chỉ số Cook's Distance chủ yếu nằm trong khoảng nhỏ hơn 0,05. Hai đối tượng có ID là 135 và 163 được gọi ý là giá trị ngoại lai trong dữ liệu. Tuy nhiên khi đánh giá chi tiết chỉ số này vẫn nằm trong mức giới hạn cho phép.

Đánh giá các điểm ngoại lai với chỉ số hat-values và studentized Residuals



Biểu đồ 3.12. Đánh giá chất lượng với chỉ số hat-values và studentized Residuals

Mối tương quan giữa hat-values và studentized Residuals là chỉ số quan trọng trong đánh giá chất lượng của mô hình. Biểu đồ 3.12 cho thấy chất lượng mô hình khá tốt do đa số các giá trị của hat-values đều nằm trong khoảng -2 đến 2 của studentized Residuals.

3.3.5.5. Đánh giá đóng góp của các biến trong mô hình đa biến

Đánh giá đóng góp của các biến vào mô hình tối ưu

Bảng 3.19. Đánh giá tỷ suất chênh OR của các biến trong mô hình

Chỉ số dự đoán Biến nghiên cứu	OR	Sai số chuẩn (SE)	CI	p
(Intercept)	0,00	0,82	0,00 – 0,01	<0,001
Homocystein ($\mu\text{mol/L}$)	1,64	0,08	1,41 – 1,96	<0,001
C677T				
CC (Không đa hình)	Tham chiếu			
CT (Đa hình dị hợp tử)	6,07	0,37	3,00 – 12,93	<0,001
TT (Đa hình đồng hợp tử)	14,62	0,91	2,85 – 114,77	0,003
A1298C				
AA (Không đa hình)	Tham chiếu			
AC (Đa hình dị hợp tử)	2,73	0,37	1,34 – 5,78	0,007
CC (Đa hình đồng hợp tử)	12,43	0,75	3,17 – 64,22	0,001

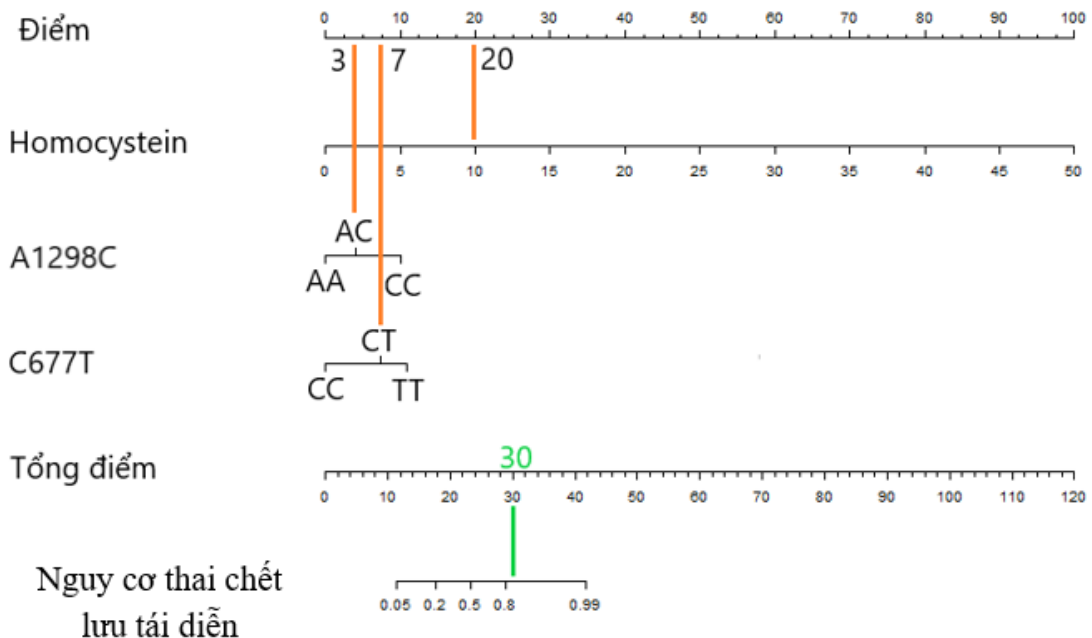
Đối tượng có cùng kiểu gen A1298C và C677T mà nồng độ Hcy cao hơn 1 ($\mu\text{mol/L}$) thì có khả năng thai chết lưu tái diễn cao hơn 1,64 lần với khoảng tin cậy 95% là từ 1,41 đến 1,96 lần, mối liên quan này có ý nghĩa thống kê, $p < 0,001$.

Nếu nhóm người có cùng kết quả nồng độ Hcy và cùng kiểu gen A1298C thì đối tượng có đa hình dị hợp tử dạng 677CT sẽ có khả năng thai chết lưu tái diễn cao gấp 6 lần so với đối tượng không có đa hình và khoảng tin cậy 95% của OR là từ 3,00 đến 12,93. Mối quan hệ này có ý nghĩa thống kê, $p < 0,001$.

Tương tự, nếu đối tượng có đa hình dạng đồng hợp tử 677TT thì khả năng thai chết lưu tái diễn tăng lên 14,6 lần so với đối tượng không đa hình với khoảng tin cậy 95% dao động từ 2,85 đến 114,77. Mối quan hệ này có ý nghĩa thống kê, $p = 0,003$.

Nếu nhóm người có cùng kết quả xét nghiệm Hcy và có cùng kiểu gen C677T thì đối tượng có đa hình dị hợp tử dạng 1298AC sẽ có khả năng thai chết lưu tái diễn cao gấp 2,7 lần so với đối tượng không có đa hình và khoảng tin cậy 95% của OR là từ 1,34 đến 5,78, mối quan hệ này có ý nghĩa thống kê với $p = 0,007$. Tương tự, nếu đối tượng có đa hình dạng đồng hợp tử 1298CC thì khả năng thai chết lưu tái diễn tăng lên 12,4 lần so với đối tượng không có đa hình với khoảng tin cậy 95% dao động từ 2,85 đến 114,77, mối quan hệ này có ý nghĩa thống kê với $p = 0,003$.

Mô hình tiên lượng



Biểu đồ 3.13. Biểu đồ Nomogram cho mô hình dự báo nguy cơ thai chết lưu tái diễn

Nếu đối tượng có đa hình A1298C dạng dị hợp tử AC (quy đổi điểm tương ứng là 3 điểm) và đa hình dị hợp C677T dạng CT (quy đổi điểm tương ứng là 7 điểm) và có nồng độ Hcy là 10,0 ($\mu\text{mol/L}$) (quy đổi điểm tương ứng là 20 điểm). Như vậy điểm tổng của đối tượng này là 30 sẽ có nguy cơ thai chết lưu tái diễn đáng theo thước đo sẽ là lớn hơn 80%.

Chương 4

BÀN LUẬN

Ở hầu hết các nước phát triển, việc mang thai có kế hoạch, ít biến chứng và kết quả thường thuận lợi cho cả mẹ và con. Các kết quả bất lợi thường xuyên xảy ra hơn nhiều ở các nước đang phát triển (WHO, 2018).¹¹⁴ Hậu quả bất lợi nghiêm trọng nhất của thai kỳ là tử vong của mẹ và/ hoặc con. Các biến chứng thai kỳ liên quan đến mạch máu là nguyên nhân chính gây ra những kết cục bất lợi này cho mẹ và thai nhi. Sự phát triển của nhau thai trong thời kỳ đầu mang thai có thể bị ảnh hưởng xấu bởi sự tăng nồng độ Hcy huyết thanh của người mẹ.¹¹⁵

Sự tăng nồng độ Hcy huyết thanh ở phụ nữ mang thai có liên quan đến các tình trạng bất lợi khác nhau cho mẹ và thai nhi đã được một số tác giả mô tả như: mất thai tái diễn (recurrent pregnancy loss: RPL) do Wouters MG mô tả năm 1993,¹¹⁶ tình trạng rau bong non được Ananth CV mô tả năm 2007¹¹⁷ tiền sản giật do tác giả Dekker GA mô tả năm 1995,¹¹⁸ hạn chế sự phát triển của thai nhi, tử vong chu sinh,¹¹⁹ thai chết lưu (stillbirth),⁹⁴ các dị tật thai nhi (fetal malformations), dị tật ống thần kinh (neural tube defects).¹²⁰ Tác giả Vollset SE¹²¹ cũng đã công bố ảnh hưởng của tăng nồng độ Hcy huyết thanh lên nhiều tình trạng sản khoa bất lợi như: tiền sản giật, rau bong non, thai chậm phát triển trong tử cung, sinh non, trẻ nhẹ cân và thai chết lưu. Gần đây tác giả Liu C¹²² đã mô tả sự ảnh hưởng của tăng nồng độ Hcy huyết thanh lên các biến chứng sản khoa như tương tự như tác giả Vollset SE. Tuy nhiên, quan hệ nhân quả và tầm quan trọng lâm sàng của những liên quan này còn chưa được chứng minh một cách chắc chắn.

Trên thế giới vẫn còn có những bằng chứng mâu thuẫn về tăng nồng độ Hcy, giảm nồng độ folat huyết thanh của người mẹ là một yếu tố nguy cơ đối

với các biến chứng thai kỳ. Do đó, đề tài này được tiến hành nghiên cứu nhằm mục đích đánh giá sự liên quan của sự tăng nồng độ Hcy, giảm nồng độ folat huyết thanh của người mẹ với biến chứng thai kỳ liên quan đến mạch máu có tầm quan trọng trong lâm sàng là thai chết lưu tái diễn với hy vọng thiết lập cảnh báo lâm sàng hữu ích như một dấu hiệu để xác định những phụ nữ mang thai có nguy cơ, nhằm giảm thiểu những kết quả thai nghén không mong muốn.

Sự tăng nồng độ Hcy huyết thanh có liên quan với tính đa hình của gen MTHFR và liên quan với một số bất lợi về sản khoa nên những liên quan này đã được quan tâm trong một thời gian dài.¹²³ Sự liên quan giữa các đa hình gen MTHFR và tình trạng thai chết lưu tái diễn đã được nhiều tác giả khác nhau báo cáo như Nurk E năm 2004¹²⁴ và Tiwari D năm 2015.¹²⁵ Mặt khác, người ta cần phải xem xét bản chất rối loạn và nồng độ, độ mạnh của các liên quan này để hiểu cơ sở sinh học đằng sau sự rối loạn chuyển hóa Hcy và folat liên quan đến di truyền này và để có các quy trình quản lý những thai phụ tốt hơn.¹²⁶⁻

128

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về nồng độ Hcy, folat và đa hình gen MTHFR ở phụ nữ có bất thường thai sản vẫn còn khá mới mẻ, chưa có một nghiên cứu nào công bố về mối liên quan giữa nồng độ Hcy, folat huyết thanh với các đa hình gen MTHFR trên các bệnh lý khác nhau. Chính vì vậy nghiên cứu của chúng tôi thực hiện trên 128 bệnh nhân có tiền sử thai lưu tái diễn và 126 người phụ nữ đã sinh con bình thường ngay lần đầu tiên nhằm đánh giá sự ảnh hưởng của nồng độ Hcy, folat hay đa hình gen MTHFR lên tình trạng bất thường thai sản này. Đồng thời cũng đưa ra mối liên quan của các yếu tố nghiên cứu đối với việc đánh giá nguy cơ bất thường thai sản. Nghiên cứu của chúng tôi cũng đã thu được kết quả có ý nghĩa đến việc dự báo nguy cơ có tình trạng thai chết lưu trên quần thể phụ nữ trong độ tuổi sinh sản được nghiên cứu. Các kết quả này sẽ được bàn luận trong tổng hòa các nghiên cứu trong khu vực và

trên thế giới. Chúng tôi sẽ bàn luận toàn bộ kết quả theo 3 nội dung: (1) nồng độ Hcy, folat huyết thanh ở nhóm phụ nữ có tiền sử thai chết lưu tái diễn; (2) đa hình gen MTHFR ở nhóm phụ nữ có tiền sử thai chết lưu tái diễn và; (3) mối liên quan giữa nồng độ Hcy, folat huyết thanh với đa hình gen MTHFR trên nhóm đối tượng nghiên cứu.

4.1. Nồng độ folat, homocystein huyết thanh ở bệnh nhân có tiền sử thai chết lưu tái diễn

Đặc điểm của nhóm đối tượng nghiên cứu

Về độ tuổi của nhóm đối tượng nghiên cứu, với 128 bệnh nhân có tiền sử thai chết lưu tái diễn có độ tuổi trung bình là $30,5 \pm 5,17$ và 126 phụ nữ khỏe mạnh đã sinh con bình thường ngay lần đầu tiên với độ tuổi trung bình là $31,1 \pm 4,67$ (bảng 3.1), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Điều này cho thấy sự khác quan khi so sánh sự khác biệt các chỉ số sinh hóa trong hai nhóm nghiên cứu này. Mang thai ở tuổi ≥ 35 được cho là tăng nguy cơ bất thường thai sản do tuổi mẹ cao có ảnh hưởng đến chuyên hóa của tế bào và cơ thể.¹²⁹ Để đánh giá nồng độ Hcy và folat theo độ tuổi đặc biệt là liên quan đến các bất thường thai sản, nghiên cứu này đã phân tích so sánh nồng độ Hcy và folat ở các độ tuổi < 35 tuổi và ≥ 35 tuổi (bảng 3.2). Kết quả cho thấy không thấy có sự khác biệt về nồng độ Hcy và folat huyết thanh ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng. Đã có một số nghiên cứu chỉ ra rằng nồng độ Hcy và folat có sự khác biệt ở người cao tuổi,¹³⁰ tuy nhiên nhóm đối tượng nghiên cứu của chúng tôi tập trung độ tuổi từ 18-45. Ở người lớn, tuổi càng cao, chuyên hóa trong cơ thể có xu hướng thay đổi chủ yếu từ tổng hợp sang thoái hóa nên các sản phẩm chuyên hóa nội sinh như folat và Hcy thay đổi nồng độ đáng kể. Ngoài ra chuyên hóa của Hcy còn phụ thuộc và các chất xúc tác là các vitamin nhóm B. Ở người cao tuổi, khả năng hấp thu các vitamin tại ruột non bị giảm vì vậy quá trình chuyên hóa của Hcy cũng bị giảm gây nên tình trạng tăng nồng độ Hcy ở người cao tuổi, đặc biệt là tuổi trên 60.¹³¹ Tuy nhiên, nghiên cứu này cho thấy

các ngưỡng tuổi phụ nữ trong độ tuổi sinh sản, đặc biệt nhóm phụ nữ trên 35 - 45 tuổi, là tuổi được cho rằng có nguy cơ cao về các bất thường thai sản, không thấy có sự thay đổi nồng độ Hcy hoặc folat so với nhóm tuổi từ 18 - 35. Vì vậy sự không khác biệt về nồng độ Hcy và folat theo độ tuổi trong nhóm nghiên cứu này cũng phù hợp với các nhận định khác trên thế giới.

Đối với nhóm chứng, đối tượng nghiên cứu được chọn từ độ tuổi 18-45, đã sinh con khỏe mạnh ít nhất một lần, không có tiền sử sảy thai, thai chết lưu hay mang thai dị tật, vì vậy số lần mang thai ≥ 1 nhưng không có số lần mất thai. Đối với nhóm bệnh, lựa chọn đối tượng có ít nhất 2 lần thai chết lưu theo tiêu chuẩn chẩn đoán của TCYTGG²¹ và theo tài liệu ban hành của bộ Y tế Việt Nam²². Kết quả số lần mất thai ở nhóm bệnh trong nghiên cứu là $3,17 \pm 1,29$ lần, phù hợp với đối tượng nghiên cứu. Có nhiều đối tượng mất thai nhiều lần (≥ 4 lần) chiếm 35/128 (27,3%) đối tượng nghiên cứu, tuy nhiên chúng tôi không phân tích số lần mất thai liên quan đến nồng độ Hcy và folat huyết thanh hay các đa hình gen MTHFR do số lần thai chết lưu còn phụ thuộc vào thời điểm đến khám. Đã có trường hợp mất thai 7 lần ở phụ nữ 42 tuổi.

Các phương pháp xét nghiệm để đánh giá các biến số nghiên cứu đều được lựa chọn tối ưu nhất trong điều kiện hiện nay tại Việt Nam. Để xác định nồng độ Hcy, folat huyết thanh, có nhiều phương pháp để thực hiện như, miễn dịch hóa phát quang, miễn dịch điện hóa phát quang, phương pháp động học enzym hay sắc kí lỏng khối phổ. Chúng tôi lựa chọn phương pháp miễn dịch hóa phát quang trên hệ thống Abbott với các lý do:

- Vật liệu tham chiếu chuẩn: xét nghiệm đo nồng độ homocystein huyết thanh bằng phương pháp điện hóa phát quang của Roche và phương pháp miễn dịch hóa phát quang của Abbott có cùng phương pháp chuẩn kí hiệu là NIST SRM 1955. Xét nghiệm folat của hai hệ thống cũng có cùng vật liệu tham chiếu chuẩn là: W.H.O. Serum Folate International Standard 03/178.

- Về hệ số biến thiên %CV của 2 hệ thống hóa phát quang và điện hóa phát quang là tương đương nhau < 2,5%.

- Phương pháp động học enzym thì có hệ số biến thiên cao hơn nhiều phương pháp miễn dịch với %CV có thể lên đến 10%. Phương pháp sắc kí lỏng khối phổ hiện nay chưa phổ biến tại Việt Nam do thiết bị phân tích đắt, tốc độ phản ứng chậm và phụ thuộc nhiều vào người thực hiện xét nghiệm, chưa phân tích tự động hoàn toàn như phương pháp miễn dịch.

Vì vậy chúng tôi lựa chọn phân tích trên hệ thống miễn dịch của Abbott là thiết bị có sẵn tại địa điểm tham gia nghiên cứu.

Đánh giá nồng độ Hcy trên nhóm đối tượng nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi ở thu được nồng độ Hcy huyết thanh ở nhóm chúng là $7,64 \pm 1,78$ ($\mu\text{mol/L}$) (bảng 3.3) nằm trong khoảng tham chiếu là 4,02-11,06 ($\mu\text{mol/L}$) và tương đồng với giá trị (Mean \pm SD) = $7,59 \pm 1,85$ ($\mu\text{mol/L}$), $p=0,75$ mà chúng tôi đã xây dựng trong một nghiên cứu năm 2019 với cùng nhóm đối tượng.¹³² Theo khuyến cáo của Viện tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm Hoa Kỳ (Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI) thì các phòng xét nghiệm nên tự xây dựng khoảng tham chiếu cho mình theo quần thể người mà phòng xét nghiệm đó cung cấp dịch vụ. Vì vậy các xét nghiệm đưa vào nghiên cứu chúng tôi cũng đã xây dựng khoảng tham chiếu trên cùng đối tượng nghiên cứu. Kết quả nhóm chúng cũng được so sánh với một số nghiên cứu trong nước và trên thế giới, phân tích sự khác biệt để đánh giá hiệu quả của phương pháp nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu này cho thấy có sự tương đồng (không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p= 0,06$) với kết quả của Dương Thị Tuyết¹³³, nhưng có sự khác biệt rõ rệt với nghiên cứu của Osunkalu VO¹³⁴ và Scazzone C¹³⁵. Sự khác nhau về kết quả của chúng tôi so với các kết quả của các nhà khoa học quốc tế có thể do một số yếu tố khác có thể ảnh hưởng đến kết quả nồng độ Hcy huyết thanh, chẳng hạn như kỹ thuật sử dụng, tuổi,

giới, chủng tộc và việc bổ sung vitamin nhóm B. Về phương pháp phân tích, chúng tôi phân tích các xét nghiệm trên hệ thống miễn dịch Architect của Abbott bằng phương pháp miễn dịch hóa phát quang. Độ ổn định của xét nghiệm homocystein là $CV < 2,5\%$. Kết quả của nồng độ Hcy huyết thanh trong nghiên cứu của Scazzone C cũng phân tích trên hệ thống của Abbott nhưng có khác biệt có ý nghĩa thống kê, điều này có thể do đối tượng nghiên cứu của Scazzone C có độ tuổi là (57 ± 12) không tương đồng với độ tuổi của nghiên cứu này. Nghiên cứu của Osunkalu VO sử dụng phương pháp ELISA cho xét nghiệm đo nồng độ Hcy huyết thanh, vì vậy kết quả nghiên cứu không tương đồng với kết quả của chúng tôi. Về đối tượng nghiên cứu, chúng tôi tập trung vào nhóm phụ nữ trong độ tuổi sinh đẻ, từ 18-45 tuổi, các kết quả nghiên cứu khác trên thế giới chỉ ra rằng, nồng độ Hcy và folat huyết thanh có sự khác biệt giữa tuổi và giới, kết quả của chúng tôi có thể không tương đồng với một số nghiên cứu khác do không cùng tuổi, giới. Mặc dù không tương đồng về kết quả nghiên cứu ở nhóm chúng so với các nghiên cứu trên thế giới nhưng phù hợp với nghiên cứu trong nước, vì vậy phương pháp phân tích được lựa chọn là phù hợp để nghiên cứu trong giai đoạn hiện tại ở Việt Nam.

Kết quả nồng độ Hcy huyết thanh ở đối tượng có tiền sử thai chết lưu tái diễn trong nghiên cứu của chúng tôi là: $11,73 \pm 6,08$ ($\mu\text{mol/L}$) (bảng 3.3) có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng với $p < 0,001$. Điều này cho thấy nồng độ Hcy huyết thanh là yếu tố dự đoán cho nguy cơ thai chết lưu ở phụ nữ tuổi sinh sản. Tăng nồng độ Hcy máu (hyperhomocysteinemia) dẫn đến hậu quả bất lợi trong thai kỳ được giải thích thông qua một số cơ chế liên quan đến sự hình thành huyết khối bao gồm dòng thác đông máu (coagulation cascade), huyết khối tĩnh mạch, phản ứng oxy hóa-khử nội mô và các tế bào cơ trơn mạch máu. Các cơ chế có thể độc lập hoặc kết hợp gây ảnh hưởng đến thai kỳ ở các tuần thai khác nhau. Thực tế đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới về mối liên

quan này. Tác giả Vollset SE và cộng sự năm 2000 tại Mỹ¹²¹ đã công bố một nghiên cứu kéo dài gần 30 năm với cỡ mẫu rất lớn về ảnh hưởng của nồng độ Hcy lên một số bất thường thai sản như: tiền sản giật, rau bong non, thai chậm phát triển trong tử cung, sinh non, trẻ sinh nhẹ cân và thai chết lưu. Tác giả đã chia nồng độ Hcy thành 4 nhóm (tứ phân vị) theo nồng độ Hcy như sau: nhóm 1 có nồng độ Hcy là 3,6–7,5 $\mu\text{mol/L}$; nhóm 2 có nồng độ Hcy là 7,6–8,8 $\mu\text{mol/L}$; nhóm 3 có nồng độ Hcy là 8,9–10,6 $\mu\text{mol/L}$ và nhóm 4 có nồng độ Hcy là 10,7–78 $\mu\text{mol/L}$. Trong đó số đối tượng có tiền sử thai chết lưu là 388, tác giả đã so sánh tứ phân vị trên với tứ phân vị dưới của nồng độ Hcy huyết thanh cho thấy: tỷ suất chênh giữa tứ phân vị 3 so với tứ phân vị 1 là $\text{OR}=2,73$ ($\text{CI}=1,03 - 7,27$). Tỷ suất chênh giữa tứ phân vị 4 so với tứ phân vị 1 là $\text{OR}=3,68$ ($\text{CI}=1,38 - 9,82$). Như vậy, theo các tác giả này, nồng độ Hcy huyết thanh tăng cao có liên quan đến các biến chứng thai kỳ phổ biến đặc biệt là tình trạng thai chết lưu. Nồng độ Hcy tăng vừa phải có thể do tình trạng vitamin B bị giảm ảnh hưởng đến quá trình tái methyl hóa Hcy, methyl hóa và tổng hợp DNA, ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường của thai nhi. Mặt khác, Hcy cao có thể gây rối loạn chức năng mạch máu, dễ dẫn đến bong nhau thai. Các kết quả này cho thấy vai trò quan trọng của Hcy như là một dấu hiệu của các biến chứng thai kỳ và các hậu quả bất lợi của sự thai nghén.¹²¹

Nồng độ homocystein huyết thanh được cho là yếu tố nguy cơ đối với quá trình mang thai, vì vậy, để xác định nồng độ homocystein huyết thanh trong thai kỳ và sự thay đổi nồng độ qua các chu kỳ của thai, MC Walker đã chứng minh nồng độ Hcy thay đổi qua các quý của thai kỳ và thấp hơn đáng kể so với giai đoạn không mang thai.¹³⁶ Để giải thích điều này Andersson A đã nghiên cứu nồng độ homocystein huyết thanh và nhận thấy nồng độ Hcy thấp nhất ở quý III của thai kỳ bằng khoảng 50% lúc chưa mang thai, nồng độ Hcy trở lại sau 2-4 ngày sau sinh.¹³⁷ Khi mang thai, cơ thể mẹ có nhu cầu cao

methionin cho việc hình thành và phát triển của thai nhi. Vì vậy homocystein sẽ được huy động để tái methyl hóa nên nồng độ trong huyết thanh giảm nhiều. Mascarenhas M và cộng sự¹³⁸ đã nghiên cứu trên 100 đối tượng đang mang thai ở tuần thứ 8-12 để xác định nồng độ Hcy. Kết quả cho thấy nhóm đối tượng không có tiền sử thai chết lưu trước đó có nồng độ Hcy là $13,16 \pm 5,75 \mu\text{mol/L}$ (n=91) có sự khác biệt rõ rệt với nhóm đối tượng có tiền sử thai chết lưu có nồng độ Hcy huyết thanh là $23,79 \pm 9,21 \mu\text{mol/L}$ (n=9). Mặc dù nồng độ Hcy khi mang thai thấp hơn giai đoạn không mang thai nhưng khi nồng độ Hcy tăng lên trong huyết thanh vẫn là yếu tố nguy cơ bất lợi cho thai kì.

