

không đáp ứng với adalimumab ở bệnh nhân VCSDK.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Ulus Y, Akyol Y, Bilgici A, Kuru O.** Association of work instability with fatigue and emotional status in patients with ankylosing spondylitis: comparison with healthy controls. *Clin Rheumatol.* 2019; 38(4):1017-1024. doi:10.1007/s10067-018-4366-x
2. **Ward MM, Deodhar A, Gensler LS, et al.** 2019 Update of the American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network Recommendations for the Treatment of Ankylosing Spondylitis and Nonradiographic Axial Spondyloarthritis. *Arthritis Care Res.* 2019;71(10): 1285-1299. doi:10.1002/acr.24025
3. **Liu W, Wu Y hao, Zhang L, et al.** Efficacy and safety of TNF- α inhibitors for active ankylosing spondylitis patients: Multiple treatment comparisons in a network meta-analysis. *Sci Rep.* 2016;6:32768. doi:10.1038/srep32768
4. **Deodhar A, Yu D.** Switching tumor necrosis factor inhibitors in the treatment of axial spondyloarthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2017;47(3):3 43-350. doi:10.1016/j.semarthrit.2017.04.005
5. **Alazmi M, Sari I, Krishnan B, Inman RD, Haroon N.** Profiling Response to Tumor Necrosis Factor Inhibitor Treatment in Axial Spondyloarthritis. *Arthritis Care Res.* 2018;70(9): 1393-1399. doi: 10.1002/acr.23465
6. **Wang R, Dasgupta A, Ward MM.** Predicting Probability of Response to Tumor Necrosis Factor Inhibitors for Individual Patients With Ankylosing Spondylitis. *JAMA Netw Open.* 2022;5(3): e222312. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.2312
7. **Kneepkens EL, Wei JCC, Nurmohamed MT, et al.** Immunogenicity, adalimumab levels and clinical response in ankylosing spondylitis patients during 24 weeks of follow-up. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(2): 396-401. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204185

XÂY DỰNG QUY TRÌNH REAL-TIME PCR HIGH RESOLUTION MELTING XÁC ĐỊNH BIẾN THỂ DPYD*2A TRÊN GEN DYPD LIÊN QUAN CHUYỂN HOÁ THUỐC FLUOROPYRIMIDINES

Nguyễn Ước Nguyễn^{1,2}, Nguyễn Minh Hà¹, Ngô Quốc Đạt², Nguyễn Hưng Thịnh¹, Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn¹

TÓM TẮT

Giới thiệu: Biến thể di truyền DPYD*2A trên gen DYPD gây ra sự suy giảm chức năng enzyme dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), ảnh hưởng mạnh mẽ đến quá trình chuyển hoá thuốc fluoropyrimidines trong tế bào cũng như sự tích lũy độc tính, đe dọa tính mạng người dùng. Hiệp hội Dược Di truyền (CPIC) đã khuyến cáo rằng các bệnh nhân cần được thực hiện xét nghiệm xác định biến thể DPYD*2A trước khi tiếp nhận điều trị với fluoropyrimidines. Hiện nay, các xét nghiệm kỹ thuật phân tử đóng vai trò quan trọng trong xác định biến thể di truyền, tuy nhiên, do chi phí thực hiện còn cao, nhiều bệnh nhân chưa thể dễ dàng tiếp cận và thực hiện. Vấn đề này cũng dẫn đến sự chần chừ và trì hoãn của các bác sĩ lâm sàng trong việc ra chỉ định xét nghiệm và điều chỉnh liều fluoropyrimidine ban đầu. Việc xây dựng một quy trình kỹ thuật phân tử tiện lợi, tiết kiệm thời gian, với mức giá phải chăng và vẫn đảm bảo độ tin cậy cao như real-time PCR High resolution melting (HRM) xác định biến thể DPYD*2A

là kịp thời và cần thiết trong hỗ trợ bác sĩ lâm sàng quản lý hiệu quả tình trạng ngộ độc fluoropyrimidines cũng như giúp bệnh nhân ung thư loại bỏ gánh nặng kinh tế khi thực hiện xét nghiệm di truyền. **Mục tiêu:** Xây dựng quy trình real-time PCR HRM xác định biến thể DPYD*2A trên gen DYPD liên quan chuyển hoá fluoropyrimidines. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Xây dựng các DNA plasmid chứng giả lập các kiểu gen biến thể DPYD*2A bằng phương pháp tạo đột biến có định hướng và tạo dòng từ chính mẫu máu người tình nguyện tham gia nghiên cứu. Ứng dụng phần mềm tin-sinh học thiết kế cặp đoạn mồi và tiến hành đánh giá độ đặc hiệu đoạn mồi đã thiết kế khi tham gia phản ứng khuếch đại vùng gen DYPD quan tâm. Tiến hành đánh giá độ chính xác và khả năng phân biệt tốt các kiểu gen biến thể DPYD*2A. **Kết quả:** Đã tạo thành công DNA plasmid alen G (wild-type) và alen A (biến thể) để đóng vai trò là các mẫu chứng kiểu gen biến thể DPYD*2A. Đã xây dựng thành công quy trình real-time PCR HRM xác định biến thể DPYD*2A trên gen DYPD, cụ thể: (i) Quy trình xây dựng có khả năng phân biệt thành công 3 loại kiểu gen khi phân tích bằng biểu đồ derivative melt curves, aligned melt curves và difference plot; (ii) Quy trình xây dựng có kết quả T_m đạt độ chụm cao khi phân tích với DNA plasmid chứng với %CV từ 0,05 đến 0,06%. **Kết luận:** Quy trình xây dựng được có thể đưa vào ứng dụng xác định biến thể DPYD*2A trong nghiên cứu. Bước đầu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử để khảo sát đặc điểm di truyền DPYD*2A ở quần thể