Homocystein được chuyển hóa theo 3 con đường: tạo thành cystein, tái methyl hóa để thành methionin hay đóng vòng để tạo thành Hcy-thiolacton. Các con đường chuyển hóa đều có sự tham gia xúc tác của các enzym hoặc các coenzym là các vitamin. Kumar và cộng sự¹³⁹ nghiên cứu tại Ấn Độ đã cho rằng sự tăng nồng độ Hcy máu dường như được xác định bởi cả yếu tố di truyền và môi trường. Nghiên cứu được thực hiện để tìm ra sự tương tác giữa tình trạng folat và đa hình gen MTHFR đối với nồng độ Hcy ở 24 phụ nữ bị mất thai liên tiếp ba lần trở lên không giải thích được. Nồng độ Hcy toàn phần huyết thanh lúc đối trung bình ở nhóm nghiên cứu là $10,23 \mu\text{mol/L}$ so với nhóm chứng là $8,95 \mu\text{mol/L}$ có sự khác biệt với $p=0,096$. Nồng độ Hcy huyết thanh tăng cao $>18 \mu\text{mol/L}$, được coi là một yếu tố nguy cơ gây mất thai liên tiếp, được thấy ở 4 phụ nữ trong nhóm nghiên cứu và không có ai trong nhóm chứng. Giá trị cao nhất của nồng độ homocystein được tìm thấy ở những phụ nữ bị mất thai tái diễn với tình trạng đa hình gen MTHFR và nồng độ folat thấp. Puri M và cộng sự⁹⁴ khi nghiên cứu trên 107 phụ nữ có tình trạng thai chết lưu ba lần liên tiếp không rõ nguyên nhân và 343 phụ nữ mang thai 2 lần trở lên thành công và không có biến chứng nhận thấy: nồng độ Hcy trung bình ở nhóm chứng là $8,34 \mu\text{mol/L}$ có sự khác biệt rõ rệt với nhóm có tiền sử thai chết lưu tái phát

là 16,1 $\mu\text{mol/L}$, $p < 0,001$. Tăng nồng độ Hcy máu và thiếu vitamin B₁₂ được phát hiện là yếu tố nguy cơ rõ rệt đối với tình trạng mất thai tái diễn (RPL) với OR = 7,02 và 16,39 tương ứng. Mới đây, Liu C và cộng sự,¹²² khi nghiên cứu nồng độ Hcy và folat huyết thanh trong thời kỳ đầu mang thai và các biến cố có hại cho thai kỳ sau đó ở 563 thai phụ có kết cục bất lợi khi mang thai như tiền sản giật, sinh non, nhẹ cân và thai chết lưu và 600 phụ nữ đối chứng đã thấy rằng: nồng độ trung bình Hcy ở nhóm có thai chết lưu là 8,43 (7,16-14,27) ($\mu\text{mol/L}$) có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nồng độ trung bình Hcy ở nhóm đối chứng là 7,79 (6,9-8,34) ($\mu\text{mol/L}$). Nghiên cứu cũng đánh giá trên nhóm có bổ sung folat so với nhóm không có bổ sung và nhận thấy việc bổ sung folat làm giảm đáng kể các biến cố sản khoa trong đó có thai chết lưu. Tác giả đã kết luận là nồng độ Hcy cao có thể dẫn đến các bất thường thai sản và việc bổ sung folat cải thiện được các biến cố về sản khoa. Như vậy nồng độ homocystein cao là yếu tố nguy cơ với tình trạng bất thường sinh sản như thai chết lưu có thể là yếu tố kết hợp với tình trạng thiếu vitamin nhóm B như: folat, vitamin B₁₂ và yếu tố đa hình gen MTHFR.

Nồng độ homocystein nên được xác định vào thời điểm nào khi mang thai và việc bổ sung vitamin nhóm B nên bắt đầu khi nào? Để trả lời câu hỏi này, Visternicean E và cs¹⁴⁰ đã nghiên cứu trên 50 phụ nữ có tiền sử mất thai tái diễn và thu được kết quả: nồng độ Hcy huyết thanh của nhóm mất thai nguyên phát (chưa có thai kì thành công) là $14,48 \pm 1,49 \mu\text{mol /L}$, nồng độ Hcy trong nhóm mất thai tái diễn thứ phát (đã có thai kì thành công) là $11,55 \pm 0,94 \mu\text{mol/L}$. Đồng thời nồng độ Hcy ở đối tượng có tiền sử mất thai liên tiếp sớm (3 tháng đầu của thai kì) cao hơn nhóm có tiền sử mất thai muộn hơn (3 tháng giữa thai kì) với $p < 0,05$. Tác giả cũng khuyến cáo việc bổ sung Vitamin B nên thực hiện trước 2-3 tháng trước khi thụ thai. Fatih Sanlıkan và cộng sự¹⁴¹ đã nghiên cứu trên 70 phụ nữ có tiền sử sảy thai và thai chết lưu từ 5-12 tuần tuổi

thai và 54 phụ nữ đã sinh con khỏe mạnh bình thường thu được kết quả nồng độ Hcy huyết thanh trong nhóm có tiền sử sảy thai, thai chết lưu tái diễn là $8,7 \pm 4,2 \mu\text{mol /L}$ có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với nồng độ Hcy trong nhóm phụ nữ sinh con khỏe mạnh bình thường là $4,8 \pm 0,9 \mu\text{mol /L}$, $p < 0,01$. Tác giả đưa ra kết luận nồng độ Hcy cao được phát hiện trong những tuần đầu của thai kì có thể là một cảnh báo về nguy cơ sảy thai, thai chết lưu trong những tuần tiếp theo hoặc các biến chứng sản khoa khác. Như vậy việc xác định nồng độ homocystein nên được thực hiện sớm từ trước lúc mang thai hoặc những tuần đầu khi mang thai để có can thiệp kịp thời, giảm các biến chứng bất lợi cho thai kì. Từ các nghiên cứu trên cho thấy đa số các tác giả ủng hộ việc nồng độ Hcy cao có thể là một yếu tố nguy cơ cho các bất lợi về sinh sản trong đó có tình trạng thai chết lưu. Ngoài ra việc xác định nồng độ Hcy nên thực hiện sớm trước khi mang thai cùng với nồng độ các vitamin nhóm B để có kế hoạch phòng ngừa sớm cho thai phụ.

Đánh giá nồng độ folat trên nhóm đối tượng nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu về nồng độ folat huyết thanh cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm đối tượng có tiền sử thai chết lưu tái diễn và nhóm phụ nữ sinh con bình thường làm đối chứng (bảng 3.3). Nồng độ Hcy và folat huyết thanh ở nhóm chứng có mối tương quan nghịch (biểu đồ 3.3), trong khi ở nhóm bệnh không có mối tương quan rõ ràng (biểu đồ 3.4). Điều này được giải thích trong việc đánh giá từ nồng độ folat trên đối tượng khỏe mạnh làm nhóm chứng đến ảnh hưởng của folat lên đối tượng có tiền sử thai chết lưu tái diễn và mối tương quan của nó với nồng độ Hcy huyết thanh. Kết quả nồng độ folat huyết thanh ở nhóm đối chứng thu được là $11,53 \pm 3,21 \text{ ng/mL}$ (bảng 3.3). Kết quả này không tương đồng với một số nghiên cứu trong nước và quốc tế. Nồng độ folat huyết thanh trong nghiên cứu được thực hiện trên hệ thống miễn dịch Architect có độ ổn định CV $< 2,5\%$. Tại Việt Nam chưa có

nghiên cứu nào về nồng độ folat cho đối tượng phụ nữ khỏe mạnh trong độ tuổi sinh sản và theo kết quả so sánh với các nghiên cứu nhóm chứng thì kết quả nghiên cứu này có sự khác biệt rõ rệt có ý nghĩa thống kê với các nghiên cứu khác. Nhóm chứng của Nguyễn Văn Tuấn¹⁴² thực hiện trên nhóm đối tượng có độ tuổi $64,26 \pm 10,53$ (tuổi) và nhóm chứng trong nghiên cứu của Cao Phi Phong¹⁴³ có độ tuổi trung bình là $60,7 \pm 11,9$ (tuổi), đều là nhóm người cao tuổi. Nghiên cứu của Scazzone C và cộng sự¹³⁵ cũng được sử dụng trên hệ thống hóa phát quang tự động, tuy nhiên cũng được thực hiện trên đối tượng có độ tuổi 57 ± 12 (tuổi). Nghiên cứu của Osunkalu VO sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) cho xét nghiệm folat nên cho kết quả không có sự tương đồng với kết quả nghiên cứu này. Nghiên cứu của Juan Ni năm 2017 được thực hiện trên người khỏe mạnh có độ tuổi tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi nhưng lại phân tích bằng phương pháp động học enzym nên kết quả cũng có sự khác biệt rõ rệt. Nghiên cứu của Puri M năm 2013 tại Ấn Độ được phân tích trên hệ thống Siemens Immulite 1000, không cùng phương pháp chuẩn với xét nghiệm trên hệ thống Architect nên kết quả cũng có sự khác biệt rõ rệt. Folat có vai trò như một coenzym, là một chất trung gian trong việc chuyển một đơn vị các bon cho một loạt các phản ứng quan trọng đối với việc tổng hợp của acid nucleic và acid amin.^{17,76} Việc nghiên cứu về nồng độ folat huyết thanh có liên quan đến nhiều bệnh lý khác nhau. Vì vậy cần có một nghiên cứu trên tất cả các đối tượng và phương pháp xét nghiệm cần được xây dựng trên một phương pháp tham chiếu chung để so sánh sự khác biệt về tuổi, giới, chủng tộc, chế độ ăn... thì mới đưa ra được kết luận chính xác liên quan đến bệnh lý. Mặc dù có sự khác biệt rõ rệt về kết quả nồng độ folat huyết thanh trong nhóm chứng do khác nhau về độ tuổi, đối tượng nghiên cứu và phương pháp phân tích, phương pháp xét nghiệm được áp dụng trong nghiên cứu này cũng đã được thẩm định trước khi sử dụng. Kết quả nội kiểm không vi phạm

quy luật Westgard và ngoại kiểm đạt chất lượng theo tiêu chuẩn của chương trình ngoại kiểm quốc tế RIQAS (Anh) và trung tâm kiểm chuẩn chất lượng CAP (Mỹ) cho thấy phương pháp phân tích là đáng tin cậy.

Kết quả nồng độ folat huyết thanh trên đối tượng phụ nữ có tiền sử thai chết lưu tái diễn của nghiên cứu là $11,45 \pm 3,17$ ng/mL (bảng 3.3), không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với nồng độ folat ở nhóm chứng. Nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với nghiên cứu của Kumar và cộng sự.¹³⁹ Tác giả đã nghiên cứu nồng độ folae ở nhóm phụ nữ có tiền sử mất thai tái diễn chưa rõ nguyên nhân và so sánh với nhóm đối chứng thì không thấy có sự khác biệt rõ rệt. Tuy nhiên cũng có nhiều nghiên cứu khác đã chỉ ra sự khác biệt nồng độ folat huyết thanh giữa nhóm bệnh và nhóm chứng. Nelen và cộng sự¹⁴⁴ đã nghiên cứu bệnh chứng cho 123 phụ nữ có ít nhất 2 lần mất thai và 104 phụ nữ đã sinh con khỏe mạnh bình thường, tác giả nhận thấy nồng độ folat huyết thanh trung bình ở nhóm nghiên cứu là 12 (3,6-35) ng/mL có sự khác biệt rõ rệt so với nhóm chứng là 14 (4,1-36) ng/mL. Tương tự như nghiên cứu của Nelen, các tác giả Puri M⁹⁴, Xiaoyuan Xia¹⁴⁵ và Liu C¹²² đều chỉ ra có sự khác biệt về nồng độ folat huyết thanh ở nhóm có tiền sử mất thai tái diễn so với nhóm phụ nữ khỏe mạnh. Sự khác biệt này có thể do folat là một vitamin mà cơ thể không tự tổng hợp được và phải phụ thuộc vào chế độ ăn, vì vậy nồng độ folat phụ thuộc vào khả năng hấp thu, chế độ dinh dưỡng của từng khu vực. Theo hướng dẫn quốc gia về dinh dưỡng cho phụ nữ có thai và bà mẹ cho con bú (Ban hành kèm theo Quyết định số 776/QĐ-BYT ngày 08 tháng 3 năm 2017 của Bộ trưởng Bộ Y tế) có đưa ra khuyến nghị bổ sung acid folic cho phụ nữ mang thai là 600 μ g/ngày và ở phụ nữ cho con bú là 500 μ g/ngày. Điều này được phổ biến và áp dụng sớm hơn ở các thành phố lớn. Vì vậy phụ nữ đã mang thai thường đã được bổ sung acid folic và điều này lý giải vì sao nồng độ folat trong nghiên cứu của chúng tôi không có sự khác

biệt giữa nhóm bệnh và nhóm chứng. Ngoài ra sự không tương quan của nồng độ Hcy và folat ở nhóm bệnh cũng nói lên rằng Hcy có thể là một yếu tố nguy cơ độc lập gây nên tình trạng sảy thai, thai chết lưu tái diễn chứ không phụ thuộc vào nồng độ folat huyết thanh.

Folat từ thức ăn vào cơ thể được hấp thu và chuyển hóa thành dạng 5-methyl THF là dạng folat lưu hành trong máu và có khả năng xuyên màng để vào trong tế bào. Trong tế bào 5-methyl THF cần được tách nhóm methyl để chuyển từ dạng monoglutamat thành polyglutamat THF giúp giữ các folat ở lại trong tế bào nhằm sử dụng cho việc tổng hợp DNA. Nếu không được chuyển thành dạng THF thì 5-methyl THF lại sẽ xuyên màng tế bào ra ngoài và do đó tế bào không sử dụng được folat.¹⁴⁶ Tại gan, folat có thể được dự trữ với số lượng lớn, đủ nhu cầu trong vòng bốn tháng đến một năm nên nồng độ folat huyết thanh khó thay đổi ở các trạng thái khác nhau của tế bào và cơ thể.¹⁴⁷ Nhiều tác giả trên thế giới cũng đã chứng minh việc bổ sung folat vào chế độ ăn có thể cải thiện việc tăng nồng độ Hcy. Tác giả Indrani Mukhopadhyay năm 2017¹⁴⁸ đã điều trị bằng folat cho những phụ nữ có nồng độ Hcy huyết thanh $> 12 \mu\text{mol/L}$ và đánh giá lại sau điều trị. Kết quả cho thấy nồng độ Hcy ở nhóm phụ nữ có tiền sử thai chết lưu tái diễn trước điều trị là $19,92 \pm 5,16 \mu\text{mol/L}$ khác biệt rõ rệt với sau điều trị là $13,7 \pm 4,27 \mu\text{mol/L}$. Tác giả đưa ra kết luận việc bổ sung folat cho phụ nữ mang thai có thể dự phòng được một số kết quả bất lợi cho thai kì.

Theo nghiên cứu của Lư Thị Thu Huyền¹⁴⁹ cho thấy nồng độ trung bình folat huyết thanh ở nhóm phụ nữ đang mang thai là: $8,82 \pm 4,83 \text{ (ng/mL)}$, thấp hơn đáng kể so với nhóm chứng của chúng tôi $11,53 \pm 3,21 \text{ ng/mL}$, điều này chứng tỏ ở phụ nữ mang thai, nhu cầu folat tăng cao để đáp ứng yêu cầu phát triển của thai nhi. Cũng theo nghiên cứu trên cho thấy tỷ lệ phụ nữ mang thai thiếu hụt nồng độ folat huyết thanh: $< 3 \text{ ng/mL}$ chiếm 8,3%, nguy cơ thiếu hụt

từ ≥ 3 – < 6 ng/mL chiếm 28,9%. Tỷ lệ phụ nữ mang thai thiếu máu là 39,4%. Giảm folat chiếm tỷ lệ cao ở nhóm thiếu máu (71,8%) so với nhóm không thiếu máu chiếm 14,7%. Giảm folat liên quan đến tình trạng kinh tế (giảm ở nhóm kinh tế kém chiếm 64,7%), số lần mang thai (ở nhóm mang thai ≥ 4 lần, tỷ lệ giảm folat 60,9%), liên quan đến số con (nhóm có ≥ 4 con, tỷ lệ giảm là 75%), quá trình bổ sung viên thuốc bổ chứa acid folic (nhóm không bổ sung hay bổ sung không thường xuyên có tỷ lệ giảm folat 84,2%). Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện tại Hà Nội, thành phố lớn nhất trong cả nước nên phụ nữ mang thai được sử dụng sớm các chế phẩm có folat cũng là logic. Folat là thuật ngữ chung cho một họ các hợp chất bao gồm acid folic và các dẫn xuất của nó bao gồm 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF), 5-formyltetrahydrofolate (5-FTHF hoặc acid folinic), 10-formyl-THF, 5,10-metylenTHF và THF không thay thế¹⁴⁶. Sự thiếu hụt folat có thể là một kết quả trực tiếp của chế độ ăn uống thiếu, hấp thu folat kém qua ruột hoặc tăng cường sử dụng như hoạt động thể chất hay trong thai kỳ. Việc bổ sung folat đã được chứng minh là mang lại hiệu quả khác nhau tùy thuộc vào chế phẩm sử dụng. Trong một thử nghiệm mù đôi ngẫu nhiên có đối chứng giả dược cho 144 phụ nữ có nồng độ Hcy cao, Lamers¹⁵⁰ đã chứng minh rằng bổ sung 5-MTHF có hiệu quả hơn acid folic trong việc giảm nồng độ homocystein máu. 5-MTHF có những ưu điểm quan trọng so với acid folic tổng hợp là nó được hấp thu tốt ngay cả khi pH đường tiêu hóa bị thay đổi và sinh khả dụng của nó không bị ảnh hưởng bởi các bất thường di truyền do thiếu hụt enzym MTHFR. Sử dụng 5-MTHF thay cho acid folic làm giảm khả năng che dấu các triệu chứng của sự thiếu hụt vitamin B₁₂, giảm tương tác với các thuốc ức chế dihydrofolate reductase. Sử dụng 5-MTHF cũng giảm được tình trạng acid folic có thể không được chuyển thành dạng hoạt động trong tuần hoàn ngoại vi do một số thuốc như methotrexate. Edouard J. Servy¹⁵¹ đã sử dụng 5-MTHF thay thế cho acid folic và chứng minh hiệu quả của 5-MTHF

khi sử dụng cho các cặp vợ chồng có tiền sử mất thai tái phát trong nhiều năm. Ba mươi cặp vợ chồng có mất thai nhiều lần kéo dài ít nhất 4 năm, với 2/3 trong số họ đã không thành công trong hỗ trợ sinh sản. Đối với tất cả các cặp vợ chồng, ít nhất một trong 2 người là người mang đa hình gen MTHFR. Hầu hết phụ nữ trong các cặp vợ chồng đều đã điều trị không thành công với liều cao acid folic (5 mg/ngày). Sau khi chuyển sang điều trị trong 4 tháng bằng 5-MTHF, với liều 600 microgam mỗi ngày trước khi cố gắng thụ thai hoặc bắt đầu một liệu pháp hỗ trợ sinh sản khác. Thời gian điều trị tương ứng với cả một chu kỳ sinh tinh là khoảng 74 ngày. Kết quả thu được một cặp không được theo dõi và hai cặp đang được điều trị. Không có tác dụng phụ nào được quan sát thấy. 13 cặp vợ chồng thụ thai tự nhiên, số còn lại cần điều trị hỗ trợ sinh sản để có thai. Nghiên cứu đã chỉ ra hiệu quả của việc sử dụng 5-MTHF có tác dụng hơn nhiều so với sử dụng acid folic ở đối tượng mất thai tái phát có đa hình gen MTHFR. Hơn nữa, nó tránh được các tác dụng phụ tiềm ẩn của hội chứng UMFA (un-metabolized folic acid), vốn bị nghi ngờ là gây ra rối loạn chức năng miễn dịch và các tác dụng phụ bệnh lý khác như ung thư (đặc biệt là đại trực tràng và tuyến tiền liệt). Như vậy bổ sung folat là cần thiết đối với phụ nữ trong độ tuổi sinh sản, việc bổ sung cần được tiến hành trước lúc mang thai và chế phẩm bổ sung nên lựa chọn 5-MTHF thay thế cho acid folic như trước đây.

Kết quả nghiên cứu chỉ ra có mối tương quan nghịch giữa nồng độ Hcy và nồng độ folat huyết thanh trong nhóm phụ nữ khỏe mạnh, tuy nhiên mối tương quan này không rõ ràng ở nhóm nghiên cứu trên đối tượng phụ nữ có tiền sử thai chết lưu tái diễn. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trên thế giới như Scazzone C năm 2014.¹³⁵ Tác giả KN Kim và cộng sự¹⁵² nghiên cứu tại Hàn Quốc đã chỉ ra có mối liên quan nghịch giữa nồng độ Hcy và folat huyết thanh ở tất cả các đa hình gen MTHFR vị trí 677 trên nhóm đối tượng mang thai bình thường. Các nghiên cứu về đối tượng thai chết lưu tái diễn trên thế

giới hầu như không đề cập đến mối tương quan này, tuy nhiên có một số nghiên cứu trên các đối tượng bất thường sinh sản khác như hội chứng buồng trứng đa nang,¹⁵³ với $r=-0,68$ ($p<0,001$) và bệnh mạch máu khác,¹⁵⁴ với $r=-0,236$ ($p=0,05$) chỉ ra có mối tương quan nghịch ở nhóm nghiên cứu. Giải thích cho sự khác biệt về mối tương quan giữa nồng độ Hcy và folat huyết thanh giữa nhóm phụ nữ khỏe mạnh bình thường và nhóm phụ nữ có tiền sử mất thai tái diễn chúng ta có thể dựa vào sơ đồ chuyển hóa của homocystein (sơ đồ 1.1). Hcy có 3 con đường chuyển hóa để tạo thành methionin, cystein hoặc đóng vòng để tạo thành homocystein-thiolacton. Do folat chỉ tham gia xúc tác cho một con đường tái methyl hóa để tạo thành methionin, vì vậy khi có tác động của môi trường như việc bổ sung các vitamin khác, chất xúc tác khác, nồng độ Hcy trong huyết thanh vẫn có thể được thay đổi không phụ thuộc vào nồng độ folat.

Xác định ngưỡng cắt (cut-off) cho nồng độ Hcy trong dự đoán nguy cơ thai chết lưu

Kết quả nghiên cứu cho thấy: nồng độ homocystein huyết thanh của nhóm bệnh là $11,7 \mu\text{mol/L}$, cao hơn nhóm chứng ($7,64 \mu\text{mol/L}$) với sự khác biệt giữa hai nhóm có ý nghĩa thống kê. Một câu hỏi được đặt ra là giá trị ngưỡng cắt (cut-off) của nồng độ Hcy huyết thanh là bao nhiêu để có giá trị tiên lượng nguy cơ thai chết lưu tái diễn. Biểu đồ 3.5 cho thấy tồn tại khu vực chồng lấp đáng kể giữa các giá trị trong nhóm bệnh và nhóm chứng. Như vậy sẽ không có một ngưỡng cắt hoàn hảo giúp phân tách được 100% các đối tượng của nhóm bệnh và nhóm chứng. Tuy nhiên biểu đồ 3.6 cũng cho thấy có sự khác biệt tương đối rõ của nồng độ Hcy huyết thanh giữa nhóm kết quả đại diện cho nhóm bệnh và nhóm kết quả đại diện cho nhóm chứng, từ đó cho thấy chúng ta vẫn có thể xây dựng được một ngưỡng cắt có giá trị trong dự báo nguy cơ có bệnh. Nhiều nghiên cứu chỉ ra giá trị ngưỡng cắt để dự đoán tình trạng mất thai sớm bằng

nồng độ Hcy dao động xung quanh ngưỡng 7,5 - 10 ($\mu\text{mol/L}$). Tuy nhiên để đánh giá chi tiết và khách quan hơn cho ngưỡng dự đoán bằng nồng độ Hcy huyết thanh chúng tôi dựa vào 4 chỉ số đánh giá sự cân bằng của mô hình là d-distance, BM, F1 score, BAC. Từ đó nhóm nghiên cứu đã xác định được giá trị cắt tối ưu để chẩn đoán tăng nồng độ Hcy trong dự đoán nguy cơ thai chết lưu là 8,67 ($\mu\text{mol/L}$) (biểu đồ 3.7). Với ngưỡng chẩn đoán tăng Hcy là 8,67 ($\mu\text{mol/L}$) độ nhạy đạt 66% và độ đặc hiệu đạt 77% và chỉ số F1 score là 70% và PPV đạt 75%. Nếu lấy tiêu chí F1 score tối đa làm tiêu chí chính thì giá trị của Hcy được lựa chọn là 8,11 ($\mu\text{mol/L}$), độ nhạy đạt được là 76% tăng hơn 10% so với ngưỡng 8,67 ($\mu\text{mol/L}$) nhưng độ đặc hiệu lại giảm xuống 12% chỉ đạt 65% và PPV chỉ đạt 69% (bảng 3.14). Từ kết quả này chúng ta có thể thấy rằng giá trị cắt tối ưu của nồng độ Hcy huyết thanh để dự đoán nguy cơ có tình trạng thai chết lưu là 8,67 ($\mu\text{mol/L}$). Ngưỡng cắt của nồng độ Hcy huyết thanh là 8,67 ($\mu\text{mol/L}$) có thể dự đoán nguy cơ thai chết lưu tái diễn với diện tích dưới đường cong ROC là 79,2% và khoảng tin cậy 95% của giá trị này dao động từ 73,7% đến 79,2% (biểu đồ 3.8), được đánh giá là tốt¹⁵⁵ để dự đoán nguy cơ có bệnh. Để xác định các giá trị ngoại lai, biểu đồ 3.9 cho thấy chỉ số Cook's Distance chủ yếu nằm trong khoảng nhỏ hơn 0,04. Hai đối tượng có ID là 163 và 225 được gợi ý là giá trị ngoại lai trong dữ liệu. Tuy nhiên, khi đánh giá chi tiết chỉ số này vẫn nằm trong mức giới hạn cho phép. Như vậy, có thể thấy mô hình chẩn đoán với nồng độ Hcy huyết thanh lớn hơn 8,67 ($\mu\text{mol/L}$) là phù hợp và có tính ổn định cao. Trong một nghiên cứu gồm 50 phụ nữ đã từng bị sảy thai ít nhất hai lần liên tiếp, Visternicean E và cộng sự, 2017¹⁴⁰ thấy rằng nồng độ Hcy huyết thanh $<10 \mu\text{mol/L}$ được thấy ở 16 bệnh nhân chiếm 32,0%, 9 bệnh nhân chiếm 18,0%, có nồng độ Hcy huyết thanh lúc đói từ 10 $\mu\text{mol/L}$ đến 12 $\mu\text{mol/L}$ và 25 bệnh nhân chiếm 50,0% có nồng độ Hcy huyết thanh cao đáng kể. Trong số đó, 23 bệnh nhân chiếm 46,0% có nồng độ giữa

12-30 $\mu\text{mol/L}$ và 2 bệnh nhân (4,0%) có nồng độ $>30 \mu\text{mol/L}$. Ngưỡng cắt được lựa chọn trong nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với của Bergen NE và cộng sự với ngưỡng cắt cao nhất là 8,5 $\mu\text{mol/L}$ ¹⁵⁶, Vollset SE¹²¹ nhưng thấp hơn trong nghiên cứu của Visternicean E, 2017.¹⁴⁰ Như vậy, ngưỡng cắt của nồng độ Hcy huyết thanh trong nghiên cứu này tương đồng một số nghiên cứu khác trên thế giới và khi đánh giá mô hình cho diện tích dưới đường cong đạt chất lượng tốt nên ngưỡng cắt này có thể đưa vào sử dụng trong thực hành lâm sàng.

Tính đa hình gen MTHFR ở phụ nữ có tiền sử thai chết lưu tái diễn

Gen methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) tham gia vào quá trình tổng hợp enzym *methylenetetrahydrofolate reductase* có tác dụng trong tái methyl hóa Hcy thành methionin. Sự đa hình gen MTHFR có thể dẫn đến sự giảm khả năng thoái hóa Hcy, làm nồng độ Hcy tăng vượt quá nồng độ gây độc cho tế bào và cơ thể. Nồng độ Hcy máu cao có thể gây ra tình trạng viêm, ngưng tập tiểu cầu trong các mạch máu và làm tăng nguy cơ hình thành cục máu đông gây bất thường sinh sản như sẩy thai hoặc thai chết lưu. Ở Châu Á, một số nghiên cứu trên quần thể người Trung Quốc cho thấy có sự liên quan giữa một số đa hình gen MTHFR ở đối tượng phụ nữ có bất thường sinh sản như các nghiên cứu Zhong Lin,⁹⁶ Xingmin Wang,¹⁵⁷ và Yi Yang năm 2016.¹⁵⁸ Nghiên cứu này là nghiên cứu bệnh chứng đầu tiên tại Việt Nam gồm 254 người, 126 phụ nữ khỏe mạnh làm nhóm chứng và 128 người nhóm phụ nữ có tiền sử thai chết lưu ít nhất 2 lần là nhóm bệnh. Kiểu gen MTHFR C677T và A1298C của nhóm nghiên cứu được xác định bằng kỹ thuật Realtime PCR. Các mẫu máu toàn phần của nhóm bệnh và nhóm chứng được tách chiết bằng kit thương mại của hãng Lytech (Nga). Ưu điểm của việc sử dụng tách chiết theo kit này đó là quy trình đơn giản, dễ thực hiện, thu được kết quả DNA khá đồng đều, có độ tinh sạch cao so với phương pháp tách chiết thủ công bằng

ethanol/chloroform.¹⁵⁸ Sản phẩm tách chiết thu được được đo nồng độ DNA bằng máy Nanodrop, tỷ lệ OD 280/260 đều đạt ở mức >1,8. Quy trình xét nghiệm đã được tối ưu theo package insert và được nghiệm thu lại bằng 10 mẫu chứng âm và 10 mẫu chứng dương đạt kết quả đúng 100%. Mỗi lần phân tích gen bằng phương pháp realtime đều có kèm theo các chứng âm và chứng dương cho từng kiểu đa hình. Các mẫu chứng đều cho tín hiệu rõ nét, chứng tỏ kết quả đạt độ tin cậy cao. Hai mươi mẫu đã được lựa chọn ngẫu nhiên bao gồm 10 mẫu nhóm bệnh và 10 mẫu nhóm chứng để đánh giá lại bằng phương pháp giải trình tự gen cho kết quả tương đồng. Phương pháp nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như các phương pháp của Xiaoyuan Xie¹⁴⁵ và Hwang.¹⁵⁹

Đa hình gen MTHFR phổ biến nhất là vị trí 677 C→T. Loại đa hình này rất phổ biến ở một số quần thể dân tộc và vùng địa lý. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi có tỷ lệ xuất hiện alen T chung là 22,62% (bảng 3.4) và tỷ lệ đa hình đồng hợp tử TT là 5,51% (bảng 3.5). Một kết quả phân tích tổng hợp trên 1000 đối tượng trên toàn cầu cho thấy tỷ lệ phổ biến toàn cầu của alen T và kiểu gen TT là 24,0% và 7,7% tương ứng. Trong phân tích gộp nhóm, tần số alen T thấp nhất được tìm thấy ở người Châu Phi khoảng 10,3% và cao nhất ở người Châu Âu 34,1%. Tần số alen T trong dân số Bắc Ấn Độ là 11%. Kết quả của phân tích tổng hợp cho thấy tần số của alen T và tỉ lệ kiểu gen TT vị trí C677T cao nhất trong quần thể người da trắng. Như vậy phân tích của chúng tôi có sự tương đồng với các nghiên cứu trên thế giới.¹⁶⁰ Ở những người đa hình dị hợp tử với gen MTHFR C677T, chức năng của enzym MTHFR bị giảm khoảng 65% so với ở người bình thường. Ở những người đa hình đồng hợp tử MTHFR C677T, chỉ còn 30% chức năng bình thường của enzym này.¹⁶⁰ Đa hình MTHFR vị trí 1298 biến đổi A thành C, được thấy ở 7% đến 12% dân số Bắc Mỹ, Châu Âu và Châu Úc và ít phổ biến hơn ở người gốc Tây Ban Nha (4% - 5%), người Trung Quốc (1% - 4%) và người châu Á (1% - 4%). Đa hình đồng

hợp tử MTHFR A1298C dẫn đến sự giảm 30-60% chức năng bình thường của enzym MTHFR. Một số người cũng có thể có đa hình kép gen MTHFR bao gồm đa hình 1 vị trí 677C→T và 1 vị trí 1298A→C. Đa hình dị hợp tử kép cũng có thể dẫn đến suy giảm chức năng của enzym MTHFR tương đương đồng hợp tử vị trí 677.¹⁶¹ Theo như nghiên cứu của chúng tôi, nếu kết hợp cả 2 đa hình tại 2 vị trí thì nguy cơ có thai chết lưu tăng lên OR=8,24. Một phân tích tổng hợp từ 66 nghiên cứu khác ở quần thể người Trung Quốc năm 2016 với tổng số 92277 người tham gia cho thấy: tỷ lệ xuất hiện của đa hình gen MTHFR C677T và A1298C khác nhau đáng kể giữa các nhóm dân tộc và dọc theo độ dốc địa lý. Các tần số của alen T và kiểu gen TT vị trí 677 của gen MTHFR tăng theo hướng Nam-Trung-Bắc qua đại lục Trung Quốc. Tỷ lệ của các kiểu gen 1298AC, 1298CC giảm theo chiều Nam - Trung - Bắc trên cả nước.¹⁵⁸ Như vậy, ở các vùng địa lý khác nhau sẽ có tỷ lệ lưu hành các alen đa hình khác nhau.

Đa hình gen MTHFR có thể dẫn đến các bệnh lý về bệnh tim mạch, huyết khối tĩnh mạch sâu, thuyên tắc phổi hoặc các biến chứng về thai nghén.¹⁶² Mặc dù sự giảm chức năng enzym MTHFR có thể dẫn đến sự tăng nồng độ Hcy huyết thanh, nhưng vẫn có thể nhiều người có nồng độ Hcy bình thường, đặc biệt là ở những người sử dụng acid folic. Bản thân các đa hình gen MTHFR, nếu không có nồng độ Hcy cao, không phải là một yếu tố nguy cơ đối với bệnh tim mạch, huyết khối tĩnh mạch sâu hoặc thuyên tắc phổi ở các quốc gia có thực phẩm được bổ sung acid folic. B. Simone và cộng sự¹⁶³ đã thực hiện một nghiên cứu đa quốc gia ở khu vực Châu Âu để đánh giá nguy cơ huyết khối tĩnh mạch liên quan đến tác dụng đơn lẻ và kết hợp của các yếu tố: V Leiden, Prothrombin 20210A và Methylenetetrahydrofolate reductase C677T. Nghiên cứu được thực hiện trên 11239 trường hợp có huyết khối tĩnh mạch và 21521 ca nhóm chứng cho kết quả: không tìm thấy mối liên quan đáng kể nào giữa

huyết khối tĩnh mạch với đa hình gen MTHFR vị trí 677 đồng hợp tử (OR: 1,38; 95% CI: 0,98–1,93). Trong khi đó, nguy cơ gia tăng ở những người có huyết khối tĩnh mạch mang đa hình dị hợp tử của 2 gen V Leiden hoặc Prothrombin 20210 tương ứng là OR = 4,22 và 2,79; ở thể dị hợp tử kép có tỷ suất chênh OR = 3,42 và ở thể đồng hợp tử của V Leiden và Prothrombin 20210 tỷ suất chênh ở hai gen tương ứng là OR = 11,45 và 6,74. Các phân tích phân tầng cho thấy tác động mạnh hơn của *V Leiden* đối với những người ≤ 45 tuổi. Tuy nhiên đây vẫn là nghiên cứu thực hiện trên quần thể người Châu Âu và Châu Mỹ. Như vậy các đa hình gen MTHFR phân bố khác nhau theo vùng địa lý, chủng tộc và ngay trong nhóm gen gây tình trạng thrombophilia cũng có sự phân bố khác nhau theo từng gen.¹⁶⁴

Nghiên cứu này cho thấy tỷ lệ đa hình của gen MTHFR C677T lần lượt là 56,25% và 26,98% ở nhóm bệnh và nhóm chứng với tỷ suất chênh OR = 3,48 (bảng 3.6). Kiểu gen đồng hợp tử TT có nguy cơ có tình trạng thai chết lưu cao gấp 6.41 lần (biểu đồ 3.1) nhóm người còn lại bao gồm không có đa hình hoặc có đa hình thể dị hợp tử, có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%. Không có sự khác biệt đáng kể ở kiểu gen MTHFR đồng hợp tử 677TT so với dị hợp tử 677CT, như vậy với đa hình tại vị trí 677 thì cả đồng hợp tử và dị hợp tử đều có ý nghĩa dự báo nguy cơ có tình trạng thai chết lưu như nhau. Tỷ lệ đa hình của gen MTHFR A1298C trong nhóm bệnh và nhóm chứng lần lượt là 55,47% và 32,54% với tỷ suất chênh OR = 2,32 (bảng 3.9). Tỷ suất chênh của kiểu gen MTHFR đồng hợp tử 1298CC so với dị hợp tử 1298AC và so với sự kết hợp của kiểu gen dị hợp 1298AC+1288AA lần lượt là OR=3,78 và 5,85, tương ứng (biểu đồ 3.2). Tỷ suất chênh của alen C > A với OR = 2,24. Tỷ lệ lưu hành alen C của gen MTHFR A1298C ở nhóm chứng là 18,65% và ở nhóm bệnh là 33,98% có khác biệt có ý nghĩa rõ rệt (bảng 3.7). Tỷ lệ lưu hành chung cả 2 nhóm của alen C là 26,38%, tương đồng với các nghiên cứu ở khu vực Châu

Á.^{157,161} Sự kết hợp của cả 2 đa hình gen MTHFR C677T và A1298C ở nhóm bệnh cao hơn rõ rệt so với nhóm chứng với tỷ suất chênh OR= 8,24 (bảng 3.10). Sự kết hợp các đa hình này ở nhóm thai chết lưu cao hơn 8,24 lần so với nhóm chứng, gợi ý về một nguy cơ thai chết lưu ở nhóm người mang tổ hợp đa hình gen, góp phần giúp bác sỹ có định hướng về phương pháp điều trị sớm cho các bà mẹ mang lại hiệu quả cho một thai kì khỏe mạnh.

Câu hỏi được đặt ra là vậy kết quả nghiên cứu về sự liên quan giữa các đa hình C677T và A1298C của gen MTHFR ở nhóm thai chết lưu tái diễn của các tác giả quốc tế khác như thế nào? Tỷ lệ đa hình gen MTHFR C677T trong nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu khác thực hiện trong quần thể người Châu Á như Sah AK (2018),¹⁶⁵ Xiaoyuan Xie (2017).¹⁴⁵ Xiaoyuan Xie đã nghiên cứu trên 197 người có tiền sử mất thai tái diễn nhiều lần và nhóm 116 phụ nữ bình thường đã từng sinh con khỏe mạnh. Phương pháp nghiên cứu là thu thập các tế bào biểu mô niêm mạc miệng để phân tích các đa hình gen MTHFR C677T và A1298C. Kết quả có sự khác biệt trong phân bố kiểu gen MTHFR C677T giữa nhóm có tiền sử mất thai tái phát và nhóm chứng có ý nghĩa thống kê. Kiểu gen MTHFR đồng hợp tử 677TT trong nhóm bệnh chiếm 35,0%, cao hơn 26,7% ở nhóm chứng trong khi kiểu gen dị hợp tử 677CT trong nhóm bệnh chiếm 37,5% thấp hơn 53,4% trong nhóm chứng. Không có sự khác biệt đáng kể giữa phân phối đa hình gen MTHFR A1298C trong nhóm bệnh và nhóm chứng. Sự phân bố kiểu gen A1298C giữa nhóm bệnh và nhóm chứng trong nghiên cứu của chúng tôi có sự khác biệt rõ rệt. Điều này không tương đồng với nghiên cứu của Xie X. Tuy nhiên tác giả cũng xác định hoạt độ enzym MTHFR, nồng độ Hcy và folat huyết thanh của hai nhóm nghiên cứu và thấy có sự khác biệt rõ rệt giữa nhóm bệnh và nhóm chứng. Vì vậy, tác giả đã đưa ra khuyến cáo cần có nghiên cứu kết hợp với nồng độ Hcy, folat huyết thanh và hoạt độ enzym MTHFR trong đánh giá nguy cơ thai chết lưu ở phụ nữ lứa tuổi

sinh sản để đánh giá sự tương tác của chúng trong dự báo nguy cơ thai chết lưu.

Tại Châu Âu, các tác giả cho rằng đa hình gen MTHFR vị trí 677 không có khả năng dự đoán nguy cơ mất thai tái phát.¹⁶⁶ Holmes ZR và cs đã nghiên cứu giá trị của đa hình C677T của gen MTHFR như một yếu tố nguy cơ di truyền ở những phụ nữ có tiền sử mất thai sớm (12 tuần tuổi) và hoặc muộn (>12 tuần tuổi) mất thai liên tiếp (≥ 3 lần). Kết quả nghiên cứu chỉ ra 57/173 (32,9%) bệnh nhân là dị hợp tử với đa hình MTHFR 677CT và 14/173 (8,1%) là đồng hợp tử 677TT với đa hình MTHFR, tỷ lệ lưu hành alen T là 25% ở nhóm phụ nữ có tiền sử mất thai tái diễn. Tỷ lệ xuất hiện của đa hình gen MTHFR ở những phụ nữ này không khác biệt rõ rệt so với ở nhóm chúng của những phụ nữ có thai bình thường, trong đó 44,8% là đa hình dị hợp tử và 9,0% đa hình đồng hợp tử (tỷ lệ lưu hành alen T là 31%). Tỷ suất chênh của kiểu gen MTHFR đồng hợp tử 677TT so với 677CT và 677CC là OR= 0,90, khoảng tin cậy 95%, (0,30-2,4). Không có sự liên quan giữa tình trạng mất thai 3 tháng giữa thai kỳ và kiểu gen MTHFR. Họ đã kết luận rằng đa hình MTHFR C677T không phải là yếu tố dự báo nguy cơ ở những phụ nữ có tiền sử sảy thai liên tiếp cả sớm và muộn. Tại Mỹ, Wiwanitkit V và cộng sự¹⁶⁷ nghiên cứu trong một phân tích tổng hợp trên các báo cáo trước đây về đa hình trên gen MTHFR C677T và sự tương quan của nó với mất thai tái diễn (repeated pregnancy loss: RPL). Tám nghiên cứu bệnh chứng trên 752 bệnh nhân và 625 đối chứng được đánh giá. Theo nghiên cứu này, 53,1% đối tượng có alen T bị mất thai tái diễn trong khi 55,3% đối tượng không có alen T bị mất thai tái diễn. Từ ước tính nguy cơ tổng thể, các đối tượng có alen T có nguy cơ mất thai tái diễn thấp hơn 0,96 lần. Theo phân tích này, mô hình đa hình MTHFR C677T có thể không đại diện cho một dấu hiệu hữu ích về nguy cơ gia tăng đối với mất thai tái diễn. Trên cơ sở đa hình gen MTHFR làm giảm hoạt tính của enzym, đối với đa hình gen MTHFR 677CT và TT giảm từ 65-

70% hoạt tính enzym ảnh hưởng đến quá trình tái methyl hóa của Hcy,¹⁶⁰ đa hình gen MTHFR A1298C làm giảm 30-60% hoạt tính enzym,¹⁶¹ tuy nhiên việc chuyển hóa của Hcy có nhiều con đường khác nhau phụ thuộc nồng độ folat, vitamin B₁₂, nồng độ chất điều hòa SAM, vitamin B₆, riboflavin và betaine... Kiểu hình của con người được xác định bởi bộ gen của cá nhân, nhưng bị ảnh hưởng nhiều bởi các yếu tố tương tác như dinh dưỡng, hành vi, tiếp xúc với vi sinh vật và điều kiện môi trường lý hóa.¹⁶⁸ Sự biến đổi kiểu hình trong sinh bệnh học hoặc trong phản ứng với các hợp chất hóa học ngoại sinh một phần là do sự biến đổi giữa các cá nhân trong cấu trúc gen hoặc biểu hiện gen. Enzym MTHFR không phải là mục tiêu chính của điều trị bằng thuốc. Tuy nhiên việc tương tác của các đa hình gen MTHFR với các thuốc khác nhau như: acid folic, acid folinic, methyltetrahydrofolate là khác nhau.¹⁴⁶ Tại Mỹ và một số nước Châu Âu, từ năm 1998, chính phủ đã yêu cầu bổ sung folat vào các loại bột ngũ cốc giàu chất dinh dưỡng. Mức tiêu thụ trên có thể dung nạp cho người lớn được đạt ở mức 1000 µg/ngày folat từ thực phẩm tăng cường hoặc dưới dạng thực phẩm bổ sung, không bao gồm folat từ thực phẩm tự nhiên.¹⁶⁹ Từ những lý do trên có thể lý giải vì sao ở Mỹ và một số nước Châu Âu có tỷ lệ đa hình gen MTHFR cao nhưng không phải là yếu tố nguy cơ cho các bất thường sinh sản như thai chết lưu.

Tại Thổ Nhĩ Kỳ, một đất nước nằm ở cả hai châu lục Châu Âu và Châu Á nhưng phần lớn nằm tại Tây Á, tác giả Turgal M¹⁷⁰ khi nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của đa hình MTHFR trên đối tượng mang thai ở 617 phụ nữ được điều tra về đa hình C677T và A1298C trước khi mang thai và chia thành 3 nhóm: (1) nhóm 1 là các đa hình đồng hợp tử, (2) nhóm 2 là các đa hình dị hợp tử và (3) nhóm 3 là kiểu gen hoang dại đã thấy rằng tỷ lệ mất thai sớm tăng lên khi độ phức tạp của đa hình MTHFR tăng lên và tỷ lệ mất thai sớm cao hơn rõ rệt ở bệnh nhân đa hình MTHFR C677T so với bệnh nhân đa hình MTHFR

A1298C. Có sự khác biệt rõ rệt về giữa các lần mang thai trước của các đối tượng trong 3 nhóm nghiên cứu (theo đa hình gen MTHFR) về tỷ lệ mất thai sớm sau khi sử dụng heparin trọng lượng phân tử thấp. Họ đi đến kết luận rằng đa hình MTHFR là các yếu tố nguy cơ tiềm ẩn đối với các kết cục bất lợi cho thai kỳ. Một nghiên cứu ở Ấn Độ năm 2012 của tác giả Nair R về đa hình gen MTHFR vị trí 677 cho thấy tần số alen T của các trường hợp mất thai sớm tái diễn so với nhóm chứng có OR = 2,20. Tỷ suất chênh của kiểu gen dị hợp tử C677T là 1,96. Tỷ suất chênh cho kiểu gen đồng hợp tử 677TT là 6,30. Tỷ suất chênh kết hợp của CT và TT so với nhóm chứng là 2,22. Nghiên cứu chỉ ra rõ ràng rằng đồng hợp tử và dị hợp tử đối với đa hình MTHFR C677T làm tăng nguy cơ mất thai sớm tái diễn lên gấp 6,30 và 1,96 lần.¹⁷¹ Yi Yang và cộng sự năm 2016 tại Trung Quốc¹⁵⁸ đã phân tích 57 bài báo trên một số lượng rất lớn đối tượng và thấy rằng nhóm các bà mẹ có tiền sử thai chết lưu tái diễn có tỷ suất chênh tổng hợp của đa hình đồng hợp tử gen MTHFR 677TT OR = 2,285 và đa hình gen MTHFR đồng hợp tử 1298CC OR = 1,594. Nghiên cứu của Yang đã chứng minh đa hình gen MTHFR C677T và A1298C của mẹ có liên quan đến tình trạng mất thai tái diễn. Tác giả Tzvetozar R¹⁷² và cộng sự tại Nhật Bản năm 2019 đã nghiên cứu trên 243 đối tượng có thai chết lưu được chia thành 2 nhóm là nhóm có huyết khối giai đoạn huyết tương (intervillous fibrin and thrombosis - IT) và nhóm có huyết khối giai đoạn tiêu sợi huyết (decidual fibrin and thrombosis - DT). Kết quả nghiên cứu chỉ ra có mối liên quan giữa các đa hình gen MTHFR vị trí 677 với các đối tượng có mất thai có huyết khối giai đoạn huyết tương với tỷ suất chênh của kiểu gen đồng hợp tử 677TT so với các kiểu gen 677CT và 677CC là OR= 1,653 và 2,246 tương ứng. Tỷ suất chênh của đa hình 677TT so với 677CT và 677CC ở nhóm có huyết khối giai đoạn tiêu sợi huyết là OR = 2,602 và 3,375 tương ứng. Tác giả cũng đưa ra kết luận đa hình đồng hợp tử 677TT của gen MTHFR có liên quan đến các giai đoạn của bệnh

cảnh huyết khối ở những bà mẹ có thai chết lưu. Nhìn chung các nghiên cứu về đa hình gen MTHFR đang tập trung chủ yếu vào đa hình gen MTHFR vị trí 677, đa hình vị trí 1298 ít được nghiên cứu hơn vì ít có liên quan đến tình trạng bất thường trong thai sản. Các nghiên cứu cũng chỉ ra đa hình gen MTHFR chỉ có giá trị đánh giá nguy cơ ở khu vực Châu Á, các nghiên cứu ở Mỹ và khu vực Châu Âu chỉ ra không có mối liên quan giữa các đa hình gen MTHFR với các bất thường sinh sản như thai chết lưu. Nghiên cứu của chúng tôi bổ sung vào dữ liệu hiện có trong tài liệu về tính đa hình MTHFR và mất thai tái diễn ở dân số Châu Á. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đóng vai trò quan trọng trong việc sàng lọc gen MTHFR ở bệnh nhân có tiền sử mất thai tái diễn vì tình trạng thrombophilia đã được coi là một yếu tố góp phần quan trọng trong quá trình bệnh sinh.

4.2. Sự liên quan giữa nồng độ folat, homocystein huyết thanh và đa hình gen MTHFR ở bệnh nhân có tiền sử thai chết lưu tái diễn

Khi so sánh nồng độ Hcy huyết thanh theo các đa hình gen MTHFR vị trí 677 và 1298 thì chúng tôi nhận thấy không có sự khác biệt nồng độ Hcy huyết thanh ở các kiểu gen được so sánh ở nhóm chứng và nhóm bệnh vị trí 1298. Tuy nhiên có sự khác biệt về nồng độ Hcy ở nhóm bệnh ở các đa hình khác nhau vị trí 677 (bảng 3.11). Điều này nói lên việc nồng độ Hcy có thể phụ thuộc vào các đa hình gen MTHFR vị trí 677. Kiểu gen MTHFR 677TT có nồng độ Hcy huyết thanh cao hơn rõ rệt so với kiểu gen 677CT và 677CC. Tương tự khi so sánh nồng độ folat huyết thanh theo các kiểu gen cả 2 vị trí C677T và A1298C chúng tôi nhận thấy không có sự khác biệt giữa nồng độ folat theo các kiểu gen của MTHFR (bảng 3.12). Như vậy có thể nghĩ đến nồng độ folat và đa hình gen MTHFR là những yếu tố độc lập trong mô hình tiên lượng nguy cơ có tình trạng thai chết lưu tái diễn.

Trong nghiên cứu này, các biến số như nồng độ homocystein, nồng độ

folat huyết thanh, đa hình gen MTHFR vị trí 677 và vị trí 1298 đã được phân tích đơn độc, cặp đôi hoặc trong các mô hình hồi quy đa biến để xác định ngưỡng cắt của nồng độ homocystein đã thể hiện độ mạnh khác nhau trong vai trò dự báo nguy cơ có tình trạng thai chết lưu tái diễn. Từ các kết quả hữu ích trên, chúng tôi tiếp tục sử dụng các biến này để xây dựng mô hình dự báo nguy cơ thai chết lưu. Mô hình tiên lượng thai chết lưu tái diễn là mô hình hồi quy logistic đa biến và phương pháp suy luận Bayes để xác định mô hình tối ưu dựa trên chỉ số BIC và xác suất hậu định của mô hình (bảng 3.18). Suy luận Bayes sử dụng một ước lượng bằng số về mức độ tin tưởng vào một giả thuyết trước khi quan sát được bằng chứng, và tính toán một ước lượng bằng số về mức độ tin tưởng vào giả thuyết đó sau khi đã quan sát được bằng chứng. Trong quá trình quy nạp, suy luận Bayes thường dựa vào các mức độ tin tưởng, hay là các xác suất chủ quan, và không nhất thiết khẳng định về việc cung cấp một phương pháp quy nạp khách quan. Tuy nhiên, một số nhà thống kê theo trường phái Bayes tin rằng các xác suất có thể có một giá trị khách quan, và do đó suy luận Bayes có thể cung cấp một phương pháp quy nạp khách quan chứ không dựa vào chủ quan của người phân tích. Khi chọn từ một số mô hình, mô hình có BIC thấp nhất được ưu tiên. Có nghĩa là, sự thay đổi không giải thích được trong biến phụ thuộc và số lượng biến giải thích làm tăng giá trị của BIC. Do đó, BIC thấp hơn có nghĩa là ít biến giải thích hơn, phù hợp hơn. Kết quả cho thấy chỉ có nồng độ folat huyết thanh là không chỉ ra có sự khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm chứng. Vì vậy mô hình tối ưu được xác định là mô hình bao gồm 3 biến số: nồng độ homocystein huyết thanh, các đa hình MTHFR C677T và A1298C, do nó có xác suất tiên lượng thai chết lưu tái diễn cao nhất là 77% (nghĩa là nếu tái lập nghiên cứu tương tự khả năng thu được mô hình gồm 3 biến này đạt mức độ 77%). Mô hình 1 với ba biến được sử dụng xây dựng mô hình là nồng độ Hcy, đa hình A1298C và C677T của gen MTHFR cho kết quả

phân loại tốt khi đạt diện tích dưới đường cong AUC là 86,24% (biểu đồ 3.10). Đánh giá trên chỉ số AUC cho thấy dữ liệu thu được khá phù hợp với mô hình đã nêu ở trên. Để thẩm định lại chất lượng mô hình nghiên cứu chúng tôi sử dụng các chỉ số Cook's Distance để loại bỏ giá trị ngoại lai, nếu các giá trị đều nằm trong khoảng 2SD thì được chấp nhận. Và để đánh giá lại các thông số bất thường chúng tôi sử dụng chỉ số hat-values và studentized Residuals. Kết quả cho thấy biểu đồ biểu diễn chỉ số Cook's Distance có các giá trị chủ yếu nằm trong khoảng nhỏ hơn 0,05 (biểu đồ 3.11). Các đối tượng có ID là 126, 163, 214, 215 và 225 được gợi ý là giá trị ngoại lai trong dữ liệu. Tuy nhiên khi đánh giá chi tiết chỉ số này vẫn nằm trong nồng độ giới hạn cho phép. Sự tương quan giữa hat-values và studentized Residuals là chỉ số quan trọng trong đánh giá chất lượng của mô hình. Biểu đồ 3.12 cho thấy chất lượng mô hình khá tốt¹⁵⁵ do đa số các giá trị của hat-values đều nằm trong khoảng -2 đến 2 của studentized Residuals.