¹Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

²Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn

Email: nhntuan@pnt.edu.vn

Ngày nhận bài: 4.10.2023

Ngày phản biện khoa học: 14.11.2023

Ngày duyệt bài: 14.12.2023

người Việt Nam. **Từ khoá:** DPYD, DPYD*2A, real-time PCR High resolution melting, tạo dòng gen, tạo đột biến có định hướng.

SUMMARY

ESTABLISHING THE REAL-TIME PCR HIGH RESOLUTION MELTING PROCEDURE FOR DETERMINING GENE DPYD VARIANT DPYD*2A ASSOCIATED WITH FLUOROPYRIMIDINES METABOLISM

Introduction: A single nucleotide polymorphism in the DPYD gene, DPYD*2A, which leads to a deficiency of the fluoropyrimidines metabolizing enzyme dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), is strongly associated with fluoropyrimidine-induced severe and life-threatening toxicity. The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) has recommended cancer patients should be identified the variant DPYD*2A before being treated with fluoropyrimidines. Despite the necessity of determining the DPYD*2A variant in individual fluoropyrimidines dose adjustment, due to its high price, most of patients cannot easily afford for genetic examinations. This disadvantageous may lead to the hesitation and procrastination in indicating molecular testing and in adjusting the fluoropyrimidines starting dose in clinical. In order to overcome the drawback, establishing a convenient, time-saving, affordable and reliable molecular procedure, real-time PCR high resolution melting (HRM), to identify the DPYD*2A variant is timely and crucial not only for medical administrations to efficiently manage the fluoropyrimidine poisoning situations but also for cancer patients to relieve economic burden of genetic examinations. **Objective:** Establishing a molecular procedure using real-time PCR HRM to identify the DPYD*2A variant. **Method:** Constructing the control recombinant plasmids to simulate the DPYD*2A variant genotypes by performing site-directed mutagenesis using overlap extension PCR and gene cloning method. Utilizing bio-informatics softwares to design a pair of primers amplifying the target DPYD gene sequence and verifying its specificity in practical laboratory condition. Evaluating the accuracy and the ability of the established real-time PCR HRM procedure in discriminating each of the DPYD*2A genotypes. **Result:** Successfully constructed recombinant plasmids containing G allele (wild-type) and A allele (DPYD*2A) to serve as genotype control samples. Successfully established a real-time PCR HRM procedure identifying the DPYD*2A variant with: (i) High discriminability of DPYD genotypes when using derivative melt curves, aligned melt curves and difference plot to analyze the PCR product melting temperature; (ii) High accuracy of T_m value with %CV from 0.05 to 0.06%. **Conclusion:** The established procedure could be applied to identify DPYD*2A variant in research. Initially applying this procedure to investigate the genetic characteristics and the frequency of DPYD*2A in the Vietnamese population.

Keywords: DPYD, DPYD*2A, real-time PCR High resolution melting, gene cloning, site directed mutagenesis, PCR overlap extension.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Biến thể DPYD*2A trên gen DPYD là nguyên nhân gây tử vong thường gặp trong tình trạng ngộ độc fluoropyrimidines do di truyền. Biến đổi đa hình DPYD*2A (hay c.1905+1G>A), làm thay đổi nucleotide G thành A, dẫn đến phân tử mRNA trưởng thành bị mất hoàn toàn exon 14.¹ Hậu quả của sự biến đổi tạo ra sản phẩm protein DPD bất thường cấu trúc, không còn hoạt tính chuyển hóa fluoropyrimidine, dẫn đến tích lũy độc tính cũng như đe dọa tính mạng bệnh nhân. Hiệp hội Dược Di truyền (CPIC) khuyến cáo các bệnh nhân cần được xác định kiểu gen biến thể DPYD*2A trước khi điều trị bằng fluoropyrimidine². Để góp phần quản lý tốt tình trạng ngộ độc trên, việc xây dựng quy trình kỹ thuật tin cậy và thuận tiện để chẩn đoán biến thể DPYD*2A là nhu cầu được đặt ra.

Giải trình tự Sanger được xem là phương pháp tiêu chuẩn vàng trong xác định các biến thể di truyền³. Tuy nhiên, việc áp dụng xét nghiệm bằng phương pháp này một cách có hệ thống cho mọi bệnh nhân có nhu cầu sử dụng fluoropyrimidines gặp rào cản về chi phí.