Bảng đánh giá mô hình tiên lượng qua tỷ suất chênh OR (bảng 3.19) cho thấy: đối tượng có cùng kiểu gen A1298C và C677T với nồng độ Hcy huyết thanh lớn hơn 1 $\mu\text{mol/L}$ thì có khả năng thai chết lưu tái diễn cao hơn 1,64 lần với khoảng tin cậy 95% là từ 1,41 đến 1,96 lần, sự liên quan này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Nếu đối tượng có kết quả xét nghiệm Hcy tăng và có cùng kiểu gen A1298C thì bệnh nhân có đa hình dị hợp tử vị trí 677 dạng CT sẽ có khả năng thai chết lưu tái diễn cao gấp 6 lần so với đối tượng không có đa hình và khoảng tin cậy 95% của OR từ 3,00 đến 12,93. Mọi liên quan này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Tương tự, nếu đối tượng có đa hình dạng đồng hợp 677TT thì khả năng thai chết lưu tái diễn tăng lên 14,6 lần so với đối tượng không có đa hình với khoảng tin cậy 95% dao động từ 2,85 đến 114,77, sự liên quan này có ý nghĩa thống kê với $p = 0,003$. Nếu đối tượng có kết quả

xét nghiệm Hcy tăng và có cùng kiểu gen C677T thì nhóm có đa hình dị hợp dạng 1298AC sẽ có khả năng thai chết lưu tái diễn cao gấp 2,7 lần so với nhóm đối tượng không có đa hình gen và khoảng tin cậy 95% OR từ 1,34 đến 5,78, sự liên quan này có ý nghĩa thống kê với $p = 0,007$. Tương tự, nếu đối tượng có đa hình dạng đồng hợp 1298CC thì khả năng thai chết lưu tái diễn tăng lên 12,4 lần so với đối tượng không có đa hình gen với khoảng tin cậy 95% dao động từ 3,17 đến 64,22, mối liên quan này có ý nghĩa thống kê với $p = 0,001$. Với mô hình tiên lượng (biểu đồ 3.13), chúng tôi thấy rằng nếu đối tượng có đa hình A1298C dạng dị hợp AC (quy đổi điểm tương ứng là 3 điểm) và đa hình dị hợp C677T dạng CT (quy đổi điểm tương ứng là 7 điểm) và có nồng độ Hcy là 10,0 ($\mu\text{mol/L}$) (quy đổi điểm tương ứng là 20 điểm). Như vậy, điểm tổng của bệnh nhân này là 30 sẽ có nguy cơ thai chết lưu tái diễn lớn hơn 80%.

Mối liên quan giữa nồng độ homocystein, folat huyết thanh và đa hình gen MTHFR đã được nhiều tác giả nghiên cứu. Trên đối tượng khỏe mạnh bình thường, Juan Ni và cs⁹³ phân tích đa hình gen MTHFR C677T xác định kiểu gen ở 330 tình nguyện viên (164 nam và 166 nữ) thấy rằng sự tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê được thấy giữa nồng độ Hcy và folat huyết thanh ($r = -0,252$). Nam giới có nồng độ Hcy huyết thanh cao hơn rõ rệt so với nữ giới. Những người có kiểu gen MTHFR 677TT có nồng độ Hcy trong huyết thanh cao hơn rõ rệt so với những người thể có kiểu gen 677CC và 677CT. Nồng độ folat huyết thanh giảm ở những người có kiểu gen 677TT so với những người có kiểu gen 677CC nhưng không có ý nghĩa thống kê. Ngoài ra, ở nhóm thiếu vitamin, nồng độ Hcy huyết thanh có tương quan rõ rệt với nồng độ folat ($r = -0,334$). Sự đa hình MTHFR C677T, sự thiếu hụt folat có liên quan rõ rệt đến nồng độ Hcy huyết thanh cao. Sự thiếu hụt folat có đóng góp lớn nhất vào nồng độ Hcy huyết thanh, tiếp theo là đa hình gen MTHFR C677T. Do đó, việc bổ sung acid folic có thể giúp ngăn ngừa các bệnh liên quan đến sự tích

tu Hcy, đặc biệt là ở những người có kiểu gen MTHFR 677TT.

Ở đối tượng có tiền sử mất thai tái diễn, Boas WV⁹⁵ khi nghiên cứu về sự chuyển hóa của folat và đa hình gen MTHFR ở phụ nữ Brazil có tiền sử mất thai nhiều lần đã thấy rằng tỷ lệ đa hình gen ở 89 phụ nữ có tiền sử mất thai liên tiếp vô căn và 150 người làm đối chứng là 19,1% và 19,6% tương ứng đối với gen MTHFR C677T, 20,8% và 26% đối với gen MTHFR A1298C. Không có sự khác biệt rõ rệt giữa nhóm bệnh và nhóm chứng trong các đa hình gen được điều tra. Nồng độ Hcy, vitamin B12 và folat trong huyết thanh không khác nhau giữa các đa hình được nghiên cứu trong nhóm bệnh và nhóm chứng. Tuy nhiên, phân tích hồi quy tuyến tính cho thấy sự phụ thuộc của nồng độ folat huyết thanh vào việc duy trì nồng độ Hcy. Như vậy, tồn tại mối tương quan nghịch giữa nồng độ homocystein và folat huyết thanh là không thể phủ nhận trong đối tượng chưa bị tác động bởi các liệu pháp bổ sung bằng thực phẩm hoặc thuốc. Puri M⁹⁴ cho rằng: sự phân bố kiểu gen MTHFR giữa nhóm bệnh và nhóm chứng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, tính đa hình MTHFR C677T được phát hiện có liên quan rõ rệt với việc tăng nồng độ Hcy trong nhóm đối tượng có tiền sử mất thai. Sự tăng nồng độ Hcy huyết thanh và thiếu hụt vitamin B₁₂ được phát hiện là những yếu tố nguy cơ rõ rệt đối với mất thai tái diễn (RPL) (OR = 7,02 và 16,39, tương ứng). Nồng độ folat ở nhóm chứng là 2.36 (0.19 – 20.99) ng/mL có sự khác biệt rõ rệt ở nhóm nghiên cứu là 10.80 (1.31 – 84.50) ng/mL. Họ đi đến kết luận rằng vitamin B thấp làm tăng nồng độ Hcy máu, đặc biệt là ở các bà mẹ mang alen T. Nghiên cứu nhấn mạnh tầm quan trọng của vitamin trong việc ngăn ngừa mất thai liên tiếp ở phụ nữ Bắc Ấn Độ. Nadir Y và cs¹⁷³ khi đánh giá sự liên quan của nồng độ Hcy, acid folic và đa hình gen MTHFR C677T ở những bệnh nhân có biến cố huyết khối hoặc mất thai liên tiếp ở 326 bệnh nhân đã thấy rằng sự tương quan giữa nồng độ Hcy và acid folic được tìm thấy là yếu $r = -0,209$. Không có sự khác biệt rõ

riết nào đợc thể hiện giữa nồng độ Hcy huyết thanh và kiểu gen CC, CT và TT của gen MTHFR vị trí 677. Kết quả đợc đưa ra khẳng định việc nồng độ Hcy, folat và đa hình gen MTHFR là các yếu tố nguy cơ độc lập ở bệnh nhân có bất thường thai sản. Như vậy, đối với các biến nghiên cứu đơn lẻ có thể không đủ độ mạnh để tạo nên mô hình tiên lượng nhưng khi kết hợp các biến nghiên cứu với nhau từ nồng độ Hcy, các vitamin nhóm B bao gồm: folat, vitamin B₆, vitamin B₁₂ đến các đa hình gen MTHFR tại các vị trí đa hình có thể tạo nên một mô hình tiên lượng yếu tố nguy cơ có chất lượng tốt.

Từ các kết quả nghiên cứu thu đợc, nên chăng thiết lập một mô hình sàng lọc dự phòng cho phụ nữ để phòng tránh nguy cơ thai chết lưu? Tại Việt Nam chưa có hướng dẫn cụ thể nào cho việc dự phòng này. Theo hướng dẫn Quốc gia về các dịch vụ chăm sóc sức khỏe năm 2016 có hướng dẫn về việc bổ sung sắt và acid folic cho phụ nữ bao gồm mỗi viên 60 mg sắt và 0,25 mg acid folic. Hướng dẫn cụ thể về các phương pháp sàng lọc để giảm tỷ lệ thai chết lưu ở phụ nữ trong độ tuổi sinh đẻ ở nhiều nước trên thế giới cũng đã rất chi tiết đặc biệt ở các nước phát triển như Mỹ, châu Âu... Sàng lọc và theo dõi trong thai kỳ là các chiến lược đợc các nhà cung cấp dịch vụ chăm sóc sức khỏe sử dụng để xác định các trường hợp mang thai có nguy cơ cao giúp họ có thể đưa ra phương pháp điều trị, chăm sóc, theo dõi có mục tiêu và thích hợp hơn. Việc sử dụng nhiều chiến lược này còn gây tranh cãi và khả năng phát hiện tổn thương thai nhi của chúng còn hạn chế. Về mặt lý thuyết, quản lý thích hợp các yếu tố nguy cơ của bà mẹ, của thai nhi và các biến chứng đợc phát hiện trong thai kỳ hay trong quá trình chuyển dạ có thể ngăn ngừa một tỷ lệ lớn trong số 3,2 triệu ca thai chết lưu ước tính hàng năm trên thế giới.¹⁷⁴ Tại một số nước châu Á, các hướng dẫn sàng lọc dự phòng nguy cơ thai chết lưu bao gồm: quản lý huyết áp ở người mẹ; quản lý một số bệnh truyền nhiễm ở mẹ như: giang mai, sốt rét, giun sán; sàng lọc bệnh di truyền bằng xét nghiệm

nhiễm sắc thể đồ; các nguyên nhân huyết khối chỉ khuyến cáo sàng lọc hội chứng antiphospholipid mà không khuyến cáo sàng lọc bệnh huyết khối di truyền; các nguyên nhân miễn dịch chỉ xem xét các xét nghiệm ANA trong sàng lọc bệnh hệ thống, sàng lọc hệ kháng nguyên HLA, Cytokin và tế bào NK còn chưa đủ bằng chứng để khuyến cáo; nguyên nhân nội tiết chỉ khuyến cáo sàng lọc TSH trong bệnh tuyến giáp, xem xét sàng lọc nồng độ homocystein nhưng không thường quy, các nguyên nhân như prolactin cao và hội chứng buồng trứng đa nang không được khuyến cáo rõ ràng.¹⁷⁵ Tại Mỹ, các xét nghiệm được khuyến cáo sàng lọc để ngăn ngừa thai chết lưu bao gồm nhóm máu Rh, các xét nghiệm trong hội chứng Antiphospholipid, tuy nhiên các xét nghiệm huyết khối trong bệnh di truyền vẫn không được khuyến khích.¹⁷⁶ Như vậy, việc sàng lọc tình trạng thai chết lưu dựa vào nồng độ homocystein huyết thanh và các yếu tố di truyền vẫn chưa được khuyến cáo tại tất cả các Quốc gia. Kết quả nghiên cứu cũng mới chỉ ra có yếu tố liên quan và có thể là yếu tố dự báo nguy cơ một tình trạng thai chết lưu trong tương lai.

Trong thực hành lâm sàng, tại Việt Nam chưa có nghiên cứu về nồng độ homocystein, folat huyết thanh và các đa hình gen MTHFR trên đối tượng phụ nữ có tiền sử thai chết lưu tái diễn. Cơ chế huyết khối trên phụ nữ có tình trạng thai chết lưu đã được giải thích một phần với việc dương tính với các kháng thể kháng phospholipid, khoảng 50% các trường hợp vẫn đang tìm nguyên nhân từ các cơ chế di truyền hay bệnh học khác. Vì vậy việc tìm nguyên nhân chính xác và sử dụng các loại chế phẩm phù hợp sẽ có ý nghĩa rất lớn cho các phụ nữ có nguy cơ có tình trạng thai chết lưu. Để khắc phục tình trạng thai chết lưu, Nelen WL¹⁴⁴ đã sử dụng 0,5 mg acid folic hàng ngày để xác định ảnh hưởng của việc bổ sung acid folic với sự thay đổi nồng độ Hcy và folat huyết thanh. Nghiên cứu đã thực hiện trên 49 phụ nữ có tiền sử mất thai tái diễn không rõ nguyên nhân. Các đối tượng nghiên cứu được bổ sung acid folic trong 2 tháng. Sau đó,

những ảnh hưởng này được phân tích sau khi phân tầng đối với tính đa hình của MTHFR C677T. Việc bổ sung acid folic trong 2 tháng làm giảm nồng độ Hcy trong huyết thanh lúc đối trung bình 27%. Nồng độ folat trong huyết thanh và hồng cầu trung bình tăng lần lượt là 27,5% và 70%. Tất cả các kiểu gen MTHFR 677TT đồng hợp tử, 677CT dị hợp tử, và gen kiểu dại 677CC đều có phản ứng khác với việc bổ sung. Sau 2 tháng, nhóm phụ nữ có kiểu gen đa hình đồng hợp tử cho thấy nồng độ Hcy lúc đối trung bình giảm nhiều nhất (-41%), nhưng nồng độ folat trong huyết thanh lại tăng (+26%). Kết luận của tác giả là sau 2 tháng bổ sung 0,5 mg acid folic hàng ngày ở những phụ nữ có tiền sử mất thai liên tiếp không rõ nguyên nhân làm giảm rõ rệt nồng độ Hcy huyết thanh. Hiệu ứng này rõ ràng nhất ở những phụ nữ có nồng độ Hcy huyết thanh cao nhất lúc ban đầu và ở những phụ nữ đồng hợp tử đa hình 677TT của gen MTHFR. Do đó, việc làm giảm nồng độ Hcy huyết thanh có thể làm giảm nguy cơ mắc các biến cố sản khoa.

Vấn đề đặt ra là bổ sung loại chế phẩm nào của folat: acid folic, acid folinic hay 5-MTHF, có cần bổ sung kết hợp với các loại vitamin khác không, bổ sung vào thời điểm nào của thai kỳ? Ngoài ra sự không khác biệt về nồng độ folat giúp chúng ta cần cân nhắc giải quyết các cơ chế gây huyết khối khác như điều trị chống đông, điều trị chống stress oxy hóa. Folat trong chế độ ăn tồn tại ở dạng polyglutamate, sau đó phải được chuyển đổi thành dạng monoglutamate bởi các enzym liên hợp để được hấp thu qua lòng ruột. Vì các enzym này hoạt động tối ưu ở pH 6-7, sự thay đổi độ pH trong ruột có thể làm các enzym liên hợp bị phân hủy, do đó dẫn đến giảm hấp thu folat. Ngoài ra, acid folinic sau khi được hấp thu vào trong tuần hoàn chuyển thành dạng 5,10 methylen THF, dạng này muốn trở thành dạng hoạt động 5MTHF cần phải qua quá trình xúc tác của enzym MTHFR. Các đối tượng có đa hình gen MTHFR tổng hợp nên enzym MTHFR này sẽ giảm hoạt động từ 30-70% tùy từng vị trí đa hình. Vì

vậy đối với người không có tình trạng như: thay đổi pH đường tiêu hóa, không sử dụng các thuốc ức chế dihydrofolate reductase hay không có đa hình gen MTHFR thì việc sử dụng acid folic vẫn hiệu quả cho việc giảm nồng độ homocystein, tuy nhiên các đối tượng có thai chết lưu lại có tỷ lệ cao với các đa hình gen MTHFR, vì vậy cần phải lựa chọn chế phẩm folat phù hợp cho từng đối tượng. Về thời điểm bổ sung, Mao Yan ¹⁷⁷ đã bổ sung acid folic cho các đối tượng chuẩn bị mang thai trước đó 3 tháng, 1-2 tháng và sau khi thụ thai. Tác giả nhận thấy việc bổ sung acid folic làm giảm nguy cơ mất thai với OR=0,52, ngoài ra nhóm phụ nữ được bổ sung acid folic trước mang thai 3 tháng có tỷ lệ mất thai giảm hơn 10% so với nhóm bổ sung trước mang thai 1-2 tháng và sau khi thụ thai. Như vậy thời điểm bổ sung acid folic tốt nhất là trước mang thai 3 tháng. Do homocystein có các con đường chuyển hóa khác nhau, để 5-MTHF có tác dụng tốt trong con đường tái methyl hóa cần có tác dụng hiệp đồng của vitamin B₁₂. Việc chuyển hóa Hcy thành cystein cần có xúc tác của vitamin B₆. Vì vậy để đánh giá hiệu quả của việc giảm nồng độ Hcy trong ngăn ngừa mất thai tái phát, Balogun ¹⁷⁸ đã nghiên cứu việc bổ sung kết hợp các loại vitamin và so sánh với việc sử dụng đơn độc folat hoặc folat cùng với sắt. Kết quả nghiên cứu trên 79851 phụ nữ cho thấy có bằng chứng về việc giảm nguy cơ thai chết lưu ở nhóm phụ nữ dùng vitamin tổng hợp cùng với sắt và acid folic so với nhóm chỉ dùng sắt và acid folic OR= 0,92. Như vậy, việc bổ sung folat cho phụ nữ để dự phòng nguy cơ thai chết lưu là chưa đủ, cần bổ sung thêm các vitamin nhóm B để có đủ các vitamin làm các chất xúc tác trong chu trình chuyển hóa của Hcy hoặc tham gia vào các phản ứng khác trong quá trình hình thành và phát triển của thai nhi.

Khi nồng độ homocystein tăng làm kích hoạt con đường đông máu gây nên dòng thác đông máu trong cơ thể, vì vậy ngoài việc dùng chế phẩm folat, chúng ta cần phải dự phòng bằng các thuốc chống đông khác khi nồng độ folat

đạt đến ngưỡng bình thường nhưng tình trạng huyết khối vẫn có thể còn tồn tại. Orkun Cetin ¹⁷⁹ đã nghiên cứu trên hồ sơ của 249 phụ nữ có tiền sử thai chết lưu tái diễn trong đó có 121 phụ nữ từ 18–45 tuổi có đa hình gen MTHFR được lựa chọn vào nghiên cứu. Tính đa hình bao gồm gen MTHFR C677T và A1298C đồng hợp tử hoặc dị hợp tử. Những phụ nữ được chọn đã được xác định bình thường về mặt giải phẫu, nội tiết tố, nhiễm sắc thể, và âm tính với các kháng thể kháng phospholipid. Trong số đó, 68 bệnh nhân đã được điều trị chỉ với acid folic và sắt. 53 bệnh nhân còn lại được điều trị bằng acid folic, sắt và liều dự phòng heparin trọng lượng phân tử thấp. Kết quả cho thấy tỷ lệ sinh sống ở những bệnh nhân được điều trị bằng thuốc chống đông máu cao hơn ở những bệnh nhân không được điều trị bằng thuốc chống đông máu (69,8% so với 48,5%, $p= 0,015$) và tỷ lệ dị tật bẩm sinh thấp hơn ở nhóm điều trị chống đông máu (3,8% so với 17,6%, tương ứng, $p= 0,022$). Các kết quả sản khoa khác được tìm thấy là tương tự nhau giữa hai nhóm. Nghiên cứu đã chứng minh rằng heparin trọng lượng phân tử thấp cải thiện tỷ lệ sinh sống ở những đối tượng có tiền sử thai chết lưu có đa hình gen MTHFR. Từ đó chúng ta cũng cần cân nhắc việc kết hợp điều trị chống đông dự phòng cho những bà mẹ đã có tiền sử thai chết lưu tái diễn.

Nồng độ Hcy tăng cao có liên quan đến nồng độ folat thấp, nồng độ Hcy huyết thanh cao có thể gây ra các biến chứng thai kỳ kể cả khi nồng độ folat không thấp cho thấy việc tác dụng trực tiếp của Hcy lên sự phát triển của thai nhi.¹⁸⁰ Các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng nồng độ Hcy và folat có thay đổi theo giới tính, lứa tuổi, hoặc do ảnh hưởng của kiểu gen MTHFR. Nồng độ Hcy tăng cao trong máu được xem là nguyên nhân gây xơ vữa, hẹp lòng động mạch, gây tắc mạch, huyết khối, tăng hình thành cục máu đông. Việc tăng nguy cơ hình thành huyết khối xảy ra ở vi mạch tiếp nối giữa nhau thai và thành tử cung sẽ gây tình trạng thai chết lưu tái diễn. Nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ

ra sự liên quan rõ rệt giữa tăng nồng độ Hcy huyết thanh của người mẹ có liên quan đến đa hình gen MTHFR ở những người có tình trạng thai chết lưu tái diễn. Kết quả này có ý nghĩa trong việc xác định yếu tố nguy cơ, chọn hướng điều trị cho những đối tượng có tình trạng thai chết lưu thông qua việc đo thường quy nồng độ Hcy huyết thanh của người mẹ trong thời kì đầu mang thai. Qua phân tích các nghiên cứu cũng cho thấy vai trò quan trọng của việc bổ sung vitamin trước và trong khi mang thai vì hai con đường chuyển hóa của Hcy đều cần folat và các vitamin nhóm B khác. Do đó, việc bổ sung folat dự phòng trở nên bắt buộc ở những phụ nữ trong độ tuổi sinh sản.

Qua đánh giá mô hình nghiên cứu, chúng tôi cũng khẳng định được kết quả nghiên cứu mang lại lợi ích trong việc dự báo nguy cơ có khả năng có tình trạng thai chết lưu cho đối tượng phụ nữ ở độ tuổi sinh sản. Với 3 biến xây dựng mô hình là nồng độ Hcy, đa hình gen vị trí 677 và 1298 của gen MTHFR thì mô hình nghiên cứu của chúng tôi cho kết quả tốt khi diện tích dưới đường cong AUC đạt 86,24%. Kết quả này tương đương Pratip Chakraborty (2013) là 77,8%.¹⁸¹

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu thu được trên 254 đối tượng bao gồm 128 đối tượng có tiền sử thai chết lưu tái diễn và 126 đối tượng đã sinh con khỏe mạnh làm đối chứng, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Nồng độ folat, homocystein huyết thanh và tính đa hình gen MTHFR ở phụ nữ thai chết lưu tái diễn

Nồng độ homocystein huyết thanh tăng là yếu tố dự báo nguy cơ thai chết lưu, nồng độ folat huyết thanh không có giá trị dự báo nguy cơ thai chết lưu đối với phụ nữ ở độ tuổi sinh sản.

Ngưỡng cắt tối ưu của nồng độ homocystein huyết thanh để dự đoán nguy cơ thai chết lưu tái diễn là 8,67 ($\mu\text{mol/L}$). Cứ tăng 1 $\mu\text{mol/L}$ thì khả năng thai chết lưu tăng lên 1,64 lần với khoảng tin cậy 95% là từ 1,41 đến 1,96.

Đa hình gen MTHFR làm tăng nguy cơ thai chết lưu ở cả vị trí 677 và 1298 với là OR= 3,48 và 2,32 tương ứng, khi kết hợp 2 đa hình cả 2 vị trí thì nguy cơ bị bệnh tăng lên với OR =8,24.

Kiểu gen MTHFR 677TT và 677CT có giá trị dự báo nguy cơ thai chết lưu tăng gấp 9,86 và 3,08 lần tương ứng so với gen kiểu dại 677CC.

Kiểu gen MTHFR 1298CC và 1298AC có giá trị dự báo nguy cơ thai chết lưu tăng gấp 7,86 và 2,08 lần tương ứng so với kiểu gen 1298AA. Kiểu gen 1298CC có giá trị dự báo nguy cơ thai chết lưu tăng hơn kiểu gen 1298AC là 3,78 lần.

2. Mối liên quan giữa nồng độ folat, homocystein huyết thanh và đa hình gen MTHFR trong dự báo nguy cơ thai lưu

Nồng độ homocystein huyết thanh và đa hình gen MTHFR đều có giá trị dự đoán nguy cơ thai chết lưu tái diễn trong đó nồng độ homocystein có liên quan đến các đa hình gen MTHFR vị trí 677, kiểu gen MTHFR 677TT có nồng

độ homocystein cao hơn có ý nghĩa thống kê so với kiểu gen MTHFR 677CT và 677CC. Không có sự khác biệt nồng độ homocystein huyết thanh theo đa hình gen MTHFR vị trí 1298.

Không có mối liên quan giữa nồng độ folat huyết thanh với các đa hình gen MTHFR cả vị trí 677 và 1298.

Kết quả có cùng kiểu gen A1298C và C677T kết hợp với nồng độ Hcy huyết thanh tăng: cứ tăng lên 1 $\mu\text{mol/L}$ thì có khả năng thai chết lưu tái diễn cao hơn 1,64 lần với khoảng tin cậy 95% là từ 1,41 đến 1,96 lần.

Kết quả có cùng nồng độ homocystein cao kết hợp có cùng kiểu gen MTHFR A1298C thì khi có đa hình dị hợp tử gen MTHFR 677CT và đa hình đồng hợp tử 677TT sẽ có khả năng thai chết lưu tái diễn cao gấp 6 lần và 14,6 lần tương ứng so với đối tượng không có đa hình gen MTHFR 677CC.

Kết quả có cùng nồng độ homocystein cao kết hợp có cùng kiểu gen MTHFR C677T thì nhóm có đa hình dị hợp tử gen MTHFR 1298AC và đa hình đồng hợp tử 1298 CC sẽ có khả năng thai chết lưu tái diễn cao gấp 2,7 và 12,4 lần tương ứng so không có đa hình gen MTHFR 1298AA.

Mô hình tiên lượng nguy cơ thai chết lưu tái diễn dựa trên các yếu tố nồng độ homocystein huyết thanh và các đa hình gen MTHFR vị trí 677 và 1298 có kết quả tiên lượng tốt với chỉ số AUC =86,24%.

KHUYẾN NGHỊ

Nên sử dụng nồng độ homocystein huyết thanh và đa hình gen MTHFR để dự đoán nguy cơ thai chết lưu tái diễn ở phụ nữ trong độ tuổi sinh sản.

HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

Cần nghiên cứu thêm ảnh hưởng của nồng độ homocysteine thiolactone lên mạch máu và tác động đến tình trạng sảy thai, thai chết lưu.

Cần có nghiên cứu meta để tổng hợp các nghiên cứu khác nhau với cỡ mẫu lớn hơn, tại nhiều khu vực tại Việt Nam và Châu Á để đưa ra kết luận về sự phân bố đa hình gen theo các khu vực địa lý khác nhau.

CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Trịnh Thị Quế, Đoàn Thị Kim Phượng, Tạ Thành Văn, Dương Thị Thu Hiền, Hoàng Thị Ngọc Lan, Phạm Bá Nha, (2019). Phân tích đa hình C677T và A1298C của gen MTHFR ở phụ nữ có tiền sử sảy thai, thai chết lưu. *Tạp chí Sản phụ khoa*. Tập 16, số 3, tr. 42-45.
2. Trịnh Thị Quế, Tạ Thành Văn, Phạm Thiện Ngọc, Đoàn Thị Kim Phượng (2019). Nghiên cứu khoảng tham chiếu của Homocysteine, Folate và đánh giá sự tương quan của hai chỉ số trên ở phụ nữ độ tuổi sinh sản. *Tạp chí Y học Việt Nam*. Tập 482, tr. 60-64.
3. Trịnh Thị Quế, Đoàn Thị Kim Phượng, Phạm Thiện Ngọc, Tạ Thành Văn, (2020). Nghiên cứu nồng độ Homocysteine và Folate huyết thanh ở phụ nữ có sảy thai, thai chết lưu tái phát. *Tạp chí nghiên cứu y học*, tập 1 tháng 3, tr. 112-118

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y Tế. Hướng dẫn quốc gia về các dịch vụ chăm sóc sức khỏe sinh sản (ban hành kèm theo quyết định số 4128/QĐ-BYT ngày 29/7/2016 của bộ trưởng bộ y tế). *Bộ Y Tế*. 2016:81-146.
2. Christianson A, CP H, B M. *Global Report on Birth Defects*. March of Dimes.2006:14-18.
3. Trinh Văn Bảo, Phan Thị Hoan, Trần Đức Phấn. Bất thường bẩm sinh. *Di truyền Y học*. Hà Nội: Nhà xuất bản Giáo dục; 2008:134-227.
4. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic acids research*. 2016;44(D1):D733-745.
5. Twig G, Shina A, Amital H, Shoenfeld Y. Pathogenesis of infertility and recurrent pregnancy loss in thyroid autoimmunity. *Journal of autoimmunity*. 2012;38(2-3):J275-281.
6. Van den Boogaard E, Vissenberg R, Land JA, et al. Significance of (sub)clinical thyroid dysfunction and thyroid autoimmunity before conception and in early pregnancy: a systematic review. *Human reproduction update*. 2011;17(5):605-619.
7. Cocksedge KA, Saravelos SH, Metwally M, Li TC. How common is polycystic ovary syndrome in recurrent miscarriage? *Reproductive biomedicine online*. 2009;19(4):572-576.
8. Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC medicine*. 2013;11:154.
9. Robertson L, Wu O, Langhorne P, et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *British journal of haematology*. 2006;132(2):171-196.
10. Abdelsalam T, Karkour T, Elbordiny M, Shalaby D, Abouzeid ZS. Thrombophilia gene mutations in relation to recurrent miscarriage. *J International Journal of Reproduction*. 2018;7(3).

11. Chango A, Boisson F, Barbé F, et al. The effect of 677C-->T and 1298A->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *The British journal of nutrition*. 2000;83(6):593-596.
12. Martínez-Frías ML. The biochemical structure and function of methylenetetrahydrofolate reductase provide the rationale to interpret the epidemiological results on the risk for infants with Down syndrome. *American journal of medical genetics Part A*. 2008;146a(11):1477-1482.
13. Spellicy CJ, Northrup H, Fletcher JM, et al. Folate metabolism gene 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with ADHD in myelomeningocele patients. *PloS one*. 2012;7(12):e51330.
14. Sharma Priyanka, Senthilkumar R, Brahmachari Vani, et al. Mining literature for a comprehensive pathway analysis: A case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids in health and disease*. 2006;5:1.
15. Christine M. Pfeiffer, John D. Osterloh, Jocelyn Kennedy-Steph enson, et al. Trends in Circulating Concentrations of Total Homocysteine among US Adolescents and Adults: Findings from the 1991–1994 and 1999 – 2004 National Health and Nutrition Examination Surveys. *Clinical Chemistry* 2008;54:5.
16. Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nature structural biology*. 1999;6(4):359-365.
17. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *The Journal of nutrition*. 2000;130(2):129-132.
18. Institute of Medicine. *Adverse Reproductive Outcomes in Families of Atomic Veterans: The Feasibility of Epidemiologic Studies*. Washington (DC): National Academies Press (US); 1995:42-60.

19. F. Zegers-Hochschild, G. D. Adamson, J. de Mouzon, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and Sterility*. 2009; 92:1520-1524.
20. Bộ Y Tế. Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị các bệnh sản phụ khoa. Hà Nội. 2015:7-65.
21. WHO. International Statistical Classification of Diseases and Related Health problem (ICD-10). Vol Tenth Revision. Geneva: World Health Organization; 2011:116-121.
22. Nguyễn Văn Tuấn. Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị các bệnh sản phụ khoa (Ban hành kèm theo Quyết định số 315/QĐ-BYT ngày 29/01/ 2015). *Bộ Y Tế*. 2015:20-24.
23. World Health Organization. Making every baby count: audit and review of stillbirths and neonatal deaths. *World Health Organization*. 2016 (WHO Library Cataloguing-in-Publication Data):18-21.
24. Nguyễn Đức Hình. Thai chết lưu. *Bài giảng sản phụ khoa*. Nhà xuất bản Y học Hà Nội; 2013:154-161.
25. Zhang X, Joseph KS, Cnattingius S, Kramer MS. Birth weight differences between preterm stillbirths and live births: analysis of population-based studies from the U.S. and Sweden. *BMC pregnancy and childbirth*. 2012;12:119.
26. Barfield WD. Standard terminology for fetal, infant, and perinatal deaths. *Pediatrics*. 2011;128(1):177-181.
27. Robertson L, Wu O, Langhorne P, et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *British journal of haematology*. 2006;132(2):171-196.
28. Gordon A, Lahra M, Raynes-Greenow C, Jeffery H. Histological chorioamnionitis is increased at extremes of gestation in stillbirth: a population-based study. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. 2011; 2011:1-8.

29. Simonet F, Wassimi S, Heaman M, et al. Individual- and Community-Level Disparities in Birth Outcomes and Infant Mortality among First Nations, Inuit and Other Populations in Quebec. *The open women's health journal*. 2010;4:18-24.
30. Fucic A, Merlo DF, Ceppi M, Lucas JN. Spontaneous abortions in female populations occupationally exposed to ionizing radiation. *International archives of occupational and environmental health*. 2008; 81(7):873-879.
31. Williams PM, Fletcher S. Health effects of prenatal radiation exposure. *American family physician*. 2010;82(5):488-493.
32. Pflugbeil S. *Health Effects of Chernobyl 25 years after the reactor catastrophe*. 2011:28-31.
33. Williams PM, Fletcher S. Health effects of prenatal radiation exposure. *American family physician*. 2010;82(5):488-493.
34. Lawson CC, Rocheleau CM, Whelan EA, et al. Occupational exposures among nurses and risk of spontaneous abortion. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2012;206(4):327.e321-328.
35. Mattison DR. Environmental exposures and development. *Current opinion in pediatrics*. 2010;22(2):208-218.
36. Ngo AD, Taylor R, Roberts CL, Nguyen TV. Association between Agent Orange and birth defects: systematic review and meta-analysis. *International journal of epidemiology*. 2006; 35(5):1220-1230.
37. Sanborn M, Ontario College of Family P. 2012 systematic review of pesticide health effects. 2012:23-33.
38. Hackshaw A, Rodeck C, Boniface S. Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls. *Human reproduction update*. 2011; 17(5):589-604.
39. Moridi M, Ziaei S, Kazemnejad A. Exposure to ambient air pollutants and

- spontaneous abortion. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2014;40(3):743-748.
40. Hwang BF, Jaakkola JJ, Guo HR. Water disinfection by-products and the risk of specific birth defects: a population-based cross-sectional study in Taiwan. *Environmental health: a global access science source*. 2008;7:23.
 41. Gilboa SM, Desrosiers TA, Lawson C, et al. Association between maternal occupational exposure to organic solvents and congenital heart defects, National Birth Defects Prevention Study, 1997-2002. *Occupational and environmental medicine*. 2012;69(9):628-635.
 42. Morales-Suárez-Varela MM, Toft GV, Jensen MS, et al. Parental occupational exposure to endocrine disrupting chemicals and male genital malformations: a study in the Danish National Birth Cohort study. *Environmental health: a global access science source*. 2011; 10(1):3.
 43. Vigeh M, Yokoyama K, Kitamura F, Afshinrokh M, Beygi A, Niroomanesh S. Early pregnancy blood lead and spontaneous abortion. *Women & health*. 2010;50(8):756-766.
 44. Duong A, Steinmaus C, McHale CM, Vaughan CP, Zhang L. Reproductive and developmental toxicity of formaldehyde: a systematic review. *Mutation research*. 2011;728(3):118-138.
 45. Ness RB, Grisso JA, Hirschinger N, et al. Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *The New England journal of medicine*. 1999; 340(5):333-339.
 46. Bailey BA, Sokol RJ. Prenatal alcohol exposure and miscarriage, stillbirth, preterm delivery, and sudden infant death syndrome. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. 2011;34(1):86-91.
 47. Greenwood DC, Alwan N, Boylan S, et al. Caffeine intake during pregnancy, late miscarriage and stillbirth. *European journal of epidemiology*. 2010;25(4):275-280.

48. Ito T, Ando H, Suzuki T, et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science (New York, NY)*. 2010; 327(5971): 1345-1350.
49. Crider KS, Cleves MA, Reefhuis J, Berry RJ, Hobbs CA, Hu DJ. Antibacterial medication use during pregnancy and risk of birth defects: National Birth Defects Prevention Study. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 2009;163(11):978-985.
50. Weber-Schoendorfer C, Chambers C, Wacker E, et al. Pregnancy outcome after methotrexate treatment for rheumatic disease prior to or during early pregnancy: a prospective multicenter cohort study. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014;66(5):1101-1110.
51. Bader E, Alhaj AM, Hussan AA, Adam I. Malaria and stillbirth in Omdurman Maternity Hospital, Sudan. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2010;109(2):144-146.
52. Visnovsky J, Bodova KB, Cabanova B, Kudela. Early Fetal Loss and Chlamydia Trachomatis Infection. *Gynecol Obstet* 2013;3:181.
53. Weintraub AY, Sheiner E. Early Pregnancy Loss. In: *Bleeding During Pregnancy*. Springer; 2011:25-26.
54. Felisbino-Mendes MS, Matozinhos FP, Miranda JJ, Villamor E, Velasquez-Melendez G. Maternal obesity and fetal deaths: results from the Brazilian cross-sectional Demographic Health Survey, 2006. *BMC pregnancy and childbirth*. 2014;14:5.
55. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009; 68(6):1030-1035.
56. Calleja-Agius J, Jauniaux E, Pizzey AR, Muttukrishna S. Investigation of systemic inflammatory response in first trimester pregnancy failure. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2012;27(2):349-357.

57. King K, Smith S, Chapman M, Sacks G. Detailed analysis of peripheral blood natural killer (NK) cells in women with recurrent miscarriage. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2010;25(1):52-58.
58. Quenby S, Nik H, Innes B, et al. Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2009;24(1):45-54.
59. Asaad Mohammed Ahmed Abd Allah Babker, Salaheldein Gumaa Elzaki, Sarah Elsiddig Dafallah. The role of thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *World Journal of Pharmaceutical Research* 2015; 4(10): 191-201.
60. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Thomas CM, Eskes TK. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstetrics and gynecology*. 2000;95(4):519-524.
61. Gouaille CB. *Focus on Homocysteine*. 2000:20-31.
62. Sobczyńska-Malefora A, Harrington DJ. Laboratory assessment of folate (vitamin B(9)) status. *Journal of clinical pathology*. 2018; 71(11):949-956.
63. Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *Journal of inherited metabolic disease*. 2011; 34(1):75-81.
64. Handy DE, Zhang Y, Loscalzo J. Homocysteine down-regulates cellular glutathione peroxidase (GPx1) by decreasing translation. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(16):15518-15525.
65. Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, Emoto N, Yokoyama M. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation*. 2001;104(10):1165-1170.
66. Undas A, Williams EB, Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(6):4389-4397.
67. Thambyrajah J, Townend JN. Homocysteine and atherothrombosis--

- mechanisms for injury. *European heart journal*. 2000;21(12):967-974.
68. Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thrombosis research*. 1980;18(1-2):113-121.
 69. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(1):5-7.
 70. Codoñer-Franch P, Alonso-Iglesias E. Homocysteine as a Biomarker in Vascular Disease. In: Patel VB, Preedy VR, eds. *Biomarkers in Cardiovascular Disease*. Dordrecht: Springer Science Business Media Dordrecht; 2016:3-26.
 71. Institute of Medicine Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference I, its Panel on Folate OBV, Choline. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In: *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B(6), Folate, Vitamin B(12), Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington (DC): National Academies Press (US) National Academy of Sciences.; 1998:200-207.
 72. Visentin M, Diop-Bove N, Zhao R, Goldman ID. The intestinal absorption of folates. *Annual review of physiology*. 2014;76:251-274.
 73. Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med*. 2009;11:e4-e4.
 74. Desmoulin SK, Hou Z, Gangjee A, Matherly LH. The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer. *Cancer biology & therapy*. 2012;13(14):1355-1373.
 75. Warzyszynska J, Kim Y-I. Folate in Human Health and Disease. 2014.

76. Bailey LB, Gregory JF, 3rd. Folate metabolism and requirements. *The Journal of nutrition*. 1999;129(4):779-782.
77. Goyette P, Pai A, Milos R, et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 1998; 9(8):652-656.
78. Reynolds E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *The Lancet Neurology*. 2006; 5(11):949-960.
79. Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene*. 2000;257(2):279-289.
80. Saffroy R, Lemoine A, Debuire B. MTHFR (5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2005; 9:310-312.
81. Spellicy CJ, Northrup H, Fletcher JM, et al. Folate metabolism gene 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with ADHD in myelomeningocele patients. *PloS one*. 2012;7(12):e51330.
82. Desai M, Chauhan JB. Computational analysis for the determination of deleterious nsSNPs in human MTHFR gene. *Computational biology and chemistry*. 2018; 74:20-30.
83. Mudd SH, Uhlendorf BW, Freeman JM, Finkelstein JD, Shih VE. Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity. *Biochemical and biophysical research communications*. 1972; 46(2): 905-912.
84. Hickey SE, Curry CJ, Toriello HV. ACMG Practice Guideline: lack of evidence for MTHFR polymorphism testing. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2013; 15(2):153-156.

85. Leclerc D, Sibani S, Rozen R. Molecular Biology of Methylene tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Overview of Mutations/Polymorphisms. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Landes Bioscience 2000-2013:1-5.
86. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylene tetrahydrofolate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(26): 14853-14858.
87. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Molecular genetics and metabolism*. 1998; 64(3):169-172.
88. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends in pharmacological sciences*. 2001; 22(4):195-201.
89. Arpino C, Compagnone E, Cacciatore D, Coniglio A, Castorina M, Curatolo P. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and cerebral stroke in two twin gestations. *Child's nervous system: ChNS: official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2011; 27(4):665-669.
90. Christensen B, Arbour L, Tran P, et al. Genetic polymorphisms in methylene tetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *American journal of medical genetics*. 1999;84(2):151-157.
91. Bhargava S. *The Clinical Application of Homocysteine*. 2018:5-12.
92. Yang QH, Botto LD, Gallagher M, et al. Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third

- National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(1):232-246.
93. Ni J, Zhang L, Zhou T, et al. Association between the MTHFR C677T polymorphism, blood folate and vitamin B12 deficiency, and elevated serum total homocysteine in healthy individuals in Yunnan Province, China. *Journal of the Chinese Medical Association: JCMA*. 2017; 80(3): 147-153.
 94. Puri M, Kaur L, Walia GK, et al. MTHFR C677T polymorphism, folate, vitamin B12 and homocysteine in recurrent pregnancy losses: a case control study among North Indian women. *Journal of perinatal medicine*. 2013;41(5):549-554.
 95. Boas WV, Gonçalves RO, Costa OL, Goncalves MS. Metabolism and gene polymorphisms of the folate pathway in Brazilian women with history of recurrent abortion. *Revista brasileira de ginecologia e obstetricia: revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia*. 2015; 37(2):71-76.
 96. Lin Z, Li Q, Sun Y, et al. Interactions between genetic variants involved in the folate metabolic pathway and serum lipid, homocysteine levels on the risk of recurrent spontaneous abortion. *Lipids in health and disease*. 2019;18(1):143.
 97. Kedar R, Chandel D. MTHFR gene polymorphism and associated nutritional deficiency in the etiology and pathogenesis of Down syndrome. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2019; 20(1):12.
 98. Hekmatdoost A, Vahid F, Yari Z, et al. Methyltetrahydrofolate vs Folic Acid Supplementation in Idiopathic Recurrent Miscarriage with Respect to Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms: A Randomized Controlled Trial. *PloS one*. 2015; 10(12):1-12.

99. Kiseljaković E, Jadrić R, Hasić S, Skenderi F, Resić H, Winterhalter-Jadrić M. Polymorphism in methylenetetra-hydrofolate reductase gene: important role in diseases. *Bosn J Basic Med Sci.* 2008;8(2):165-169.
100. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *Jama.* 1995; 274(13):1049-1057.
101. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature genetics.* 1995;10(1):111-113.
102. Bjelland I, Tell GS, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM. Folate, vitamin B12, homocysteine, and the MTHFR 677C->T polymorphism in anxiety and depression: the Hordaland Homocysteine Study. *Archives of general psychiatry.* 2003; 60(6):618-626.
103. Emam Sultan I, Abbas H, Abdulkader El-Reweny A, Ahmed Khalafala O, El-Abd D, Mosaad N. Effect of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Mutation on Plasma Homocysteine Level and its Prevalence in Arterial Diseases. *Journal of Taibah University Medical Sciences.* 2006;1(1, Supplement C):20-29.
104. Oterino A, Toriello M, Valle N, et al. The relationship between homocysteine and genes of folate-related enzymes in migraine patients. *Headache.* 2010; 50(1):99-168.
105. Clarke R, Lewington S, Landray M. Homocysteine, renal function, and risk of cardiovascular disease. *Kidney international Supplement.* 2003 (84): S131-133.
106. Moczulski D, Fojcik H, Zukowska-Szczechowska E, Szydłowska I, Grzeszczak W. Effects of the C677T and A1298C polymorphisms of the

- MTHFR gene on the genetic predisposition for diabetic nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2003;18(8):1535-1540.
107. Charan J, Biswas T. How to calculate sample size for different study designs in medical research? *Indian journal of psychological medicine*. 2013;35(2):121-126.
 108. Chen H, Yang X, Lu M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss in China: a systematic review and meta-analysis. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2016; 293(2):283-290.
 109. Nasiri M, Arsanjani Shirazi A, Sadeghi O, Bagheri Bidakhavidi M. The Relationship between Homocysteine Levels and Spontaneous Abortion in Iranian Women with Migraine. *Iranian journal of public health*. 2017; 46(8):1149-1151.
 110. Gaiday AN, Tussupkaliyev AB, Bermagambetova SK, et al. Effect of homocysteine on pregnancy: A systematic review. *Chemico-biological interactions*. 2018;293:70-76.
 111. Yi-Deng J, Tao S, Hui-Ping Z, et al. Folate and ApoE DNA methylation induced by homocysteine in human monocytes. *DNA and cell biology*. 2007; 26(10):737-744.
 112. Derraik JG, Lundgren M, Cutfield WS, Ahlsson F. Maternal Height and Preterm Birth: A Study on 192,432 Swedish Women. *PloS one*. 2016; 11(4):1-7.
 113. Masho SW, Bishop DL, Munn M. Pre-pregnancy BMI and weight gain: where is the tipping point for preterm birth? *BMC pregnancy and childbirth*. 2013;13:120.
 114. WHO. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics In: WHO; 2018.
 115. Steegers-Theunissen RP, Steegers EA. Nutrient-gene interactions in early

- pregnancy: a vascular hypothesis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2003;106(2):115-117.
116. Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertility and sterility*. 1993;60(5):820-825.
117. Ananth CV, Elsasser DA, Kinzler WL, et al. Polymorphisms in methionine synthase reductase and betaine-homocysteine S-methyltransferase genes: risk of placental abruption. *Molecular genetics and metabolism*. 2007; 91(1):104-110.
118. Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, et al. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1995;173(4):1042-1048.
119. Burke G, Robinson K, Refsum H, Stuart B, Drumm J, Graham I. Intrauterine growth retardation, perinatal death, and maternal homocysteine levels. *The New England journal of medicine*. 1992; 326(1): 69-70.
120. Kirke PN, Mills JL, Scott JM. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 1997;13(11-12):994-995.
121. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. *The American journal of clinical nutrition*. 2000; 71(4):962-968.
122. Liu C, Luo D, Wang Q, et al. Serum homocysteine and folate concentrations in early pregnancy and subsequent events of adverse pregnancy outcome: the Sichuan Homocysteine study. *BMC pregnancy and childbirth*. 2020; 20(1):176.
123. Lykke JA, Bare LA, Olsen J, et al. Thrombophilias and adverse pregnancy

- outcomes: results from the Danish National Birth Cohort. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012;10(7):1320-1325.
124. Nurk E, Tell GS, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Associations between maternal methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and adverse outcomes of pregnancy: the Hordaland Homocysteine Study. *The American journal of medicine*. 2004;117(1):26-31.
125. Tiwari D, Bose PD, Das S, Das CR, Datta R, Bose S. MTHFR (C677T) polymorphism and PR (PROGINS) mutation as genetic factors for preterm delivery, fetal death and low birth weight: A Northeast Indian population based study. *Meta gene*. 2015;3:31-42.
126. Perez AB, D'Almeida V, Vergani N, de Oliveira AC, de Lima FT, Brunoni D. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida. *American journal of medical genetics Part A*. 2003;119a(1):20-25.
127. Sazci A, Ergul E, Kaya G, Kara I. Genotype and allele frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkey. *Cell biochemistry and function*. 2005;23(1):51-54.
128. Rady PL, Szucs S, Grady J, et al. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *American journal of medical genetics*. 2002;107(2):162-168.
129. Kim YJ, Lee JE, Kim SH, Shim SS, Cha DH. Maternal age-specific rates of fetal chromosomal abnormalities in Korean pregnant women of advanced maternal age. *Obstetrics & gynecology science*. 2013; 56(3): 160-166.
130. Xu R, Huang F, Wang Y, Liu Q, Lv Y, Zhang Q. Gender- and age-related

- differences in homocysteine concentration: a cross-sectional study of the general population of China. *Scientific Reports*. 2020; 10(1): 17401.
131. Strassburg A, Krems C, Lührmann PM, Hartmann B, Neuhäuser-Berthold M. Effect of age on plasma homocysteine concentrations in young and elderly subjects considering serum vitamin concentrations and different lifestyle factors. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*. 2004; 74(2):129-136.
132. Trịnh Thị Quế, Tạ Thành Văn, Phạm Thiện Ngọc, Đoàn Thị Kim Phượng. Nghiên cứu khoảng tham chiếu của Homocysteine, Folate và đánh giá sự tương quan của hai chỉ số trên phụ nữ ở độ tuổi sinh sản. *Y học Việt Nam*. 2019; 482:60-64.
133. Dương Thị Tuyết, Nguyễn Thị Kim Thủy. Nghiên cứu nồng độ Homocysteine huyết thanh ở bệnh nhân đái tháo đường Typ II. *Y học Thực hành*. 2011; 7:2-4.
134. Osunkalu V, Onajole A, Odeyemi K, et al. Homocysteine and folate levels as indicators of cerebrovascular accident. *Journal of blood medicine*. 2010;1:131-134.
135. Scazzone C, Bono A, Tornese F, et al. Correlation between low folate levels and hyperhomocysteinemia, but not with vitamin B12 in hypertensive patients. *Annals of clinical and laboratory science*. 2014; 44(3): 286-290.
136. Walker MC, Smith GN, Perkins SL, Keely EJ, Garner PR. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1999;180(3 Pt 1):660-664.
137. Andersson A, Hultberg B, Brattström L, Isaksson A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry: journal of the Forum of European Clinical*

Chemistry Societies. 1992;30(6):377-379.