Ở bối cảnh biến thể DPYD*2A được quan sát thấy có tần suất rất thấp trong dân số chung, đặc biệt là ở các chủng tộc người không phải da trắng,⁴ chi phí để chẩn đoán được một người mang biến thể DPYD*2A là cao. Điều này thậm chí tác động tiêu cực đến việc chỉ định xét nghiệm tìm biến thể DPYD*2A trong thực hành lâm sàng thường quy. Sàng lọc biến thể DPYD*2A dựa trên kỹ thuật real-time PCR kết hợp phân tích HRM (high resolution melting) có thể là một bước đệm hợp lý vì kỹ thuật này đơn giản, tiết kiệm thời gian, có độ tin cậy cao và nếu so với phương pháp giải trình tự Sanger thì có chi phí thấp hơn khoảng 50%. Theo cách tiếp cận này, chỉ những bệnh nhân nghi ngờ mang biến thể mới cần được chẩn đoán xác định bằng giải trình tự Sanger. Chúng tôi cho rằng chiến lược này rất phù hợp với tình hình thực tiễn tại Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng là người trưởng thành đến khám sức khỏe tại Phòng khám Đa khoa Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch và tình nguyện tham gia nghiên cứu.

Các bước tiến hành nghiên cứu. Xây dựng bộ DNA plasmid chứng cho kỹ thuật real-time PCR HRM khảo sát kiểu gen biến thể DPYD*2A

✚ Xây dựng DNA plasmid chứng mang alen G (wild-type): thiết kế đoạn mỗi khuếch đại vùng gen DPYD kiểu gen wild-type của biến thể DPYD*2A (alen G) bằng công cụ Primer-BLAST (NCBI). Thực hiện phản ứng PCR tạo sản phẩm đặc hiệu bằng bộ sinh phẩm Mytaq Red Mix (Bioline). Thực hiện tạo dòng bằng phương pháp TA cloning, sử dụng bộ sinh phẩm TOPO TA cloning kit (Invitrogen). Kết quả tạo dòng DNA plasmid chứng được khẳng định bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit, ABI 3500 genetic analyzer, Applied Biosystems). Các bước thực hiện tuân thủ hướng dẫn sử dụng nhà sản xuất.

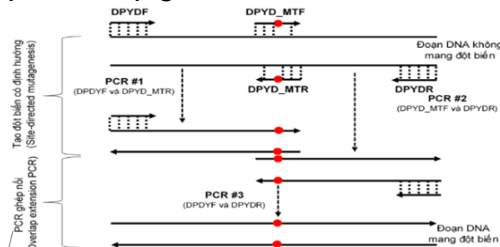
✚ Xây dựng DNA plasmid chứng mang alen A (biến thể DPYD*2A): thực hiện kỹ thuật tạo đột biến điểm có định hướng (site-directed mutagenesis) bằng phương pháp PCR overlap extension. Mô hình thiết kế phản ứng với vị trí đoạn mỗi như hình 1. Thực hiện các phản ứng PCR#1 và PCR#2 bằng bộ sinh phẩm Mytaq Red Mix (Bioline). Sản phẩm được dùng làm mạch khuôn cho phản ứng ghép nối ở phản ứng PCR#3:

- Thành phần: Mytaq Red Mix 1X; nồng độ cặp mỗi DPYDF và DPYDR là 0,4µM, lượng sản phẩm PCR#1 và PCR#2 khoảng 50-100 ng; ddH₂O đến đủ 25 µL phản ứng.

- Chương trình nhiệt: 94°C trong 2 phút; 94°C trong 15 giây, 53°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây (10 chu kỳ); 72°C trong 1 phút; giữ ở 4°C. Đánh giá sản phẩm PCR bằng điện di gel agarose 1,5%.

Sản phẩm PCR#3 được tái tổ hợp vào plasmid bằng sinh phẩm TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Kết quả tạo dòng DNA plasmid chứng được khẳng định bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit, ABI 3500 genetic analyzer, Applied Biosystems). Các bước thực hiện tuân thủ hướng dẫn sử dụng nhà sản xuất.

Để giả lập kiểu gen dị hợp tử, hoà trộn plasmid wild-type và plasmid mang biến thể với tỉ lệ 1:1 về lượng.



Hình 1. Mô hình thiết kế các đoạn mỗi tạo

đột biến có định hướng trên gen DPYD⁵

DPYDF và DPYDR là cặp đoạn mỗi đã thiết kế để tạo đoạn DNA chèn, DPYD_MTR và DPYD_MTF là cặp đoạn mỗi dùng để tạo đột biến điểm có định hướng với vị trí tạo đột biến đã xác định có nucleotide loại G/C (thể wild-type) biến đổi thành A/T (biến thể DPYD*2A)

Xây dựng quy trình real-time PCR HRM khảo sát kiểu gen biến thể DPYD*2A

✚ Thiết kế và thử nghiệm độ đặc hiệu đoạn mỗi sử dụng trong real-time PCR HRM

Sử dụng công cụ Primer-BLAST (NCBI)⁶ và dữ liệu gen DPYD bộ gen người (NC_000001.11) để thiết kế cặp đoạn mỗi đặc hiệu trong quy trình real-time PCR HRM (kí hiệu HRMF và HRMR). Tiêu chí thiết kế: (i) Sản phẩm khuếch đại từ 80-110 bp; (ii) Sự chênh lệch nhiệt độ nóng chảy (T_m) sản phẩm khuếch đại giữa kiểu gen đồng hợp wild-type và biến thể DPYD*2A phải ít nhất 0,5°C khi ước tính bằng công cụ Umelt⁷.