138. Mascarenhas M, Habeebullah S, Sridhar MG. Revisiting the role of first trimester homocysteine as an index of maternal and fetal outcome. *Journal of pregnancy*. 2014;2014:1-7.
139. Kumar KS, Govindaiah V, Naushad SE, Devi RR, Jyothy A. Plasma homocysteine levels correlated to interactions between folate status and methylene tetrahydrofolate reductase gene mutation in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Journal of obstetrics and gynaecology: the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*. 2003; 23(1):55-58.
140. Visternicean E. Homocysteine and recurrent miscarriage. 2017:15-19.
141. Fatih fianhkan, Fatma Tufan Altuncu, Koray Özbay, Muhittin Eftal Avc, Ahmet Göçmen. Does serum homocysteine level have a role in the early pregnancy loss? *Perinatal Journal*. 2019;27:189-193.
142. Nguyễn Văn Tuấn, Nguyen Minh Hiện, Phạm Văn Trân. Nghiên cứu mối liên quan giữa nồng độ Homocysteine huyết thanh với đặc điểm lâm sàng và hình ảnh cắt lớp vi tính sọ não của đột quỵ nhồi máu não trên lều giai đoạn cấp. *Y dược học quân sự*. 2015;11:91-97.
143. Cao Phi Phong. Mối quan hệ giữa tăng homocysteine huyết tương và nhồi máu não. *Y học thành phố Hồ Chí Minh*,. 2005;9:127-132.
144. Nelen WL, Blom HJ, Thomas CM, Steegers EA, Boers GH, Eskes TK. Methylentetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *The Journal of nutrition*. 1998;128(8):1336-1341.
145. Xie X, Zhang Y, Xin L, Leng J, Lu Y, Xue Y. Relationship of folate metabolism related enzymes MTHFR and MTRR gene polymorphisms

- with unexplained recurrent spontaneous abortion. 2017;10:3746-3752.
146. Scaglione F, Panzavolta G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 2014;44(5):480-488.
 147. Golding PH. Experimental folate deficiency in human subjects: what is the influence of vitamin C status on time taken to develop megaloblastic anaemia? *BMC Hematology*. 2018;18(1):13.
 148. Indrani Mukhopadhyay, V. Pruthviraj, Rao P. S, Manash Biswas. Hyperhomocysteinemia in recurrent pregnancy loss and the effect of folic acid and vitamin B12 on homocysteine levels: a prospective analysis. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol*. 2017;6:2258-2261.
 149. Lưu Thị Thu Huyền, Hoàng Thị Thu Hương. Nghiên cứu nồng độ Folate huyết thanh ở phụ nữ mang thai. Hội nội tiết đái tháo đường Huế, Chuyên đề rối loạn chuyển hóa; 22, 2015.
 150. Lamers Y, Prinz-Langenohl R, Moser R, Pietrzik K. Supplementation with [6S]-5-methyltetrahydrofolate or folic acid equally reduces plasma total homocysteine concentrations in healthy women. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(3):473-478.
 151. Servy EJ, Jacquesson-Fournols L, Cohen M, Menezo YJR. MTHFR isoform carriers. 5-MTHF (5-methyl tetrahydrofolate) vs folic acid: a key to pregnancy outcome: a case series. *J Assist Reprod Genet*. 2018; 35(8):1431-1435.
 152. Wang X, Fu J, Li Q, Zeng D. Geographical and Ethnic Distributions of the MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G Gene Polymorphisms in Chinese Populations: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(4): e0152414.
 153. Berker B, Kaya C, Aytac R, Satiroglu H. Homocysteine concentrations in follicular fluid are associated with poor oocyte and embryo qualities in polycystic ovary syndrome patients undergoing assisted reproduction. *Human*

- reproduction (Oxford, England)*. 2009; 24(9): 2293-2302.
154. Botto N, Andreassi MG, Manfredi S, et al. Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. *European Journal of Human Genetics*. 2003;11(9):671-678.
 155. Nguyễn Văn Tuấn. Diễn giải nghiên cứu tiên lượng ROC.2010:3-6.
 156. Bergen NE, Jaddoe VW, Timmermans S, et al. Homocysteine and folate concentrations in early pregnancy and the risk of adverse pregnancy outcomes: the Generation R Study. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2012;119(6):739-751.
 157. Wang X, Fu J, Li Q, Zeng D. Geographical and Ethnic Distributions of the MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G Gene Polymorphisms in Chinese Populations: A Meta-Analysis. *PloS one*. 2016; 11(4): e0152414.
 158. Yang Y, Chen J, Wang B, Ding C, Liu H. Association between MTHFR C677T polymorphism and neural tube defect risks: A comprehensive evaluation in three groups of NTD patients, mothers, and fathers. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2015; 103(6):488-500.
 159. Hwang KR, Choi YM, Kim JJ, et al. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Risk of Recurrent Pregnancy Loss: a Case-Control Study. *Journal of Korean medical science*. 2017; 32(12): 2029-2034.
 160. Yadav U, Kumar P, Gupta S, Rai V. Distribution of MTHFR C677T Gene Polymorphism in Healthy North Indian Population and an Updated Meta-analysis. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2017; 32(4):399-410.
 161. Moll S, Varga EA. Homocysteine and MTHFR Mutations. *Circulation*. 2015;132(1):e6-9.
 162. Bezgin T, Kaymaz C, Akbal Ö, Yılmaz F, Tokgöz HC, Özdemir N. Thrombophilic Gene Mutations in Relation to Different Manifestations of

- Venous Thromboembolism: A Single Tertiary Center Study. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis: official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/ Hemostasis*. 2018; 24(1): 100-106.
163. Simone B, De Stefano V, Leoncini E, et al. Risk of venous thromboembolism associated with single and combined effects of Factor V Leiden, Prothrombin 20210A and Methylenetetrahydrofolate reductase C677T: a meta-analysis involving over 11,000 cases and 21,000 controls. *European journal of epidemiology*. 2013;28(8):621-647.
164. Eslami MM, Khalili M, Soufizomorrod M, Abroun S, Razi B. Factor V Leiden 1691G > A mutation and the risk of recurrent pregnancy loss (RPL): systematic review and meta-analysis. *Thromb J*. 2020;18:11-11.
165. Sah AK, Shrestha N, Joshi P, et al. Association of parental methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T gene polymorphism in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *BMC research notes*. 2018; 11(1):233.
166. Holmes ZR, Regan L, Chilcott I, Cohen H. The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss. *British journal of haematology*. 1999;105(1):98-101.
167. Wiwanitkit V. Roles of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in repeated pregnancy loss. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2005;11(3):343-345.
168. Schwahn BC, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms: Pharmacogenetic Effects. 2000-2013; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5968/>.
169. Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific

- Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate OBV, and Choline,. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. In: Vol 8 Folate. Washington (DC): National Academies Press (US); 1998.
170. Turgal M, Gumruk F, Karaagaoglu E, Beksac MS. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Pregnancy Outcome. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2018; 78(9):871-878.
171. Nair RR, Khanna A, Singh K. MTHFR C677T polymorphism and recurrent early pregnancy loss risk in north Indian population. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif)*. 2012;19(2):210-215.
172. Mehandjiev TR, Tenno NM, Nakura Y, et al. Impact of maternal methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on intervillous and decidual pathology with pregnancy loss. 2019; 45(1): 78-85.
173. Nadir Y, Hoffman R, Brenner B. Association of homocysteine, vitamin B12, folic acid, and MTHFR C677T in patients with a thrombotic event or recurrent fetal loss. *Annals of hematology*. 2007;86(1):35-40.
174. Haws RA, Yakoob MY, Soomro T, Menezes EV, Darmstadt GL, Bhutta ZA. Reducing stillbirths: screening and monitoring during pregnancy and labour. *BMC pregnancy and childbirth*. 2009;9 Suppl 1(Suppl 1):S5.
175. Menezes EV, Yakoob MY, Soomro T, Haws RA, Darmstadt GL, Bhutta ZA. Reducing stillbirths: prevention and management of medical disorders and infections during pregnancy. *BMC pregnancy and childbirth*. 2009;9(1):S4.
176. American College of Obstetricians and Gynecologists, Society for

Địa chỉ :

Số điện thoại:

II. LÝ DO ĐẾN KHÁM

.....

III. TIỀN SỬ

Bản thân

Gia đình

IV. THÔNG TIN LÂM SÀNG

4.1. Sản khoa:

Số lần mang thai Có Không Số lần.....

Số lần sảy thai Có Không Số lần.....

Số lần thai chết lưu Có Không Số lần.....

Số lần mang thai dị tật Có Không Số lần.....

Đã dùng thuốc có acid folic trong vòng 4 tuần: Có Không

4.2. Bệnh mãn tính:

Tiểu đường Có Không

Tăng huyết áp Có Không

Bệnh tim mạch Có Không

Bệnh khác:

4.3 Các nguyên nhân gây ST, TCL

Bất đồng Rh: Có Không

Nhiễm sắc thể đồ vợ/chồng: Bình thường Bất thường

Hội chứng Antiphospholipid: Âm tính Dương tính

Siêu âm tử cung, phần phụ: Bình thường Bất thường

Mã XN	Folate (ng/mL)	Homocysteine (μ mol/L)
-------	----------------	--------------------------------

Kết quả		
---------	--	--

Kiểu gen MTHFR 677	CC	CT	TT
Kiểu gen MTHFR 1298	AA	AC	CC
Kiểu gen PAI 1	5G/5G	4G/5G	4G/4G
Mã XN			

V. CHẨN ĐOÁN:

.....

BS khai thác thông tin

PHỤ LỤC 2

**BỆNH VIỆN ĐA KHOA
MEDLATEC**

**PHIẾU THU THẬP SỐ LIỆU
NGHIÊN CỨU**

Mã số BN:

I. PHẦN HÀNH CHÍNH

Họ và tên..... Tuổi..... Giới.....

Nghề nghiệp:

Địa chỉ :

Số điện thoại:

II. LÝ DO ĐẾN KHÁM

.....

III. TIỀN SỬ

Bản thân

Gia đình

IV. THÔNG TIN LÂM SÀNG

4.1. Sản khoa:

Số lần mang thai Có Không Số lần.....

Số lần sảy thai Có Không Số lần.....

Số lần thai chết lưu Có Không Số lần.....

Số lần mang thai dị tật Có Không Số lần.....

Đã dùng thuốc có acid folic trong vòng 4 tuần: Có Không

4.2. Bệnh mãn tính:

Tiểu đường Có Không

Tăng huyết áp Có Không

Bệnh tim mạch Có Không

Bệnh khác:

4.3. Các nguyên nhân gây ST, TCL

Bất đồng Rh: Có Không

Nhiễm sắc thể đồ vợ/chồng: Bình thường Bất thường

Hội chứng Antiphospholipid: Âm tính Dương tính

Siêu âm tử cung, phần phụ: Bình thường Bất thường

Mã XN	Folate (ng/mL)	Homocysteine ($\mu\text{mol/L}$)
Kết quả		

Kiểu gen MTHFR 677	CC	CT	TT
Kiểu gen MTHFR 1298	AA	AC	CC
Kiểu gen PAI 1	5G/5G	4G/5G	4G/4G
Mã XN			

V. CHẨN ĐOÁN:

.....

BS khai thác thông tin

PHỤ LỤC 3

QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT DNA TỪ MÁU TOÀN PHẦN

Sử dụng hóa chất

QIAamp DNA Blood Mini Kit

1. Mục đích

Quy trình hướng dẫn tách chiết DNA để xác định đa hình gen MTHFR trong mẫu máu toàn phần chống đông bằng EDTA.

2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này áp dụng tại Bộ môn Y sinh học-Di truyền, Trường Đại Học Y Hà Nội. Sử dụng bộ kit tách chiết DNA Qiagen blood mini kit.

3. Trách nhiệm

- Các cán bộ của bộ môn, bác sĩ nội trú và các học viên có trách nhiệm thực hiện đúng quy trình. Các mẫu bệnh phẩm ban đầu cần được kiểm tra, nếu không đạt như: sai chất chống đông, thiếu thể tích, mẫu bị đông... cần được loại bỏ và lấy lại mẫu.
- Mẫu được phân tích trong tủ an toàn sinh học cấp II để tránh nhiễm chéo.
- Sau khi có kết quả tách chiết cần kiểm tra nồng độ DNA trước khi tiến hành chạy real time PCR.

4. Thuật ngữ và từ viết tắt

EDTA : Ethylene Diamine Tetracetic Acid

DNA : deoxyribonucleic acid

PC : positive control (chứng dương)

NC : negative control (chứng âm)

PCR : polymerase chain reaction (phản ứng khuếch đại chuỗi gene)

QC : quality control (Kiểm soát chất lượng)

5. Nguyên lý

Tách DNA bằng cột silica là một phương pháp tách DNA dựa trên nguyên lý các phân tử DNA liên kết với bề mặt silic trong môi trường có sự

hiện diện của một số muối và trong điều kiện pH nhất định. DNA sau khi gắn lên cột được rửa sạch bằng muối và ethanol nồng độ cao, và cuối cùng muối nồng độ thấp để loại bỏ các thành phần không cần thiết khác. Sau đó DNA được thu hồi bằng đệm rửa giải để sử dụng cho các mục đích tiếp theo.

6. Trang thiết bị, hóa chất, vật tư tiêu hao

6.1. Trang thiết bị

- Máy li tâm để bàn Eppendorf (Đức).
- Máy Voltex – Genie 2.
- Máy quang phổ kế Nano drop 2000C.
- Tủ lạnh (Sam sung).
- Tủ lạnh sâu: - 20°C Sanyo.
- Micropipet (Eppendorf) các mức thể tích.
- Đầu côn các loại thể tích.
- ống eppendorf thể tích 1,5mL và 2mL vô trùng

6.2. Hóa chất, vật tư tiêu hao

- Buffer AL: biến tính Protein và ly giải DNA, gắn DNA lên màng.
- Buffer AE: đệm hòa tan và giải phóng DNA ra khỏi cột lọc, lưu giữ DNA
- Buffer AW1: trước khi sử dụng hóa chất AW1 được pha với cồn tuyệt đối theo công thức: 95ml AW1 + 125 ml Ethanol. AW1 rửa các protein, polyssacharid,... khỏi màng lọc.

- Buffer AW2: trước khi sử dụng AW2 được pha với cồn tuyệt đối như sau: 66ml AW2 + 160 ml Ethanol. AW2 loại bỏ các muối dư để tăng sản lượng và độ tinh sạch của DNA.

- Ethanol: loại bỏ các muối.

- Protease: bổ sung 1,2 ml Protease solvent – phù hợp tách DNA từ mẫu máu, dịch cơ thể. Protease dùng để ly giải Protein.

- Các vật tư tiêu hao: Rotor Adapter, Sample tube, filter-tips 200µl, filter-tips 1000µl đồng bộ của Qiagene, ống Eppendorf 1,5 mL

- Pipet loại 10 µl, 200µl, 1000µl và các loại đầu côn có đầu lọc tương ứng
- Máy li tâm thường, vortex, block nhiệt (56°C)

7. Tiến hành tách chiết

- B1. Bổ sung 20 uL Protease vào mỗi ống epp 1.5 mL
- B2. Bổ sung 200 uL mẫu (máu tổng số, huyết thanh, dịch chiết, buffy coat...) vào ống ở bước (1) và vortex.
- B3. Bổ sung 200 uL Buffer AL. Trộn đều trong 15s (Lưu ý không cho Protease/ Proteinase K trực tiếp vào AL)
- B4. Ủ 56°C/10 phút, lắc đều dung dịch trong quá trình ủ. Ly tâm nhẹ cho dung dịch lắng hết xuống đáy, không dính trên nắp
- B5. Bổ sung 200 uL EtOH 100% vào mẫu. Invert 15s. Ly tâm nhẹ
- B6. Lên cột. Ly tâm 8000 rpm/phút trong 1 phút. Loại dịch chảy qua cột, chuyển cột sang 1 ống thu mới (được cấp bởi kit)
- B7. Cho 500 uL Buffer AW1. Ly tâm 8000 rpm/phút trong 1 phút. Loại dịch chảy qua cột, thay ống thu (được cấp bởi kit)
- B8. Cho 500 uL Buffer AW2. Ly tâm 14000 rpm/ phút trong 3 phút
- B9. Chuyển cột ly tâm sang ống thu mới. Ly tâm khan tốc độ tối đa (14,000 rpm) trong 1 phút
- B10. Chuyển cột sang ống 1.5ml sạch. thêm 50 - 200 uL Buffer AE. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút. Ly tâm 8000 rpm/phút trong 2 phút, thu dịch DNA.

8. Đánh giá kết quả sau tách chiết DNA

Mẫu máu sau khi được tách chiết bằng kit DNA Blood Mini được đo nồng độ DNA. Độ tinh sạch của DNA được xác định bởi máy Nanodrop, tỷ lệ OD 260/280 và 260/230. Kết quả nồng độ DNA từ 1,8-2,0 là mẫu DNA đạt tiêu chuẩn.

PHỤ LỤC 4

QUY TRÌNH THỰC HIỆN REAL TIME PCR PHÁT HIỆN ĐA HÌNH GEN MTHFR

Bật máy Real-time PCR, nhất là đèn của đầu đọc Real-time ít nhất là 15 phút trước khi chạy chương trình. Bật máy tính, kiểm tra chắc chắn máy Real-time và máy tính đã kết nối với nhau.

Bật chương trình real- time PCR.

Chọn chức năng chờ Heat lid đạt 105⁰C thì chu trình luân nhiệt mới bắt đầu.

Cài đặt Protocol chu trình luân nhiệt: 95⁰C-15 phút, 25 chu kì (94⁰C – 30 giây, 62⁰C – 1 phút, 72⁰C - 1 phút, 72⁰C – 15 phút.

Cài đặt vị trí mẫu “ Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí đã đặt trên máy Real-time PCR. Với mẫu, chọn loại mẫu là “ Unknown”. Đặt kí hiệu mã số tương ứng với kí hiệu của mẫu.

Chọn màu FAM, HEX trong đó màu HEX (xanh lá cây) là Alen bình thường, màu FAM (xanh nước biển) là Alen đột biến.

Chạy chương trình real-time PCR và đọc kết quả. Lưu file dữ liệu vào máy tính.

Chạy song song mẫu bệnh phẩm và các mẫu chứng kiểm định bao gồm chứng âm không có DNA, chứng đồng hợp tử không có đa hình, chứng dị hợp tử và chứng đồng hợp tử đa hình.

PHỤ LỤC 5

HƯỚNG DẪN PHÂN TÍCH XÉT NGHIỆM HOMOCYSTEIN VÀ FOLAT HUYẾT THANH TRÊN MÁY MIỄN DỊCH TỰ ĐỘNG ARCHITECH

1. Đầu ngày:

- Khởi động máy: Phải khởi động (cấp điện) cho SCC (System control center) trước khi bật nguồn cho phần mềm và RSH (retest sample handler).

2. Kiểm tra đầu ngày:

- Kiểm tra hóa chất phụ: Từ màn hình Snapshot chọn Supplies để vào màn hình Supply status và kiểm tra: thể tích và phần trăm còn lại của Trigger, Pre-trigger, Wasbuffer, RV.

- Kiểm tra hóa chất chính: Chọn Reagent trên menu Bar, chọn Reagent Status để vào màn hình Reagent: kiểm tra tình trạng hóa chất, lượng test còn trên máy, tình trạng Calibration.

3. Chạy Control:

- Chuẩn bị sinh phẩm QC

- Chọn Order → Control Order → Chọn Multiconstituent → Chọn tên QC, lot QC → Chọn mức QC → Chọn xét nghiệm cần QC → Add Order → Đặt QC có barcode vào vị trí của đường track → Mẫu QC sẽ tự di chuyển theo đường track vào máy và thực hiện xét nghiệm.

- Trong trường hợp QC bằng single analyte: Đặt rack QC có barcode vào vị trí của đường track, mẫu QC sẽ di chuyển vào máy và thực hiện chạy xét nghiệm theo chương trình đã cài.

4. Chạy bệnh nhân

- Chọn Order → Patient Order → Nhập ID/ tên bệnh nhân vào mục SID
→ Chọn xét nghiệm cần chạy → Add Order → Đặt mẫu vào vị trí trong đường track → Mẫu sẽ tự động di chuyển vào máy và thực hiện xét nghiệm.

5. Chạy chuẩn

- Chọn Order → Calibration Order → Chọn xét nghiệm cần Calibration
→ Add Order → Đặt hóa chất Calibration vào các vị trí trong đường track theo thứ tự → Mẫu Calibration sẽ tự động di chuyển vào máy và thực hiện xét nghiệm.

6. Xem kết quả:

Vào mục Results → Results story → Xem và nhận định kết quả.

7. Cuối ngày:

- Bảo dưỡng khi thiết bị ở trạng thái Ready

- Chọn System → Maintenance → Chọn Module 1 → Daily/Weekly → Chọn quy trình bảo dưỡng → Perform → Chọn OK → Chọn Proceed và làm theo hướng dẫn → Kết thúc chọn Done.

QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG NỒNG ĐỘ HOMOCYSTEIN

HUYẾT THANH

I. Mục đích

Hướng dẫn thực hiện kỹ thuật xét nghiệm Homocysteine trên máy xét nghiệm miễn dịch tại bệnh viện MEDLATEC và các nhận định kết quả xét nghiệm.

II. Phạm vi áp dụng

Quy trình này áp dụng cho máy phân tích miễn dịch tự động Abbott ARCHITECT tại bộ phận xét nghiệm Hóa sinh - Miễn dịch - Trung tâm Xét nghiệm.

III. Trách nhiệm

- Người nhận mẫu có nhiệm vụ nhận và kiểm tra mẫu, nếu không đúng quy cách phải loại bỏ mẫu.
- KTV phân tích có nhiệm vụ tiến hành làm xét nghiệm theo quy trình đã định.
- Cán bộ nhận định kết quả có trách nhiệm phải thông báo ngay cho khách hàng hoặc bác sĩ chỉ định nếu kết quả có bất thường.

IV. Thuật ngữ và từ viết tắt:

- Biểu đồ kiểm tra chất lượng: biểu diễn sự biến thiên kết quả nội kiểm theo biểu đồ Levey - Jennings với 1SD, 2SD, 3SD.
- SD: Độ lệch kết quả nội kiểm
- QC: Quality control (Kiểm tra chất lượng)

V. Nguyên lý của xét nghiệm

- Xét nghiệm ARCHITECT Homocysteine sử dụng công nghệ Miễn dịch Vi hạt Hóa phát quang (CMIA), Chemiflex để định lượng L - homocysteine.
- Bước một, Homocysteine nhị hợp hay liên kết (dạng oxy hóa) được khử bằng DTT sang dạng homocysteine tự do, sau đó được chuyển thành S – adenosyl homocysteine (SAH) qua phản ứng của enzyme S – adenosyl homocysteine hydrolase (rSAHHase) khi có quá nhiều adenosine.
- Sau đó SAH cạnh tranh với S – adenosyl cysteine có đánh dấu acridinium để gắn vào kháng thể đơn dòng có liên kết hạt.

- Sau bước rửa và tách từ tính, dung dịch Pre – Trigger và Trigger solutions được thêm vào hỗn hợp phản ứng, phản ứng hóa phát quang hình thành được đo là đơn vị ánh sáng tương đối (RLUs).

- Sự tương quan tỉ lệ nghịch giữa lượng homocysteine trong mẫu và RLUs sẽ được bộ phận quang học trong máy ARCHITECT i* System phát hiện.

VI. Trang thiết bị, hóa chất-vật tư cần thiết

- **Máy xét nghiệm miễn dịch Architect**

- **Hóa chất:**

- MICROPARTICLES: Anti – S – adenosyl – L – homocysteine
- CONJUGATE: S – adenosyl – L – cysteine (SAC) đánh dấu acridinium
- ENZYME: S – adenosyl – L – homocysteine hydrolase tái tổ hợp
- REDUCTANT: Dithiothreitol (DTT)
- Pre – Trigger solution
- Trigger solution
- Wash Buffer

- Sử dụng thuốc thử: các thuốc thử được đựng trong 1 bộ các chai sẵn sàng để sử dụng. Máy phân tích tự động đọc mã vạch trên nhãn thuốc thử và ghi nhận tất cả thông tin cần thiết cho việc chạy thuốc thử.

- Bảo quản: ở 2-8°C

VII. Kiểm soát chất lượng

a) Hiệu chuẩn

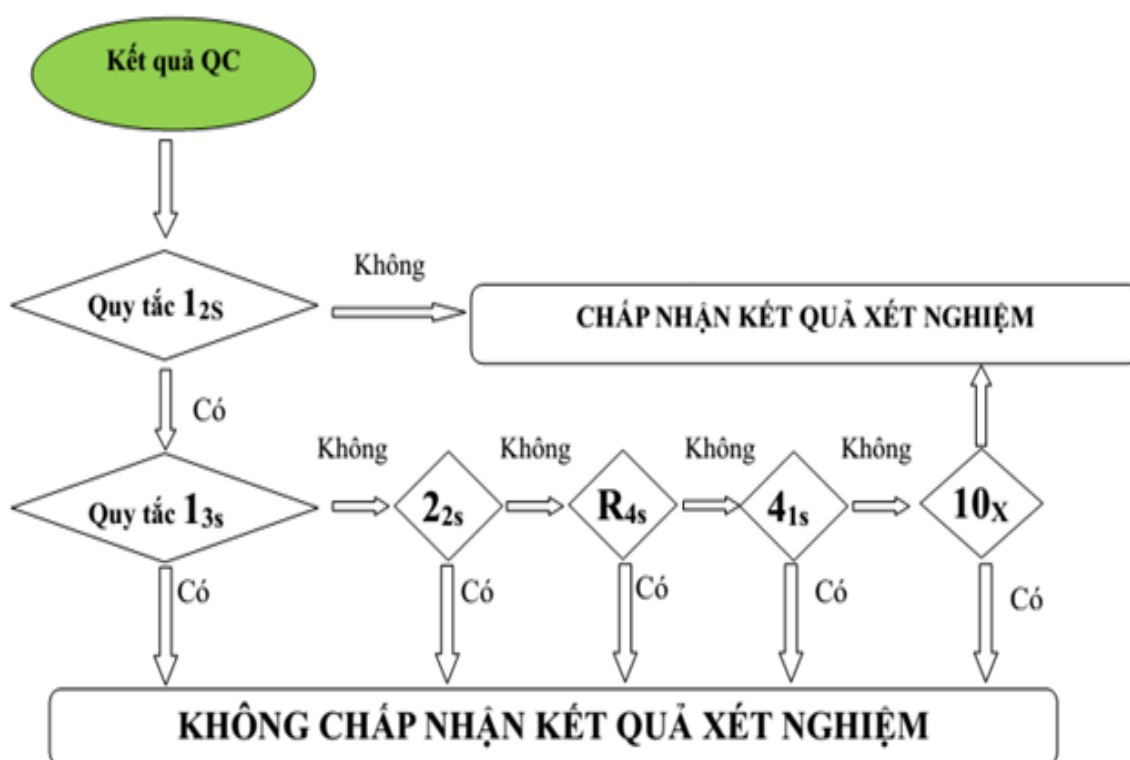
- Cần thực hiện hiệu chuẩn xét nghiệm trong các trường hợp:
 - + Triển khai xét nghiệm mới, thiết bị mới, thay đổi lô/lot hóa chất mới
 - + Khi đường cal cho xét nghiệm hết thời hạn ổn định trên máy theo khuyến cáo của hãng.
 - + Khi kết quả nội kiểm phản ánh có sai số mà nguyên nhân xác định do đường cal.
 - + Khi kết quả phân tích cho khách hàng có xu hướng sai số hệ thống, cán bộ duyệt kết quả yêu cầu kiểm tra.