Thực hiện phản ứng real-time PCR HRM với mẫu DNA bộ gen người tình nguyện có kiểu gen wild-type (MeltDoctor HRM Master Mix kit, Applied Biosystems).

- Thành phần: MeltDoctor HRM Master Mix 1X; nồng độ từng đoạn mỗi HRMF và HRMR là 0,3 µM; DNA bộ gen người 20 ng; ddH₂O cho đến đủ 20 µL phản ứng.

- Chương trình nhiệt trên thiết bị QuantStudio 5 (Applied Biosystems): 95°C trong 10 phút; 95°C trong 15 giây, 60°C trong 1 phút (lặp lại 40 chu kỳ); phân tích đường cong nóng chảy từ 60°C đến 95°C, 0,025°C/s (1 chu kỳ).

Độ đặc hiệu phản ứng real-time PCR HRM được đánh giá bằng cách:

- Phân tích biểu đồ derivative melt curves bằng phần mềm High Resolution Melting software v3.2 (Applied Biosystems) thấy sản phẩm real-time PCR chỉ xuất hiện một đỉnh nóng chảy duy nhất.

- Điện di mao quản sản phẩm real-time PCR trên hệ thống Labchip GX touch nucleic acid analyzer (PerkinElmer) thấy điện di đồ chỉ xuất hiện một đỉnh sản phẩm có độ dài như ước tính khuếch đại.

✚ Đánh giá khả năng khảo sát kiểu gen biến thể DPYD*2A bằng quy trình real-time PCR HRM

Thực hiện phản ứng real-time PCR HRM với bộ DNA plasmid chứng đã tạo. Mỗi loại plasmid chứng của mỗi kiểu gen, thực hiện 3 lần để đánh giá độ lặp lại và tiếp tục thực hiện thêm 3 mẻ phản ứng để đánh giá độ tái lập. Với %CV nhỏ hơn 11% là mức cho phép của thiết bị QuantStudio 5 (Applied Biosystems)⁸.

Sử dụng biểu đồ derivative melt curves, aligned melt curves và difference plot trên phần mềm phân tích High Resolution Melting software v3.2 (Applied Biosystems) để đánh giá khả năng phân biệt các kiểu gen biến thể DPYD*2A. Với kết quả nhiệt độ nóng chảy trung bình của từng loại kiểu gen, sử dụng phép kiểm One-way

ANOVA ($\alpha=0,05$) để đánh giá sự khác biệt nhiệt độ nóng chảy đại diện từng loại kiểu gen có ý nghĩa thống kê.

Đạo đức trong nghiên cứu: Chứng nhận chấp thuận đạo đức trong nghiên cứu y sinh số 790/HĐĐĐ-ĐHYD ngày 26 tháng 10 năm 2022 Đại học Y dược TP. HCM.

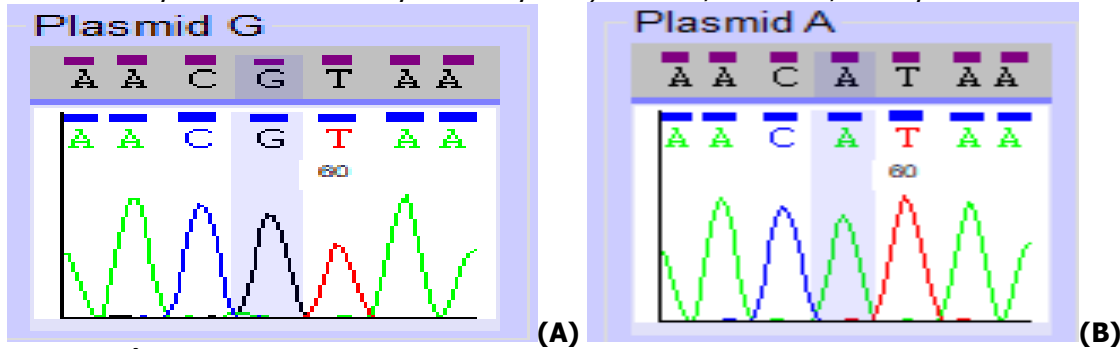
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Xây dựng bộ DNA plasmid chứng cho kỹ thuật real-time PCR HRM khảo sát kiểu gen biến thể DPYD*2A