- + Khi có sửa chữa, thay thế các bộ phận bóng đèn, cuvet, điện cực, hệ thống kim hút, thay đổi vị trí máy móc.
- Thực hiện hiệu chuẩn xét nghiệm tuân thủ theo hướng dẫn thực hiện calibration MED.HD.08

Chú ý: Sau hiệu chuẩn, phải đánh giá lại kết quả bằng việc thực hiện nội kiểm tra chất lượng xét nghiệm. Hiệu chuẩn đạt khi kết quả nội kiểm không vi phạm các quy tắc Westgard.

b) Nội kiểm tra chất lượng

SƠ ĐỒ THỰC HIỆN



- Mẫu nội kiểm miễn dịch (gồm 3 mức nồng độ thấp, trung và cao) được thực hiện vào đầu buổi sáng hằng ngày hoặc trước khi thực hiện phân tích mẫu bệnh phẩm theo theo hướng dẫn thực hiện, đánh giá nội kiểm chất lượng hóa sinh MED.HD.HS.15

- Các giới hạn kiểm soát nội kiểm phải được xây dựng lại từ các kết quả của phòng xét nghiệm.

- Kiểm soát chất lượng bằng cách so sánh biểu đồ kiểm tra chất lượng QC theo luật của Westgard, đặc biệt là 8 quy tắc thường dùng 1_{2s} , 1_{3s} , R_{4s} , 2_{2s} , 4_{1s} , 10_x , hiện tượng lệch (Shift), hiện tượng trượt (Trend) theo **MED.HD.05**

Chú ý: Nếu QC vi phạm quy tắc Westgard mà chưa xử lý được thì không được phép chạy mẫu bệnh nhân.

c) Ngoại kiểm tra chất lượng

- Định kỳ thực hiện phân tích đúng, đủ mẫu ngoại kiểm (Hướng dẫn thực hiện ngoại kiểm chất lượng MED.HD.07) theo lịch của các đơn vị kiểm chuẩn công bố và lịch thực hiện ngoại kiểm MED.BMQL.27.04

- Phân tích kết quả ngoại kiểm, xác định nguyên nhân và khắc phục theo hướng dẫn đánh giá kết quả ngoại kiểm MED.HD.06

VIII. Nguyên tắc an toàn – Kiểm soát môi trường

8.1. Nguyên tắc an toàn:

Cán bộ thực hiện xét nghiệm cần trang bị bảo hộ lao động trong phòng xét nghiệm như găng tay, khẩu trang, mũ trùm. Tuân thủ các nguyên tắc an toàn sinh học trong phòng xét nghiệm theo **MED.STAT**

8.2. Kiểm soát môi trường:

Xét nghiệm được thực hiện tại điều kiện môi trường nhiệt độ 20-25°C, độ ẩm 45-80%.

IX. Các bước thực hiện của quy trình

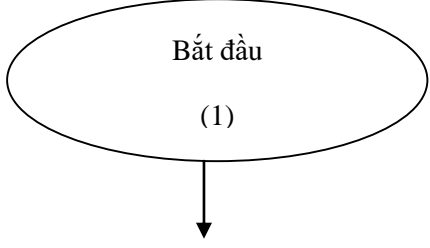
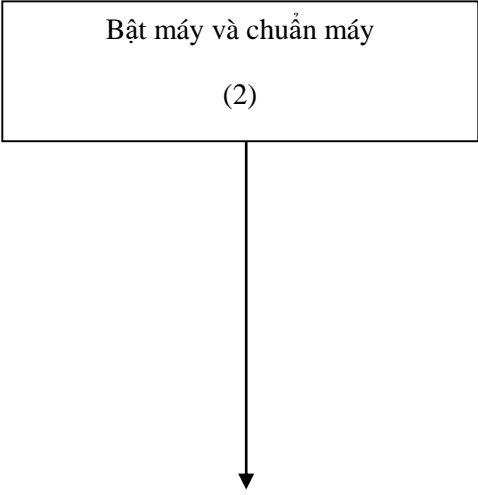
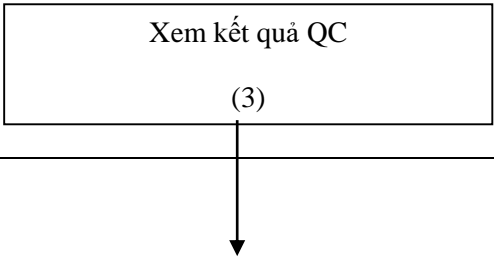
9.1. Chuẩn bị bệnh nhân:




Xét nghiệm được thực hiện trên huyết thanh/huyết tương. Nên yêu cầu bệnh nhân nhịn ăn trước khi lấy máu làm xét nghiệm.

9.2. Mẫu bệnh phẩm xét nghiệm:

- Lấy 3 ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông hay ống có chất chống đông là Li-Hepadin, K3- EDTA. Mẫu không vỡ hồng cầu.
- Sau khi lấy máu, đem ly tâm ở 4000 vòng/ 5 phút tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương.

9.3. Phân tích mẫu

Trách nhiệm	Các bước thực hiện	Diễn giải/Tài liệu/Biểu mẫu liên quan
Kỹ thuật viên		- Kiểm tra hóa chất sinh phẩm: + Số lượng, chất lượng. + Hạn sử dụng.
Kỹ thuật viên		- Bật máy tại nút ON phía trước máy. - Đợi máy về trạng thái STANDBY - Thực hiện nội kiểm hàng ngày: Mẫu QC để đã đông nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó trộn đều bằng pipette tránh tạo bọt. Vào phần chạy QC trên máy và chọn xét nghiệm cần kiểm tra.
Kỹ thuật viên		- Xem và đánh giá kết quả QC, in và trình kết quả QC cho trưởng nhóm hoặc QLCL duyệt. Lưu vào sổ nội

		kiểm đối với từng hệ thống máy riêng.
Kỹ thuật viên	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Chạy máy và theo dõi máy (4) </div> 	<ul style="list-style-type: none"> - Nhận, kiểm tra, phân loại bệnh phẩm từ tổ nhận mẫu. - Thực hiện quy trình xét nghiệm thường quy, quy trình xét nghiệm cấp cứu theo MED.QTQL.25 sau khi được trưởng nhóm hoặc QLCL duyệt kết quả nội kiểm. - Chạy máy: Nhấn START cho máy chạy, theo dõi máy, ghi các cảnh báo vào sổ nhật ký máy khi có sự cố.
Kỹ thuật viên	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Kiểm soát kết quả (5) </div> 	<ul style="list-style-type: none"> - Xem kết quả: khi máy đưa ra kết quả ta xem máy có cảnh báo lỗi gì với kết quả đó không. Nếu kết quả quá cao phải báo ngay cho trưởng nhóm.
Cán bộ phụ trách chuyên môn	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Duyệt kết quả (6) </div> 	<ul style="list-style-type: none"> - Kiểm tra lại mẫu kết quả bất thường (quá cao) và không phù hợp với chẩn đoán lâm sàng của bác sĩ chỉ định. - Cho chạy lại hoặc pha loãng xét nghiệm nếu có cảnh báo tương ứng.
Kỹ thuật viên	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Kết thúc (7) </div>	<ul style="list-style-type: none"> - Rửa máy, vệ sinh máy, tắt máy, ghi sổ nhật ký vào cuối ngày. - Tổng kết số liệu.

X. Diễn giải và báo cáo kết quả

10.1. Kết quả và báo cáo kết quả

a. Tính toán kết quả:

Máy xét nghiệm tự động tính toán nồng độ Homocysteine trong mẫu. Kết quả thực hiện xét nghiệm sẽ được máy tự động lưu vào trong phần mềm quản lý bệnh viện.

b. Thuật ngữ sử dụng cho chú thích kết quả: Tăng

c. Đơn vị đo: $\mu\text{mol/L}$

d. Khoảng đo: 1.00 $\mu\text{mol/L}$ đến 50.00 $\mu\text{mol/L}$.

Mẫu với nồng độ folate trong huyết thanh hay huyết tương lớn hơn 50.00 $\mu\text{mol/L}$ sẽ được cảnh báo với mã ">50.00" và có thể được pha loãng bằng cả Quy trình pha loãng tự động hay Quy trình pha loãng thủ công.

e. Khoảng tham chiếu sinh học:

- Nam: 5.46 – 16.20 $\mu\text{mol/L}$
- Nữ: 4.44 – 13.56 $\mu\text{mol/L}$

10.2. Biện luận kết quả

Tăng nồng độ homocystein máu gặp trong các nguyên nhân sau

- Yếu tố nguy cơ bị bệnh tim mạch.
- Tình trạng đái homocystein (bẩm sinh).
- Hút thuốc lá.
- Các thiếu hụt vitamin (acid folic, vitamin B6, vitamin B12).

XI. Lưu ý (cảnh báo)

Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm

- Nồng độ homocysteine máu có thể tăng lên ở người có tuổi và người nghiện thuốc lá.

- Các thuốc làm tăng nồng độ homocysteine máu là: Carbamazepin, cycloserin, isoniazid, methotrexat, penicill-amin, phenytoin, procarbazin.

Nguồn biến đổi tiềm ẩn:

- Các mẫu xét nghiệm lấy từ bệnh nhân đã nhận các chế phẩm từ các kháng thể đơn dòng chuột cho chẩn đoán hoặc điều trị có thể chứa các kháng thể kháng chuột ở người (HAMA). Những mẫu này có thể cho giá trị thay đổi tăng hoặc giảm giả khi xét nghiệm với các bộ xét nghiệm như ARCHITECT Homocysteine có sử dụng các kháng thể đơn dòng chuột.

- Kháng thể dị hình trong huyết thanh người có thể phản ứng với immunoglobulins thuốc thử, gây nhiễu với xét nghiệm miễn dịch in vitro. Bệnh nhân thường phơi nhiễm với động vật hay các sản phẩm huyết thanh động vật có thể dễ gây nhiễu và cho kết quả bất thường.

XII. Lưu trữ hồ sơ/biểu mẫu

- Kết quả phân tích được lưu trữ online trên mạng LIS.

XIII. Tài liệu liên quan:

- Quy trình: **MED.QTQL.25, MED.QTQL.34, MED.QTQL.35**
- Hướng dẫn: **MED.HD.STAT, MED.HD.05, MED.HD.06, MED.HD.07, MED.HD.08, MED.HD.HS.15**
- Biểu mẫu: **MED.BMQL.27.04**
- Sổ sách: + Sổ lưu quy trình xét nghiệm Hóa sinh, Miễn dịch
+ Sổ lưu hướng dẫn sử dụng máy Hóa sinh, Miễn dịch

XIV. Tài liệu tham khảo

- Tài liệu hướng dẫn sử dụng máy Abbott ARCHITECT
- Tài liệu hướng dẫn sử dụng thuốc thử Homocysteine của Abbott
- Các xét nghiệm thường quy áp dụng trong thực hành lâm sàng - NXB Y học (2013).

QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG NỒNG ĐỘ FOLATE HUYẾT THANH

I. Mục đích

- Hướng dẫn thực hiện kỹ thuật xét nghiệm Folate trên máy xét nghiệm Abbott Architect tại bệnh viện MEDLATEC và các nhận định kết quả xét nghiệm.

II. Phạm vi áp dụng

- Quy trình này áp dụng cho máy phân tích miễn dịch tự động Abbott Architect tại bộ phận xét nghiệm hóa sinh - trung tâm xét nghiệm.

III. Trách nhiệm

- Người nhận mẫu có nhiệm vụ nhận và kiểm tra mẫu, nếu không đúng quy cách phải loại bỏ mẫu.

- KTV phân tích có nhiệm vụ tiến hành làm xét nghiệm theo quy trình đã định.

- Cán bộ nhận định kết quả có trách nhiệm phải thông báo ngay cho khách hàng hoặc bác sĩ chỉ định nếu kết quả có bất thường.

IV. Thuật ngữ và từ viết tắt:

- Biểu đồ kiểm tra chất lượng: biểu diễn sự biến thiên kết quả nội kiểm theo biểu đồ Levey - Jennings.

- SD: Độ lệch kết quả nội kiểm

- QC: Quality control (Kiểm tra chất lượng)

- LoD: Giới hạn phát hiện

- LoQ: Giới hạn định lượng

V. Nguyên lý của xét nghiệm

- Xét nghiệm ARCHITECT Folate sử dụng công nghệ Miễn dịch Vi hạt Hóa phát quang (CMIA), Chemiflex.

+ Bước 1 tiền xử lý, mẫu và Thuốc thử tiền xử lý 2 (Pre-Treatment Reagent 2) (Dithiothreitol hay DTT) được hút và hòa vào cồng phản ứng (RV).

+ Bước 2 tiền xử lý, một lượng mẫu/hỗn hợp Pre-Treatment Reagent 2 được hút và hòa tan vào cồng phản ứng thứ hai. Thêm Pre-Treatment Reagent 1 (potassium hydroxide hay KOH) vào. Một lượng mẫu đã tiền xử lý được chuyển vào RV thứ ba,

sau đó thêm Folate Binding Protein (FBP) phủ trên vi hạt thuận từ và dung dịch pha loãng thuốc thử.

+ Folate có trong mẫu gắn với các vi hạt phủ FBP. Sau khi rửa, chất kết hợp pteronic acid có đánh dấu acridinium được cho vào và gắn với các vị trí còn trống trên vi hạt phủ FBP. Sau đó, dung dịch Pre-Trigger và Trigger Solutions được thêm vào hỗn hợp phản ứng, phản ứng hóa phát quang hình thành được đo là đơn vị ánh sáng tương đối (RLUs).

Sự tương quan tỉ lệ nghịch giữa lượng folate trong mẫu và RLUs sẽ được bộ phận quang học trong máy ARCHITECT i System phát hiện

VI. Trang thiết bị, hóa chất-vật tư cần thiết

Trang thiết bị:

- Máy xét nghiệm tự động Abbott Architect.

Hóa chất – Vật tư

- + Triger, Pre- Triger, RV, Wash buffer
- + Chất chuẩn Folate, chất kiểm tra chất lượng Folate
- + Các thuốc thử tham gia xét nghiệm :
 - + Conjugate: Acid Pteronic (PTA) - chất kết hợp có đánh dấu acridinium trong dung dịch đệm MES với chất ổn định protein (từ lợn). Nồng độ tối thiểu: 4 ng/mL
 - + Microparticles: protein gắn với anti-Folate (chuột, kháng thể đơn dòng) bắt cặp với vi hạt gắn kết ái lực với Folate Binding Protein (bò), trong dung dịch đệm TRIS với chất ổn định protein (từ albumin huyết thanh người và dê). Nồng độ tối thiểu: 0,08% rắn.
 - + Assay specific diluent
 - + Pre- treatment reagent 1: Thuốc thử Tiền xử lý 1 của Folate chứa potassium hydroxide.
 - + Pre- treatment reagent 2: Thuốc thử Tiền xử lý 2 của Folate chứa dithiothreitol (DTT) trong dung dịch đệm acid acetic có EDTA

VII. Kiểm soát chất lượng

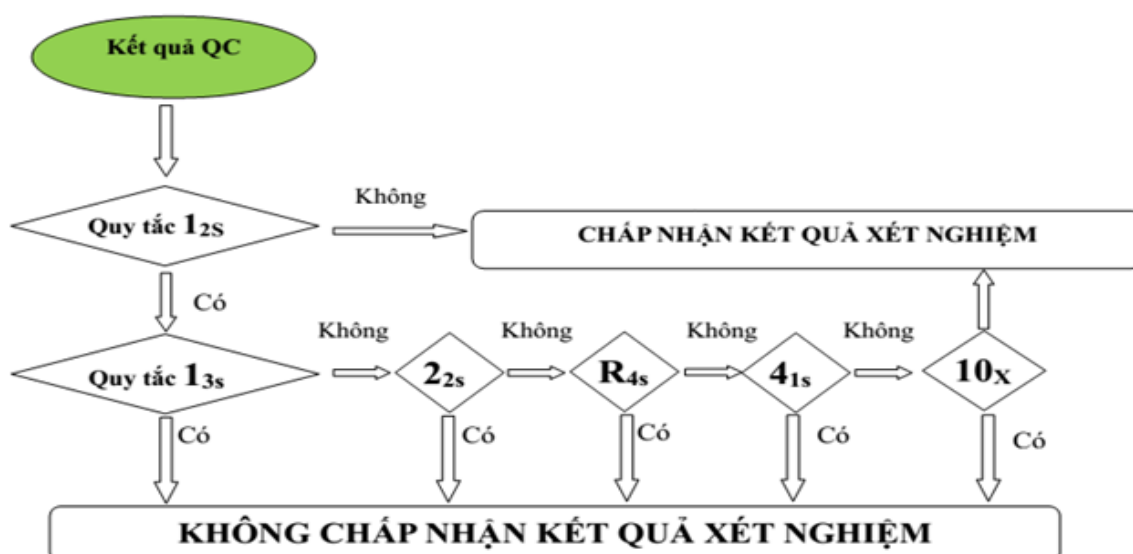
a) Hiệu chuẩn

- Cần thực hiện hiệu chuẩn xét nghiệm trong các trường hợp:
 - + Triển khai xét nghiệm mới, thiết bị mới.
 - + Khi đường cal cho xét nghiệm hết thời hạn ổn định trên máy theo khuyến cáo của hãng.
 - + Khi kết quả nội kiểm phản ánh có sai số mà nguyên nhân xác định do đường cal.
 - + Thay đổi lô/lot hóa chất mới.
 - + Khi có sửa chữa, thay thế các bộ phận bóng đèn, cuvet, điện cực, hệ thống kim hút, thay đổi vị trí máy móc.
- Thực hiện hiệu chuẩn xét nghiệm tuân thủ theo hướng dẫn thực hiện calibration MED.HD.08

Chú ý: Sau hiệu chuẩn, phải đánh giá lại kết quả bằng việc thực hiện nội kiểm tra chất lượng xét nghiệm. Hiệu chuẩn đạt khi kết quả nội kiểm không vi phạm các quy tắc Westgard.

b) Nội kiểm tra chất lượng

SƠ ĐỒ THỰC HIỆN



- Mẫu nội kiểm miễn dịch (gồm 3 mức nồng độ thấp, bình thường và cao) được thực hiện vào đầu buổi sáng hằng ngày hoặc trước khi thực hiện phân tích mẫu bệnh phẩm theo hướng dẫn thực hiện, đánh giá nội kiểm chất lượng hóa sinh MED.HD.HS.15

- Các giới hạn kiểm soát nội kiểm phải được xây dựng lại từ các kết quả của phòng xét nghiệm.

- Kiểm soát chất lượng bằng cách so sánh biểu đồ kiểm tra chất lượng QC theo luật của Westgard, đặc biệt là 8 quy tắc thường dùng 1_{2s} , 1_{3s} , R_{4s} , 2_{2s} , 4_{1s} , 10_x , hiện tượng lệch (Shift), hiện tượng trượt (Trend) theo **MED.HD.05**

Chú ý: Nếu QC vi phạm quy tắc Westgard mà chưa xử lý được thì không được phép chạy mẫu bệnh nhân.

c) Ngoại kiểm tra chất lượng

- Định kỳ thực hiện phân tích đúng, đủ mẫu ngoại kiểm (Hướng dẫn thực hiện ngoại kiểm chất lượng MED.HD.07) theo lịch của các đơn vị kiểm chuẩn công bố và lịch thực hiện ngoại kiểm MED.BMQL.27.04

- Phân tích kết quả ngoại kiểm, xác định nguyên nhân và khắc phục theo hướng dẫn đánh giá kết quả ngoại kiểm MED.HD.06

VIII. Nguyên tắc an toàn – Kiểm soát môi trường

Nguyên tắc an toàn:

- Cán bộ thực hiện xét nghiệm cần trang bị bảo hộ lao động trong phòng xét nghiệm như găng tay, khẩu trang, mũ trùm. Tuân thủ các nguyên tắc an toàn sinh học trong phòng xét nghiệm theo **MED.STAT**

Kiểm soát môi trường:

- Xét nghiệm được thực hiện tại điều kiện môi trường nhiệt độ 20-25°C, độ ẩm 45-80%.

IX. Các bước thực hiện của quy trình:

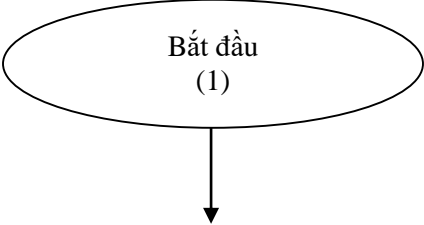
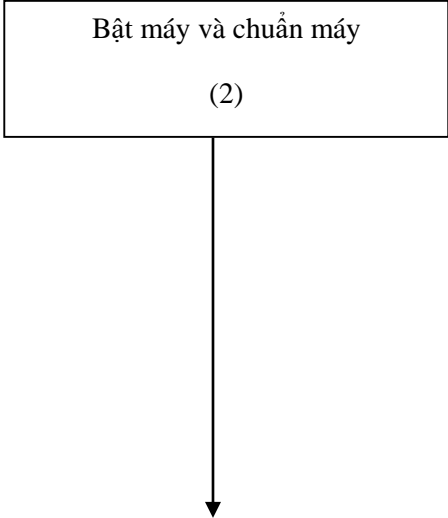
Chuẩn bị bệnh nhân:

- Bệnh nhân đã được giải thích về mục đích của việc lấy máu để làm xét nghiệm. Bệnh nhân cần phải nhịn ăn trước khi lấy máu làm xét nghiệm.

Mẫu bệnh phẩm xét nghiệm:

- Xét nghiệm được thực hiện trên huyết thanh/ huyết tương.
- Lấy 2 ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông hay ống có chất chống đông chống đông bằng Li-heparin, K2-EDTA và K3-EDTA. Có thể sử dụng ống huyết tương chống đông chứa gel tách. Mẫu không vỡ hồng cầu.
- Huyết thanh, huyết tương hay máu toàn phần người để xét nghiệm folate phải được bảo quản tránh ánh sáng.
- Mẫu huyết thanh/huyết tương ổn định: 7 ngày ở 2-8°C, 30 ngày -10°C hoặc lạnh hơn. Tránh đông lạnh/rã đông hơn 3 lần

Tiến hành phân tích mẫu

Trách nhiệm	Các bước thực hiện	Diễn giải/Tài liệu/Biểu mẫu liên quan
Kỹ thuật viên	 <p>Bắt đầu (1)</p>	- Kiểm tra hóa chất sinh phẩm: + Số lượng, chất lượng. + Hạn sử dụng.
Kỹ thuật viên	 <p>Bật máy và chuẩn máy (2)</p>	- Bật máy tại nút ON phía trước máy. - Đợi máy về trạng thái STANDBY - Thực hiện nội kiểm hàng ngày: Mẫu QC để đã đông nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó trộn đều bằng pipette tránh tạo bọt. Vào phần chạy QC trên máy và chọn xét nghiệm cần kiểm tra.

Kỹ thuật viên	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Xem kết quả QC (3) </div>	<ul style="list-style-type: none"> - Xem và đánh giá kết quả QC, in và trình kết quả QC cho trưởng nhóm hoặc QLCL duyệt. Lưu vào sổ nội kiểm đối với từng hệ thống máy riêng.
Kỹ thuật viên	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Chạy máy và theo dõi máy (4) </div>	<ul style="list-style-type: none"> - Nhận, kiểm tra, phân loại bệnh phẩm từ tổ nhận mẫu. - Thực hiện quy trình xét nghiệm thường quy, quy trình xét nghiệm cấp cứu theo MED.QTQL.25 sau khi được trưởng nhóm hoặc QLCL duyệt kết quả nội kiểm. - Chạy máy: Nhấn START cho máy chạy, theo dõi máy, ghi các cảnh báo vào sổ nhật ký máy khi có sự cố.
Kỹ thuật viên	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Kiểm soát kết quả (5) </div>	<ul style="list-style-type: none"> - Xem kết quả: khi máy đưa ra kết quả ta xem máy có cảnh báo lỗi gì với kết quả đó không. Nếu kết quả quá cao phải báo ngay cho trưởng nhóm.
Cán bộ phụ trách chuyên môn	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Duyệt kết quả (6) </div>	<ul style="list-style-type: none"> - Kiểm tra lại mẫu kết quả bất thường (quá cao) và không phù hợp với chẩn đoán lâm sàng của bác sĩ chỉ định. - Cho chạy lại hoặc pha loãng xét nghiệm nếu có cảnh báo tương ứng.
Kỹ thuật viên	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Kết thúc (7) </div>	<ul style="list-style-type: none"> - Rửa máy, vệ sinh máy, tắt máy, ghi sổ nhật ký vào cuối ngày. - Tổng kết số liệu.

X. Diễn giải và báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả

a. Tính toán kết quả:

- Máy xét nghiệm Abbott tự động tính toán nồng độ Folate trong mẫu. Kết quả thực hiện xét nghiệm sẽ được máy tự động lưu vào trong phần mềm quản lý bệnh viện.

b. Khoảng báo cáo: 1.5 ng/mL - 40,0 ng/mL

Mẫu với nồng độ folate trong huyết thanh hay huyết tương lớn hơn 20,0 ng/mL sẽ được cảnh báo với mã ">20,0" và có thể được pha loãng tự động với hệ số 1:2.

c. Thuật ngữ sử dụng cho kết quả: Tăng, giảm.

d. Khoảng đo: 1,5 ng/mL - 20,0 ng/mL

e. Khoảng tham chiếu sinh học: 3.1 – 20.5 ng/mL

Biện luận kết quả

- Nồng độ Folate trong máu thấp có thể gặp:

- Do thiếu hụt dinh dưỡng do các bệnh dạ dày ruột, sử dụng không đủ do thiếu hụt enzym hay liệu pháp đối kháng folate.
- Thuốc như cồn và uống thuốc ngừa thai.
- Nhu cầu folate quá mức, như trong quá trình mang thai.
- Thiếu máu nguyên hồng cầu khổng lồ

- Nồng độ Folate trong máu cao có thể gặp:

- Thiếu hụt Vitamin B12

XI. Lưu ý (cảnh báo)

Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm

- Mẫu xét nghiệm folate nên được giữ tránh ánh sáng. Ánh sáng sẽ làm nhanh quá trình thoái biến folate.

- Mẫu huyết thanh và huyết tương từ mẫu bệnh nhân bị ghép hư hay suy thận (kể cả bệnh nhân chạy thận) có thể cho các nồng độ giá trị folate giảm giả.

Nguồn biến đổi tiềm ẩn:

- Các mẫu xét nghiệm lấy từ bệnh nhân đã nhận các chế phẩm từ các kháng thể đơn dòng chuột cho chẩn đoán hoặc điều trị có thể chứa các kháng thể kháng chuột ở người (HAMA). Những mẫu này có thể cho giá trị thay đổi tăng hoặc giảm giả khi xét nghiệm với các bộ xét nghiệm như ARCHITECT Folate có sử dụng các kháng thể đơn dòng chuột

- Kháng thể dị hình trong huyết thanh người có thể phản ứng với immunoglobulins thuốc thử, gây nhiễu với xét nghiệm miễn dịch *in vitro*. Bệnh nhân thường phơi nhiễm với động vật hay các sản phẩm huyết thanh động vật có thể dễ gây nhiễu và cho kết quả bất thường

- Mẫu huyết thanh hay huyết tương chứa tế bào hồng cầu có thể làm nồng độ folate tăng giả

- Methotrexate, aminopterin, và folinic acid (Leucovorin) là các tác nhân hóa học cho điều trị có cấu trúc phân tử tương tự như folate. Những tác nhân này có phản ứng chéo với protein gắn với folate trong các xét nghiệm folate

XII. Lưu trữ hồ sơ/biểu mẫu

- Kết quả phân tích được lưu trữ online trên mạng LIS.