Bảng 1. Thông tin các đoạn mồi trong thí nghiệm xây dựng bộ DNA plasmid chứng

| Mục đích | Phản ứng | Đoạn mồi | Trình tự (5'-3') | Tm (°C) | Độ dài (nucleotide) | GC (%) | Sản phẩm (bp) |
|--|----------|----------|-----------------------------|---------|---------------------|--------|---------------|
| A. Xây dựng DNA plasmid chứng kiểu gen wild-type biến thể DPYD*2A | | | | | | | |
| Tạo DNA chèn | PCR | DPYDF | TACCAGCCACATACAGTG | 58.41 | 18 | 50 | 580 |
| | | DPYDR | AATGTGAGAAGGGACCTC | 58.10 | 18 | 50 | |
| B. Xây dựng DNA plasmid chứng mang biến thể DPYD*2A | | | | | | | |
| Tạo đột biến | PCR #1 | DPYDF | TACCAGCCACATACAGTG | 58,4 | 18 | 50 | 319 |
| | | DPYD_MTR | CTTTCCAGACAACA*TAAGTGTGATT | 57,8 | 25 | 36 | |
| | PCR #2 | DPYD_MTF | AATCACA CTTAT*GTTGTCTGGAAAG | 57,8 | 25 | 36 | 286 |
| | | DPYDR | AATGTGAGAAGGGACCTC | 58,1 | 18 | 50 | |
| Nối ghép | PCR#3 | DPYDF | TACCAGCCACATACAGTG | 58.41 | 18 | 50 | 580 |
| | | DPYDR | AATGTGAGAAGGGACCTC | 58.10 | 18 | 50 | |

*:Trình tự nucleotide trên đoạn mồi được thay đổi từ G/C thành A/T để tạo biến thể DPYD*2A



Hình 2. Biểu đồ tín hiệu giải trình tự Sanger trên DNA plasmid mang alen G (wild-type) (A) và loại mang alen A (biến thể DPYD*2A) (B)

Kết quả hình 2 cho thấy đã xây dựng thành công bộ DNA plasmid chứng mang alen G (wild-type) và loại có mang alen A (biến thể DPYD*2A).

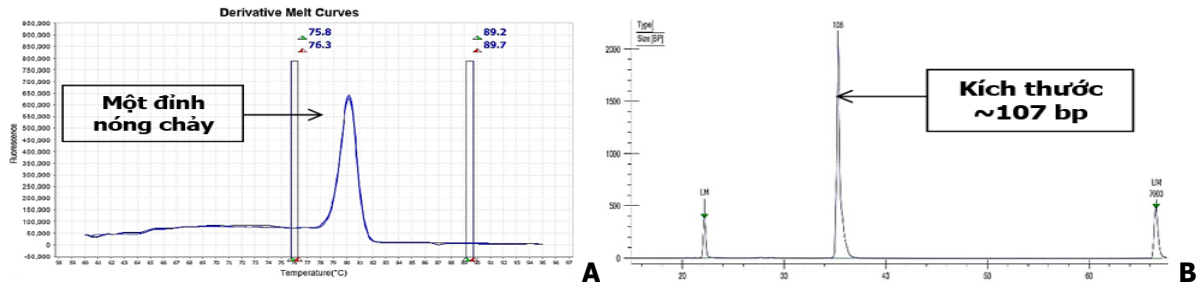
Xây dựng quy trình real-time PCR HRM khảo sát kiểu gen biến thể DPYD*2A

Bảng 2. Thông tin đoạn mồi sử dụng trong quy trình real-time PCR HRM

| Phản ứng | Đoạn mồi | Trình tự (5'-3') | Tm (°C) | Độ dài (nucleotide) | GC (%) | Sản phẩm (bp) |
|-------------------|----------|---------------------------|---------|---------------------|--------|---------------|
| Real-time PCR HRM | HRMF | ATTCACCAACTTATGCCAATTCTCT | 59,1 | 25 | 36 | 107 |
| | HRMR | CGGCTGCATATTGGTGTCAAA | 59,5 | 21 | 48 | |

Kết quả đánh giá độ đặc hiệu đoạn mồi thiết kế thấy: (i) Biểu đồ derivative melt curves chỉ xuất hiện một đỉnh nóng chảy duy nhất, không xuất hiện các đỉnh sóng không đặc hiệu (hình 3A); (ii) Điện di đồ chỉ thấy xuất hiện một đỉnh sản phẩm đặc hiệu có độ dài ~107 bp, tương

đương ước tính khuếch đại, đồng thời không xuất hiện các sản phẩm phụ khác trong phản ứng (hình 3B). Như vậy, nhóm nghiên cứu đã thiết kế thành công đoạn mồi đặc hiệu cho quy trình real-time PCR HRM.



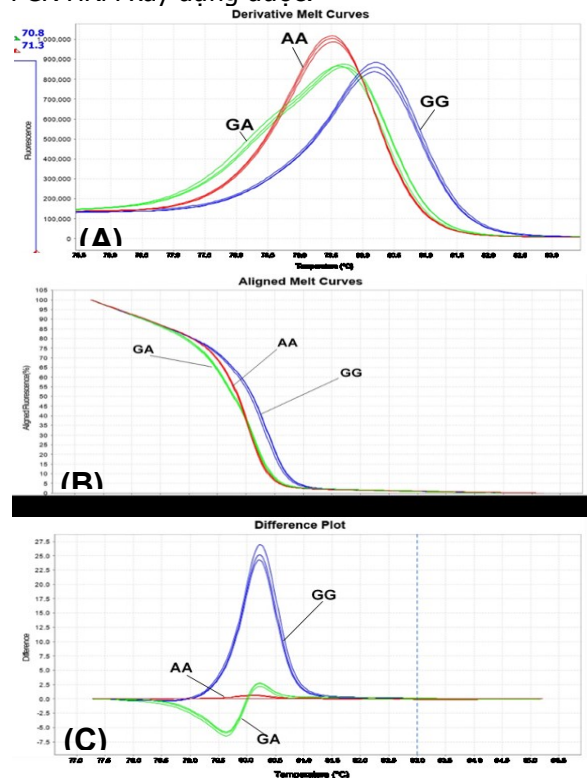
Hình 3. Kết quả phân tích đường cong nóng chảy (A) và điện di mao quản sản phẩm real-time PCR (B)