XIII. Tài liệu liên quan:

- Quy trình: **MED.QTQL.25, MED.QTQL.34, MED.QTQL.35**
- Hướng dẫn: **MED.HD.STAT, MED.HD.05, MED.HD.06, MED.HD.07, MED.HD.08, MED.HD.HS.15**
- Biểu mẫu: **MED.BMQL.27.04**

Sổ sách:

- + Sổ lưu quy trình xét nghiệm Hóa sinh, Miễn dịch.
- + Sổ lưu hướng dẫn sử dụng máy Hóa sinh, Miễn dịch.

XIV. Tài liệu tham khảo

- Tài liệu hướng dẫn sử dụng máy Architect.
- Tài liệu hướng dẫn sử dụng thuốc thử Folate của Abbott Architect.
- Các xét nghiệm thường quy áp dụng trong thực hành lâm sàng - NXB Y học (2013).

PHỤ LỤC 6

**Danh sách mẫu phân tích đối chứng bằng hai phương pháp realtime
PCR và giải trình tự gen MTHFR**

Mã	Kiểu gen Sequencing		Kiểu gen realtime	
	1298	677	1298	677
Nhóm chứng				
ĐTC10	AC	CC	AC	CC
ĐTC12	AA	TT	AA	TT
ĐTC14	AA	CC	AA	CC
ĐTC16	AC	CT	AC	CT
ĐTC18	AA	CC	AA	CC
ĐTC20	CC	CC	CC	CC
ĐTC22	AC	CC	AC	CC
ĐTC24	AC	CC	AC	CC
ĐTC26	AC	CC	AC	CC
ĐTC28	AA	CC	AA	CC
Nhóm bệnh				
ĐTB56	AA	CC	AA	CC
ĐTB58	AC	CT	AC	CT
ĐTB60	AA	TT	AA	TT
ĐTB62	AC	CT	AC	CT
ĐTB64	AC	CC	AC	CC
ĐTB66	AA	CT	AA	CT
ĐTB68	CC	CC	CC	CC
ĐTB70	AC	TT	AC	TT
ĐTB72	AC	CC	AC	CC
ĐTB74	AA	CC	AA	CC

PHỤ LỤC 7

Đánh giá ngưỡng cắt của nồng độ homocystein huyết thanh với dự đoán nguy cơ thai chết lưu tái diễn

ID	Cutoff	TPR	SPC	FPR	FNR	BAC	PPV	NPV	F1	d_distance	BM
1	0	1	0	1	0	0.5	0.5	NA	0.67	1	0
2	2.59	1	0.01	0.99	0	0.5	0.51	1	0.67	0.99	0.01
3	3.92	1	0.02	0.98	0	0.51	0.51	1	0.67	0.98	0.02
4	4.03	1	0.02	0.98	0	0.51	0.51	1	0.68	0.98	0.02
5	4.31	1	0.03	0.97	0	0.52	0.51	1	0.68	0.97	0.03
6	4.74	1	0.04	0.96	0	0.52	0.51	1	0.68	0.96	0.04
7	4.95	1	0.05	0.95	0	0.52	0.52	1	0.68	0.95	0.05
8	5.1	1	0.06	0.94	0	0.53	0.52	1	0.68	0.94	0.06
9	5.3	1	0.06	0.94	0	0.53	0.52	1	0.68	0.94	0.06
10	5.43	1	0.08	0.92	0	0.54	0.52	1	0.69	0.92	0.08
11	5.48	0.99	0.08	0.92	0.01	0.54	0.52	0.91	0.68	0.92	0.07
12	5.53	0.99	0.09	0.91	0.01	0.54	0.52	0.92	0.69	0.91	0.08
13	5.59	0.99	0.1	0.9	0.01	0.54	0.53	0.92	0.69	0.9	0.09
14	5.63	0.98	0.1	0.9	0.02	0.54	0.53	0.86	0.68	0.9	0.08
15	5.65	0.98	0.11	0.89	0.02	0.55	0.53	0.88	0.69	0.89	0.1
16	5.68	0.98	0.11	0.89	0.02	0.54	0.53	0.82	0.68	0.89	0.09
17	5.73	0.98	0.12	0.88	0.02	0.55	0.53	0.83	0.69	0.88	0.1
18	5.83	0.98	0.13	0.87	0.02	0.55	0.53	0.84	0.69	0.87	0.1
19	5.95	0.98	0.14	0.86	0.02	0.56	0.54	0.86	0.69	0.86	0.12
20	6.01	0.98	0.15	0.85	0.02	0.56	0.54	0.86	0.69	0.85	0.13
21	6.04	0.98	0.16	0.84	0.02	0.57	0.54	0.87	0.7	0.84	0.14
22	6.06	0.98	0.17	0.83	0.02	0.57	0.54	0.88	0.7	0.83	0.14
23	6.07	0.98	0.17	0.83	0.02	0.58	0.55	0.88	0.7	0.83	0.15
24	6.09	0.98	0.18	0.82	0.02	0.58	0.55	0.88	0.7	0.82	0.16
25	6.15	0.98	0.21	0.79	0.02	0.59	0.56	0.9	0.71	0.79	0.18

26	6.2	0.98	0.21	0.79	0.02	0.6	0.56	0.9	0.71	0.79	0.19
27	6.22	0.98	0.23	0.77	0.02	0.6	0.56	0.91	0.71	0.77	0.21
28	6.25	0.97	0.23	0.77	0.03	0.6	0.56	0.88	0.71	0.77	0.2
29	6.27	0.96	0.23	0.77	0.04	0.6	0.56	0.85	0.71	0.77	0.19
30	6.32	0.95	0.23	0.77	0.05	0.59	0.56	0.83	0.7	0.77	0.18
31	6.43	0.95	0.23	0.77	0.05	0.59	0.56	0.81	0.7	0.77	0.18
32	6.51	0.94	0.23	0.77	0.06	0.58	0.55	0.78	0.7	0.77	0.17
33	6.55	0.93	0.24	0.76	0.07	0.58	0.55	0.77	0.69	0.77	0.17
34	6.59	0.93	0.25	0.75	0.07	0.59	0.56	0.78	0.7	0.76	0.18
35	6.62	0.93	0.25	0.75	0.07	0.59	0.56	0.78	0.7	0.75	0.18
36	6.69	0.93	0.27	0.73	0.07	0.6	0.56	0.79	0.7	0.73	0.2
37	6.76	0.93	0.28	0.72	0.07	0.6	0.57	0.8	0.7	0.73	0.21
38	6.78	0.92	0.28	0.72	0.08	0.6	0.56	0.78	0.7	0.73	0.2
39	6.8	0.92	0.29	0.71	0.08	0.6	0.57	0.78	0.7	0.72	0.21
40	6.84	0.92	0.29	0.71	0.08	0.61	0.57	0.79	0.7	0.71	0.22
41	6.88	0.92	0.3	0.7	0.08	0.61	0.57	0.79	0.71	0.7	0.22
42	6.9	0.92	0.31	0.69	0.08	0.62	0.58	0.8	0.71	0.69	0.23
43	6.92	0.92	0.33	0.67	0.08	0.62	0.58	0.8	0.71	0.68	0.25
44	6.95	0.92	0.33	0.67	0.08	0.63	0.58	0.81	0.72	0.67	0.26
45	6.99	0.92	0.36	0.64	0.08	0.64	0.59	0.82	0.72	0.65	0.28
46	7.05	0.91	0.36	0.64	0.09	0.64	0.59	0.8	0.72	0.65	0.27
47	7.1	0.91	0.37	0.63	0.09	0.64	0.59	0.81	0.72	0.64	0.28
48	7.11	0.91	0.37	0.63	0.09	0.64	0.6	0.81	0.72	0.63	0.29
49	7.13	0.9	0.38	0.62	0.1	0.64	0.6	0.79	0.72	0.63	0.28
50	7.14	0.9	0.39	0.61	0.1	0.64	0.6	0.79	0.72	0.62	0.29
51	7.16	0.88	0.39	0.61	0.12	0.64	0.59	0.77	0.71	0.62	0.27
52	7.19	0.88	0.4	0.6	0.12	0.64	0.6	0.77	0.71	0.61	0.28
53	7.2	0.88	0.4	0.6	0.13	0.64	0.6	0.76	0.71	0.62	0.27
54	7.22	0.88	0.4	0.6	0.13	0.64	0.6	0.76	0.71	0.61	0.28
55	7.25	0.87	0.41	0.59	0.13	0.64	0.6	0.75	0.71	0.6	0.28

56	7.28	0.86	0.42	0.58	0.14	0.64	0.6	0.75	0.71	0.6	0.28
57	7.3	0.86	0.43	0.57	0.14	0.64	0.6	0.75	0.71	0.59	0.29
58	7.31	0.86	0.44	0.56	0.14	0.65	0.61	0.76	0.71	0.57	0.3
59	7.33	0.85	0.44	0.56	0.15	0.65	0.61	0.75	0.71	0.58	0.3
60	7.35	0.84	0.45	0.55	0.16	0.65	0.61	0.74	0.71	0.57	0.3
61	7.37	0.84	0.45	0.55	0.16	0.64	0.61	0.73	0.7	0.57	0.29
62	7.42	0.84	0.46	0.54	0.16	0.65	0.61	0.73	0.71	0.56	0.3
63	7.47	0.84	0.47	0.53	0.16	0.65	0.61	0.74	0.71	0.56	0.3
64	7.48	0.84	0.48	0.52	0.16	0.66	0.62	0.74	0.71	0.55	0.31
65	7.5	0.83	0.48	0.52	0.17	0.65	0.62	0.73	0.71	0.55	0.3
66	7.52	0.83	0.48	0.52	0.17	0.66	0.62	0.73	0.71	0.54	0.31
67	7.53	0.83	0.49	0.51	0.17	0.66	0.62	0.74	0.71	0.54	0.32
68	7.56	0.83	0.5	0.5	0.17	0.66	0.63	0.74	0.71	0.53	0.33
69	7.59	0.82	0.5	0.5	0.18	0.66	0.63	0.73	0.71	0.53	0.32
70	7.61	0.81	0.51	0.49	0.19	0.66	0.63	0.73	0.71	0.53	0.32
71	7.64	0.81	0.52	0.48	0.19	0.66	0.63	0.73	0.71	0.52	0.33
72	7.65	0.81	0.52	0.48	0.19	0.67	0.63	0.73	0.71	0.51	0.34
73	7.66	0.81	0.53	0.47	0.19	0.67	0.64	0.74	0.71	0.5	0.34
74	7.67	0.8	0.53	0.47	0.2	0.67	0.64	0.73	0.71	0.51	0.34
75	7.68	0.8	0.53	0.47	0.2	0.66	0.63	0.72	0.71	0.51	0.33
76	7.71	0.8	0.54	0.46	0.2	0.67	0.64	0.72	0.71	0.5	0.34
77	7.75	0.77	0.54	0.46	0.23	0.66	0.63	0.7	0.69	0.51	0.31
78	7.77	0.77	0.55	0.45	0.23	0.66	0.63	0.7	0.7	0.51	0.32
79	7.79	0.77	0.56	0.44	0.23	0.67	0.64	0.71	0.7	0.49	0.34
80	7.82	0.77	0.57	0.43	0.23	0.67	0.65	0.71	0.7	0.48	0.34
81	7.83	0.77	0.58	0.42	0.23	0.68	0.65	0.72	0.71	0.48	0.35
82	7.85	0.77	0.59	0.41	0.23	0.68	0.65	0.71	0.71	0.47	0.35
83	7.9	0.77	0.6	0.4	0.23	0.68	0.66	0.71	0.71	0.47	0.36
84	7.95	0.76	0.6	0.4	0.24	0.68	0.66	0.71	0.7	0.47	0.35
85	7.96	0.76	0.6	0.4	0.24	0.68	0.66	0.71	0.71	0.46	0.36

86	7.98	0.76	0.61	0.39	0.24	0.68	0.66	0.71	0.71	0.46	0.37
87	8.02	0.76	0.62	0.38	0.24	0.69	0.67	0.72	0.71	0.45	0.38
88	8.05	0.76	0.63	0.37	0.24	0.7	0.68	0.72	0.72	0.44	0.39
89	8.06	0.76	0.64	0.36	0.24	0.7	0.68	0.72	0.72	0.43	0.4
90	8.08	0.76	0.65	0.35	0.24	0.7	0.69	0.73	0.72	0.42	0.41
91	8.11	0.76	0.66	0.34	0.24	0.71	0.69	0.73	0.72	0.42	0.42
92	8.14	0.75	0.66	0.34	0.25	0.7	0.69	0.72	0.72	0.42	0.41
93	8.17	0.74	0.66	0.34	0.26	0.7	0.69	0.72	0.71	0.43	0.4
94	8.21	0.73	0.66	0.34	0.27	0.7	0.69	0.71	0.71	0.43	0.39
95	8.24	0.73	0.67	0.33	0.27	0.7	0.69	0.71	0.71	0.43	0.4
96	8.26	0.72	0.67	0.33	0.28	0.69	0.69	0.7	0.7	0.44	0.39
97	8.28	0.72	0.67	0.33	0.28	0.7	0.69	0.7	0.7	0.43	0.39
98	8.3	0.71	0.67	0.33	0.29	0.69	0.69	0.7	0.7	0.44	0.39
99	8.32	0.71	0.69	0.31	0.29	0.7	0.7	0.7	0.71	0.42	0.4
100	8.34	0.71	0.7	0.3	0.29	0.7	0.71	0.7	0.71	0.42	0.41
101	8.37	0.7	0.7	0.3	0.3	0.7	0.7	0.7	0.7	0.42	0.4
102	8.39	0.7	0.7	0.3	0.3	0.7	0.7	0.69	0.7	0.43	0.39
103	8.41	0.68	0.7	0.3	0.32	0.69	0.7	0.68	0.69	0.44	0.38
104	8.42	0.68	0.71	0.29	0.32	0.69	0.7	0.68	0.69	0.43	0.39
105	8.44	0.68	0.71	0.29	0.32	0.7	0.71	0.69	0.69	0.43	0.39
106	8.47	0.67	0.72	0.28	0.33	0.7	0.71	0.68	0.69	0.43	0.39
107	8.49	0.67	0.73	0.27	0.33	0.7	0.72	0.69	0.69	0.42	0.4
108	8.51	0.66	0.73	0.27	0.34	0.7	0.71	0.68	0.69	0.43	0.39
109	8.53	0.66	0.74	0.26	0.34	0.7	0.72	0.68	0.69	0.43	0.4
110	8.54	0.66	0.75	0.25	0.34	0.71	0.73	0.69	0.69	0.42	0.41
111	8.57	0.66	0.75	0.25	0.34	0.71	0.73	0.69	0.7	0.42	0.42
112	8.6	0.66	0.76	0.24	0.34	0.71	0.74	0.69	0.7	0.41	0.43
113	8.63	0.66	0.77	0.23	0.34	0.72	0.75	0.69	0.7	0.41	0.43
114	8.67	0.66	0.78	0.22	0.34	0.72	0.75	0.7	0.71	0.4	0.44
115	8.69	0.66	0.78	0.22	0.34	0.72	0.75	0.69	0.7	0.41	0.43

116	8.71	0.65	0.78	0.22	0.35	0.71	0.75	0.69	0.69	0.42	0.43
117	8.81	0.64	0.78	0.22	0.36	0.71	0.75	0.68	0.69	0.42	0.42
118	8.91	0.64	0.79	0.21	0.36	0.71	0.75	0.68	0.69	0.42	0.43
119	8.95	0.63	0.79	0.21	0.37	0.71	0.75	0.68	0.69	0.43	0.42
120	8.97	0.63	0.79	0.21	0.38	0.71	0.75	0.67	0.68	0.43	0.41
121	8.98	0.63	0.79	0.21	0.38	0.71	0.75	0.68	0.68	0.43	0.42
122	9	0.63	0.8	0.2	0.38	0.71	0.76	0.68	0.69	0.42	0.43
123	9.02	0.62	0.8	0.2	0.38	0.71	0.76	0.67	0.68	0.43	0.42
124	9.03	0.61	0.8	0.2	0.39	0.71	0.76	0.67	0.68	0.44	0.41
125	9.05	0.6	0.8	0.2	0.4	0.7	0.75	0.66	0.67	0.45	0.4
126	9.07	0.6	0.81	0.19	0.4	0.71	0.76	0.67	0.67	0.44	0.41
127	9.09	0.6	0.82	0.18	0.4	0.71	0.77	0.67	0.68	0.44	0.42
128	9.13	0.59	0.82	0.18	0.41	0.71	0.77	0.66	0.67	0.45	0.41
129	9.17	0.59	0.82	0.18	0.41	0.7	0.77	0.66	0.66	0.45	0.4
130	9.21	0.59	0.83	0.17	0.41	0.71	0.78	0.66	0.67	0.45	0.42
131	9.28	0.58	0.83	0.17	0.42	0.71	0.78	0.66	0.66	0.45	0.41
132	9.34	0.57	0.83	0.17	0.43	0.7	0.78	0.66	0.66	0.46	0.4
133	9.37	0.57	0.84	0.16	0.43	0.71	0.78	0.66	0.66	0.46	0.41
134	9.42	0.56	0.85	0.15	0.44	0.71	0.79	0.66	0.66	0.46	0.41
135	9.47	0.55	0.85	0.15	0.45	0.7	0.79	0.65	0.65	0.47	0.4
136	9.51	0.55	0.86	0.14	0.45	0.71	0.8	0.65	0.65	0.47	0.41
137	9.6	0.55	0.86	0.14	0.45	0.7	0.8	0.65	0.65	0.48	0.4
138	9.66	0.53	0.86	0.14	0.47	0.69	0.79	0.64	0.64	0.49	0.39
139	9.68	0.53	0.87	0.13	0.47	0.7	0.8	0.64	0.64	0.49	0.4
140	9.77	0.53	0.87	0.13	0.47	0.7	0.81	0.65	0.64	0.49	0.4
141	9.85	0.53	0.88	0.12	0.47	0.71	0.82	0.65	0.64	0.48	0.41
142	9.91	0.53	0.89	0.11	0.47	0.71	0.83	0.65	0.65	0.48	0.42
143	9.98	0.52	0.89	0.11	0.48	0.71	0.83	0.65	0.64	0.49	0.41
144	10.02	0.52	0.9	0.1	0.48	0.71	0.84	0.65	0.64	0.49	0.42
145	10.09	0.52	0.9	0.1	0.48	0.71	0.85	0.65	0.64	0.49	0.42

146	10.14	0.51	0.9	0.1	0.49	0.71	0.84	0.64	0.63	0.5	0.41
147	10.16	0.49	0.9	0.1	0.51	0.7	0.84	0.64	0.62	0.52	0.4
148	10.19	0.49	0.91	0.09	0.51	0.7	0.85	0.64	0.62	0.52	0.4
149	10.22	0.49	0.92	0.08	0.51	0.71	0.86	0.64	0.63	0.51	0.41
150	10.29	0.48	0.92	0.08	0.52	0.7	0.86	0.64	0.62	0.52	0.41
151	10.39	0.48	0.93	0.07	0.52	0.71	0.87	0.64	0.62	0.52	0.41
152	10.45	0.48	0.94	0.06	0.52	0.71	0.89	0.64	0.63	0.52	0.42
153	10.48	0.48	0.94	0.06	0.52	0.71	0.88	0.64	0.62	0.53	0.41
154	10.52	0.48	0.94	0.06	0.52	0.71	0.9	0.64	0.62	0.53	0.42
155	10.56	0.47	0.94	0.06	0.53	0.71	0.9	0.64	0.62	0.53	0.41
156	10.62	0.46	0.94	0.06	0.54	0.7	0.89	0.63	0.61	0.54	0.41
157	10.67	0.45	0.94	0.06	0.55	0.7	0.89	0.63	0.6	0.55	0.4
158	10.71	0.45	0.94	0.06	0.55	0.69	0.89	0.63	0.59	0.56	0.39
159	10.73	0.44	0.94	0.06	0.56	0.69	0.89	0.62	0.59	0.57	0.38
160	10.75	0.44	0.95	0.05	0.56	0.69	0.9	0.63	0.59	0.56	0.39
161	10.81	0.43	0.95	0.05	0.57	0.69	0.9	0.62	0.58	0.57	0.38
162	10.9	0.42	0.96	0.04	0.58	0.69	0.92	0.62	0.58	0.58	0.38
163	10.95	0.41	0.96	0.04	0.59	0.69	0.91	0.62	0.57	0.59	0.37
164	10.98	0.41	0.96	0.04	0.59	0.68	0.91	0.61	0.56	0.6	0.37
165	11.07	0.4	0.96	0.04	0.6	0.68	0.91	0.61	0.55	0.6	0.36
166	11.17	0.4	0.97	0.03	0.6	0.68	0.93	0.61	0.56	0.6	0.37
167	11.19	0.39	0.97	0.03	0.61	0.68	0.93	0.61	0.55	0.61	0.36
168	11.35	0.38	0.97	0.03	0.62	0.68	0.92	0.61	0.54	0.62	0.35
169	11.51	0.38	0.97	0.03	0.63	0.67	0.92	0.6	0.53	0.63	0.34
170	11.62	0.38	0.98	0.02	0.63	0.68	0.94	0.61	0.54	0.63	0.35
171	11.75	0.37	0.98	0.02	0.63	0.67	0.94	0.6	0.53	0.63	0.34
172	11.79	0.36	0.98	0.02	0.64	0.67	0.94	0.6	0.52	0.64	0.34
173	11.84	0.35	0.98	0.02	0.65	0.66	0.94	0.6	0.51	0.65	0.33
174	11.95	0.35	0.98	0.02	0.65	0.67	0.96	0.6	0.51	0.65	0.34
175	12.16	0.35	0.99	0.01	0.65	0.67	0.98	0.6	0.52	0.65	0.34

176	12.3	0.34	0.99	0.01	0.66	0.67	0.98	0.6	0.51	0.66	0.34
177	12.34	0.34	0.99	0.01	0.66	0.66	0.98	0.6	0.5	0.66	0.33
178	12.37	0.33	0.99	0.01	0.67	0.66	0.98	0.59	0.49	0.67	0.32
179	12.4	0.33	1	0	0.67	0.66	1	0.59	0.49	0.67	0.33
180	12.43	0.32	1	0	0.68	0.66	1	0.59	0.49	0.68	0.32
181	12.49	0.31	1	0	0.69	0.66	1	0.59	0.48	0.69	0.31
182	12.53	0.3	1	0	0.7	0.65	1	0.59	0.47	0.7	0.3
183	12.58	0.3	1	0	0.7	0.65	1	0.58	0.46	0.7	0.3
184	12.65	0.29	1	0	0.71	0.64	1	0.58	0.45	0.71	0.29
185	12.67	0.28	1	0	0.72	0.64	1	0.58	0.44	0.72	0.28
186	12.68	0.27	1	0	0.73	0.64	1	0.58	0.43	0.73	0.27
187	12.73	0.27	1	0	0.73	0.63	1	0.57	0.42	0.73	0.27
188	12.82	0.26	1	0	0.74	0.63	1	0.57	0.41	0.74	0.26
189	12.91	0.25	1	0	0.75	0.63	1	0.57	0.4	0.75	0.25
190	13.01	0.24	1	0	0.76	0.62	1	0.57	0.39	0.76	0.24
191	13.08	0.23	1	0	0.77	0.62	1	0.56	0.38	0.77	0.23
192	13.15	0.23	1	0	0.77	0.61	1	0.56	0.37	0.77	0.23
193	13.38	0.22	1	0	0.78	0.61	1	0.56	0.36	0.78	0.22
194	13.56	0.21	1	0	0.79	0.61	1	0.56	0.35	0.79	0.21
195	13.58	0.2	1	0	0.8	0.6	1	0.55	0.34	0.8	0.2
196	13.85	0.2	1	0	0.8	0.6	1	0.55	0.33	0.8	0.2
197	14.37	0.19	1	0	0.81	0.59	1	0.55	0.32	0.81	0.19
198	14.66	0.18	1	0	0.82	0.59	1	0.55	0.3	0.82	0.18
199	14.87	0.17	1	0	0.83	0.59	1	0.54	0.29	0.83	0.17
200	15.63	0.16	1	0	0.84	0.58	1	0.54	0.28	0.84	0.16
201	16.29	0.16	1	0	0.84	0.58	1	0.54	0.27	0.84	0.16
202	16.44	0.15	1	0	0.85	0.57	1	0.54	0.26	0.85	0.15
203	16.54	0.14	1	0	0.86	0.57	1	0.53	0.25	0.86	0.14
204	16.68	0.13	1	0	0.87	0.57	1	0.53	0.23	0.87	0.13
205	16.85	0.13	1	0	0.88	0.56	1	0.53	0.22	0.88	0.13

206	16.96	0.12	1	0	0.88	0.56	1	0.53	0.21	0.88	0.12
207	17.55	0.11	1	0	0.89	0.55	1	0.53	0.2	0.89	0.11
208	18.31	0.1	1	0	0.9	0.55	1	0.52	0.18	0.9	0.1
209	18.68	0.09	1	0	0.91	0.55	1	0.52	0.17	0.91	0.09
210	19.09	0.09	1	0	0.91	0.54	1	0.52	0.16	0.91	0.09
211	19.5	0.08	1	0	0.92	0.54	1	0.52	0.14	0.92	0.08
212	20.07	0.07	1	0	0.93	0.54	1	0.51	0.13	0.93	0.07
213	21.22	0.06	1	0	0.94	0.53	1	0.51	0.12	0.94	0.06
214	22.32	0.05	1	0	0.95	0.53	1	0.51	0.1	0.95	0.05
215	22.8	0.05	1	0	0.95	0.52	1	0.51	0.09	0.95	0.05
216	23.27	0.04	1	0	0.96	0.52	1	0.51	0.08	0.96	0.04
217	23.94	0.03	1	0	0.97	0.52	1	0.5	0.06	0.97	0.03
218	27.85	0.02	1	0	0.98	0.51	1	0.5	0.05	0.98	0.02
219	35.48	0.02	1	0	0.98	0.51	1	0.5	0.03	0.98	0.02
220	43.97	0.01	1	0	0.99	0.5	1	0.5	0.02	0.99	0.01
221	Inf	0	1	0	1	0.5	NA	0.5	NA	1	0