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ chính xác quy trình real-time PCR HRM xây dựng

| Kiểu gen | GG | | | AG | | | AA | | |
|--------------------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Mé | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| T _{m1} (°C) | 80,2 | 80,2 | 80,2 | 79,7 | 79,8 | 79,7 | 79,5 | 79,5 | 79,5 |
| T _{m2} (°C) | 80,2 | 80,2 | 80,2 | 79,7 | 79,7 | 79,8 | 79,5 | 79,5 | 79,5 |
| T _{m3} (°C) | 80,2 | 80,1 | 80,1 | 79,7 | 79,7 | 79,7 | 79,6 | 79,5 | 79,6 |
| T _m trung bình (°C) | 80,2 | 80,17 | 80,17 | 79,70 | 79,73 | 79,73 | 79,53 | 79,50 | 79,53 |
| SD môi mé | 0,00 | 0,05 | 0,05 | 0,00 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| CV% môi mé (%) | 0,00 | 0,06 | 0,06 | 0,00 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,00 | 0,06 |
| T _m trung bình chung (°C) | 80,18 | | | 79,72 | | | 79,52 | | |
| SD chung | 0,04 | | | 0,04 | | | 0,04 | | |
| CV% chung (%) | 0,05 | | | 0,05 | | | 0,05 | | |
| p-value | 0,0001 (< 0,05) | | | | | | | | |

Chỉ số CV% trong cùng một mẻ phản ứng và trong ba mẻ cùng một loại kiểu gen đều cho kết quả nhỏ hơn 11% (0,05-0,06%), quy trình xây dựng có độ lặp và độ tái lập giá trị T_m rất tốt khi đánh giá trên plasmid (bảng 3). Sử dụng phép kiểm One-way ANOVA ($\alpha = 0,05$) thấy sự khác biệt về nhiệt độ nóng chảy trung bình (T_m) của ba loại kiểu gen có ý nghĩa thống kê với p-value < 0,0001 (bảng 3). T_m của kiểu gen GG (80,18°C) và AA (79,52°C) chênh lệch trung bình 0,66°C. Kết quả chênh lệch giá trị T_m thỏa tiêu chuẩn đạt ra, đủ nhận biết sự khác biệt đặc điểm kiểu gen GG và AA khi phân tích bằng các dạng biểu đồ nóng chảy. Khi phân tích biểu đồ derivative melt curves và aligned melt curves thấy có sự khác biệt rõ rệt giá trị T_m sản phẩm PCR kiểu gen đồng hợp wild-type (GG) và đồng hợp biến thể DPYD*2A (AA), đồng thời kiểu gen dị hợp (GA) có hình dạng đường cong đặc trưng và khác biệt hoàn toàn so với dạng đường cong kiểu gen đồng hợp (hình 4A,B). Ngoài ra, khi phân tích biểu đồ difference plot, ghi nhận các đường cong nóng chảy từng nhóm kiểu gen khác nhau thì có sự tách biệt rất rõ ràng. Khi quan sát đường cong nóng chảy trong cùng nhóm kiểu gen, ghi nhận thấy tính đồng nhất về đặc điểm đường cong (hình 4C). Kết quả từ biểu đồ difference plot thể hiện tính đồng nhất kết quả trong mẻ phản ứng và khả năng phân biệt tốt các kiểu gen DPYD*2A của quy trình real-time

PCR HRM xây dựng được.



Hình 4. Biểu đồ loại derivative melt curves (A), aligned melt curves (B) và difference plot (C) phân biệt 3 loại kiểu gen biến thể DPYD*2A

IV. BÀN LUẬN

Phương pháp real-time PCR High Resolution Melting là sự kết hợp của kỹ thuật real-time PCR và phân tích đường cong nóng chảy (HRM). Dựa vào nguyên lý các sản phẩm PCR khác nhau với đặc điểm chiều dài, trình tự nucleotide, hàm lượng GC khác nhau sẽ có điểm nóng chảy khác nhau, do đó khi phân tích đường cong nóng chảy sản phẩm PCR có thể xác định được kiểu gen của biến thể quan tâm.

Với bộ DNA plasmid chúng đã xây dựng, nhóm nghiên cứu đã đánh giá chất lượng quy trình xây dựng bao gồm độ chụm và độ đúng. Trong thí nghiệm đánh giá độ chụm kết quả T_m , kết quả CV% của độ lặp lại và độ tái lập lần lượt là 0,05% và 0,06% ($\leq 11\%$), như vậy quy trình real-time PCR HRM xây dựng có độ chụm giá trị $T_m(^{\circ}C)$ tốt. Trong thí nghiệm đánh giá độ đúng, khi áp dụng phép kiểm One-way ANOVA đánh giá sự khác biệt T_m của 3 kiểu gen giả lập từ bộ DNA plasmid chúng, nhóm nghiên cứu kết luận được sự khác có ý nghĩa thống kê (với p-value < 0,0001). Bên cạnh đó, khi tiến hành đánh giá trên biểu đồ derivative melt curves, aligned melt curves và difference plot nhóm nghiên cứu quan sát thấy biểu đồ thể hiện sự khác biệt rõ ràng đỉnh nóng chảy và hình dạng đường cong nóng chảy của ba loại kiểu gen. Như vậy, quy trình xây dựng có khả năng phân biệt tốt ba loại kiểu gen biến thể DPYD*2A thông qua kết quả đánh giá trên DNA plasmid.

Việc xây dựng thành công DNA plasmid là bước thí nghiệm quan trọng và cần thiết trong quá trình xây dựng quy trình real-time PCR HRM chẩn đoán biến thể DPYD*2A. Thông qua trình tự nucleotide trên DNA plasmid, chúng tôi có thể đánh giá độ chụm và độ đúng khi phân biệt các kiểu gen biến thể quan tâm. Biến thể DPYD*2A là một loại alen thứ yếu (minor allele) tồn tại với tần suất rất thấp trong dân số chung, dao động từ 0,1% đến 1,0% tùy chủng tộc và hiện chưa có nghiên cứu tại Việt Nam về tần suất biến thể DPYD*2A. Việc tìm kiếm người tình nguyện mang biến thể quan tâm, PCR vùng gen mang biến thể để tạo đoạn DNA chèn và tiến hành tạo dòng là chiến lược không khả thi trong phạm vi của nghiên cứu này. Vì vậy, nhóm nghiên cứu đã chủ động tạo đột biến điểm có định hướng bằng phương pháp PCR overlap extension nhằm tạo được biến thể DPYD*2A.

Real-time PCR HRM phân tích kiểu gen dựa trên sự thay đổi nhiệt độ nóng chảy sản phẩm PCR do thay đổi nucleotide, sự hiện diện của những biến thể di truyền khác, có hoặc không có

kèm theo biến thể quan tâm, sẽ gây khó khăn trong kết luận kiểu gen chỉ đơn độc dựa vào phân tích HRM. Chính vì lí do trên, để tiếp tục đánh giá, tối ưu hoá và cải tiến chất lượng quy trình đã xây dựng, chúng tôi kiến nghị nghiên cứu cần được tiếp tục triển khai trên cộng đồng với cỡ mẫu nhất định nhằm đánh giá tính ứng dụng cũng như đánh giá sự ảnh hưởng nhiều những biến thể di truyền ở Việt Nam có thể gây ra.

Các nghiên cứu khuyến cáo thiết kế đoạn môi đặc hiệu sao cho sản phẩm khuếch đại có kích thước nhỏ, từ 80-110 bp, hoặc lựa chọn một cách cẩn trọng vị trí đoạn môi thích hợp nhằm khuếch đại vùng trình tự không mang các biến thể di truyền khác. Tuy nhiên, các khuyến cáo trên chỉ giúp hạn chế khuyết điểm cố hữu của kỹ thuật, không thể loại bỏ hoàn toàn nguy cơ trên. Nhất là khi bắt gặp các biến thể di truyền lạ chưa được y văn mô tả trong chủng tộc cụ thể hoặc trong trường hợp biến thể quan tâm nằm trong vùng "hot-spot", với nhiều biến thể di truyền khác xung quanh xuất hiện với tần suất cao. Nhóm nghiên cứu cho rằng kết quả nghi ngờ khi thực hiện bằng real-time PCR HRM cần được khẳng định lại bằng phương pháp giải trình tự Sanger, "tiêu chuẩn vàng" chẩn đoán xác định biến thể di truyền.

Mặc dù sở hữu những khuyến điểm cố hữu, real-time PCR HRM vẫn là công cụ đảm bảo tính nhanh chóng, dễ dàng thực hiện, tiết kiệm chi phí và độ tin cậy nhất định. Kết quả của nghiên cứu chúng tôi cung cấp một công cụ với độ tin cậy nhất định, bước đầu ứng dụng cho mô tả đặc điểm di truyền biến thể DPYD*2A ở người Việt Nam.

V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được quy trình real-time PCR high resolution melting xác định biến thể DPYD*2A trên gen DYPD.

VI. KIẾN NGHỊ

Ứng dụng quy trình xây dựng được trong xác định biến thể DPYD*2A gen DPYD, bước đầu xây dựng cơ sở khoa học tin cậy về tần suất biến thể DPYD*2A.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Saif M, Ezzeldin H and Vance K.** DPYD* 2A mutation: the most common mutation associated with DPD deficiency. *Cancer chemotherapy pharmacology*. 2007; 60:503-507.
2. **Caudle K, Thorn C, Klein T, et al.** Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing. *Clinical*

- Pharmacology Therapeutics. 2013; 94(6):640-645. doi: 10.1038/clpt.2013.172.
- Baudhuin LM, Lagerstedt SA, Klee EW, Fadra N, Oglesbee D and Ferber MJTJOMD.** Confirming variants in next-generation sequencing panel testing by Sanger sequencing. 2015; 17(4):456-461.
 - Naushad SM, Hussain T, Alrokayan SA and Kutala VK.** Pharmacogenetic profiling of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) variants in the Indian population. The Journal of Gene Medicine. 2021; 23(1):e3289.
 - Hussain H and Chong NF-M.** Combined overlap extension PCR method for improved site directed mutagenesis. BioMed research international. 2016; 2016.
 - Ncbi. Primer-BLAST.** Access date: 31/08/2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>.
 - University of Utah. uMelt Quartz.** Access date: 02/09/2023. <https://www.dna-utah.org/umelt/quartz/um.php>.
 - ThermoFisher Scientific. Precision in qPCR.** 2021. Access date: 01/09/2023. <https://www.thermoFisher.com/vn/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/gene-expression-analysis-real-time-pcr-information/precision-qpcr.html>.

U NỘI MÔ HUYẾT QUẢN DẠNG BIỂU MÔ Ở GAN: BÁO CÁO NHÂN MỘT TRƯỜNG HỢP

Đỗ Anh Tú¹, Vũ Hồng Thăng¹, Nguyễn Thị Hồng²

TÓM TẮT

U nội mô huyết quản dạng biểu mô (Epithelioid hemangioendothelioma – EHE) là một khối u hiếm gặp, có nguồn gốc mạch máu. U nội mô huyết quản dạng biểu mô ở gan (Hepatic epithelioid hemangioendothelioma – HEHE) rất hiếm gặp với tỷ lệ mắc ước tính 1-2 trường hợp trên 1 triệu người. Do tính chất hiếm gặp và biểu hiện lâm sàng đa dạng, hiện nay chiến lược điều trị trên nhóm bệnh nhân này vẫn là vấn đề thách thức đối với các bác sĩ lâm sàng. **Báo cáo ca lâm sàng:** Chúng tôi báo cáo một trường hợp bệnh nhân nữ 42 tuổi mắc u nội mô huyết quản dạng biểu mô ở gan được điều trị hóa trị phác đồ AIM tại bệnh viện K. **Bàn luận:** Trong bài báo này, chúng tôi sẽ bàn luận về đặc điểm và phương thức điều trị tối ưu đối với u nội mô huyết quản dạng biểu mô ở gan. **Kết luận:** U nội mô huyết quản dạng biểu mô ở gan là bệnh lý ác tính rất hiếm gặp. Chẩn đoán xác định dựa vào kết quả giải phẫu bệnh và nhuộm hóa mô miễn dịch. Chiến lược điều trị cần cá thể hóa trên từng đối tượng cụ thể, trong đó hóa trị giúp giảm nhẹ các triệu chứng và cải thiện thời gian sống thêm cho người bệnh. **Từ khóa:** U nội mô mạch máu dạng biểu mô ở gan, phác đồ AIM.

SUMMARY

HEPATIC EPITHELIOID HEMANGIOENDOTHELIOMA: A RARE CASE REPORT

Introduction: Epithelioid hemangioendothelioma (EHE) is a rare tumor of vascular origin. Hepatic epithelioid hemangioendothelioma (HEHE) is an

extremely rare lesion, with an estimated incidence of only 1-2 cases in 1 million people. Due to the diverse and rare clinical presentation, current treatment strategies in this patient group remain challenging for clinicians. **Presentation of case:** We report a 42-year-old female case with hepatic epithelioid hemangioendothelioma who was treated with AIM regimen chemotherapy at K hospital. **Discussion:** In this report, clinical features and optimal treatment modalities for patient with hepatic epithelioid hemangioendothelioma are discussed. **Conclusion:** Hepatic epithelioid hemangioendothelioma is an extremely uncommon malignancy. Diagnosis is based on pathology results and immunohistochemical staining. Treatment strategies need to be individualized for each specific patient, with chemotherapy helping to alleviate symptoms and improve patient survival. **Keywords:** Hepatic epithelioid hemangioendothelioma, AIM regimen.

I. TỔNG QUAN

U nội mô huyết quản dạng biểu mô (Epithelioid hemangioendothelioma-EHE) là một khối u mạch máu hiếm gặp, có đặc điểm mô học giữa u máu và sarcoma mạch máu, thường xuất hiện ở phổi, mô mềm, đầu cổ, xương,...U nội mô huyết quản dạng biểu mô ở gan (Hepatic epithelioid hemangioendothelioma-HEHE) cực kỳ hiếm gặp, tỷ lệ mắc ước tính 1-2 trường hợp trên 1 triệu người, độ tuổi thường gặp từ 30-50 tuổi, ưu thế ở nữ với tỷ lệ nam/nữ là 2/3¹. Bệnh nhân thường không có triệu chứng và được phát hiện tình cờ, một số trường hợp có biểu hiện đau hạ sườn phải, gan to, gầy sút cân. HEHE là khối u ác tính ở mức độ thấp đến trung bình², được chia thành 3 loại: đơn độc, nhiều nốt và lan tỏa. Bệnh thường xuất hiện dưới dạng nhiều nốt ở cả hai thùy gan, do đó dễ bị chẩn đoán nhầm là ung thư di căn gan. Chính vì vậy, chẩn đoán xác

¹Bệnh viện K

²Trường Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Đỗ Anh Tú

Email: doanhtu.bvk@gmail.com

Ngày nhận bài: 3.10.2023

Ngày phản biện khoa học: 10.11.2023

Ngày duyệt bài: 13.12.2023