

NGHIÊN CỨU PILOT VỀ BIẾN THỂ ĐA HÌNH rs216321 VÀ MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA Ổ XUẤT HUYẾT Ở NGƯỜI XUẤT HUYẾT NỘI SỌ TỰ PHÁT

Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn¹, Phạm Phú Song Huy²

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Biến thể đa hình rs216321 trên gen VWF giúp dự đoán sự mở rộng của khối máu tụ ở các trường hợp xuất huyết nội sọ tự phát (sICH). Hiện chưa có dữ liệu về biến thể này tại Việt Nam. **Mục tiêu:** bước đầu xác định tỷ lệ biến thể rs216321 này trong một nhóm đối tượng bị ICH và mô tả sự hiện diện của biến thể theo một số đặc điểm của ổ xuất huyết. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả loạt ca, thu mẫu thuận tiện, tiến cứu, trên 96 bệnh nhân được chẩn đoán sICH, tại bệnh viện Nguyễn Tri Phương, từ 10/2022 đến 06/2023. Biến thể rs216321 được xác định bằng kỹ thuật real-time PCR SYBR. Thu thập các dữ liệu về tuổi, giới, vị trí, số lượng ổ xuất huyết, đường kính ổ xuất huyết. Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm STATA 14.2. Sử dụng các test kiểm định Chi bình phương và MannWhitney với sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$. **Kết quả:** tỷ lệ alen nguy cơ (alen T) chiếm 28%, tỷ lệ các kiểu gen CC, CT và TT lần lượt là 50,0%; 43,8% và 6,2%. Khi so sánh giữa nhóm không có biến thể (kiểu gen CC)(n=48) và nhóm có biến thể (kiểu gen CT và TT)(n=48), không có sự khác biệt ở các đặc điểm tuổi, giới, vị trí xuất huyết, số lượng ổ xuất huyết và thể tích khối máu tụ. **Kết luận:** Nghiên cứu cung cấp những dữ liệu ban đầu cho việc đánh giá vai trò của biến thể này đối với khả năng lan rộng của khối máu tụ. **Từ khóa:** Xuất huyết nội sọ tự phát, rs216321, gen vonWillebrand Factor (VWF).

SUMMARY

A PILOT STUDY OF POLYMORPHIC VARIANT RS216321 AND SOME CHARACTERISTICS OF HEMORRHAGIC FOCI IN HUMANS WITH SPONTANEOUS INTRACRANIAL HEMORRHAGE

Background: Polymorphic variant rs216321 on the VWF gene helps predict hematoma expansion in cases of spontaneous intracranial hemorrhage (sICH). There is currently no data on this variant in Vietnam. **Objective:** initially determine the prevalence of this rs216321 variant in a population with ICH and characterize the presence of the variant according to some characteristics of the foci of haemorrhage. **Subjects and methods:** a case series study, convenient and prospective sampling, on 96 patients diagnosed with sICH, at Nguyen Tri Phuong hospital, from 10/2022 to 06/2023. The rs216321 variant was identified using the SYBR real-time PCR technique.

¹Trường Đại học Y Khoa Phạm Ngọc Thạch

²Đại học Y Dược TP.HCM

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn

Email: nhntuan@pnt.edu.vn

Ngày nhận bài: 6.2.2024

Ngày phản biện khoa học: 22.3.2024

Ngày duyệt bài: 25.4.2024

Collect data on age, gender, location, number of hemorrhagic foci, diameter of hemorrhagic foci. Data was analyzed using STATA 14.2 software. Using the Chi squared and MannWhitney tests with a significant difference of $p < 0.05$. **Results:** the proportion of risk alleles (T allele) accounted for 28%, the proportion of CC, CT and TT genotypes was 50.0%, 43.8% and 6.2%, respectively. When comparisons were made between the group without variants (genotype CC)(n=48) and the group with variants (genotypes CT and TT)(n=48), there was no difference in characteristics of age, gender, location of haemorrhage, number of foci of haemorrhage, and hematoma volume. **Conclusions:** The study provides preliminary data for evaluating the role of this variant in the potential spread of hematomas. **Keywords:** Spontaneous Intracerebral Hemorrhage (sICH), rs216321, vonWillebrand Factor (VWF gene).

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xuất huyết nội sọ tự phát (sICH) là nguyên nhân gây đột quỵ phổ biến với tỷ lệ tử vong trong vòng 30 ngày ước tính từ 44% đến 52% [1]. Ở những bệnh nhân sICH, thể tích khối máu tụ tăng và sự lan rộng của chúng làm tăng áp lực nội sọ, tăng nguy cơ thoát vị não. Các nguyên nhân chính gây nên sự phát triển khối máu tụ phần lớn vẫn chưa được biết đến. Các nghiên cứu trước đây xác định việc sử dụng thuốc chống đông, chống kết tập tiểu cầu,... là các yếu tố nguy cơ làm tăng khối máu tụ [1]. Việc phát hiện sớm các bệnh nhân có nguy cơ cao lan rộng khối máu tụ sẽ giúp có những phương pháp dự phòng tích cực cho bệnh nhân. Trong những năm gần đây, xu hướng di truyền được tìm thấy trong ICH chỉ ra rằng các biến thể di truyền đóng góp đáng kể vào việc hình thành và lan rộng của ổ xuất huyết. Đáng chú ý là biến thể rs216321 trên gen mã hóa yếu tố von Willebrand (vWF), hình thành do sự thay thế nucleotide T thành C tại vị trí nucleotit thứ 6034818 trên gen VWF, dẫn đến sự biến đổi axit amin Arginine thành Glutamine tại vị trí axit amin thứ 852 trên protein, làm giảm khả năng hoạt hóa tiểu cầu và góp phần sự tăng trưởng của ổ xuất huyết [2]. Biến thể rs216321 giúp dự đoán sự mở rộng của khối máu tụ ngay cả khi kiểm soát được các yếu tố nguy cơ đã biết đối với sự phát triển của khối máu tụ [1,3]. Tại Việt Nam, những hiểu biết về biến thể rs216321 còn hạn chế, thiếu hụt về tần suất lưu hành cũng như tầm quan trọng của biến thể trong các quần thể dân số. Việc thiếu hụt dữ liệu về tần suất lưu

hành là một trong những nguyên nhân dẫn đến giảm khả năng dự đoán về sự lan rộng của khối máu tụ ở những bệnh nhân sICH. Do đó, nghiên cứu "Biến thể đa hình rs216321 và một số đặc điểm của ổ xuất huyết ở người xuất huyết nội sọ tự phát" được thực hiện nhằm bước đầu xác định tỷ lệ biến thể này trong một nhóm đối tượng quan tâm và mô tả sự hiện diện của biến thể theo một số đặc điểm của ổ xuất huyết.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

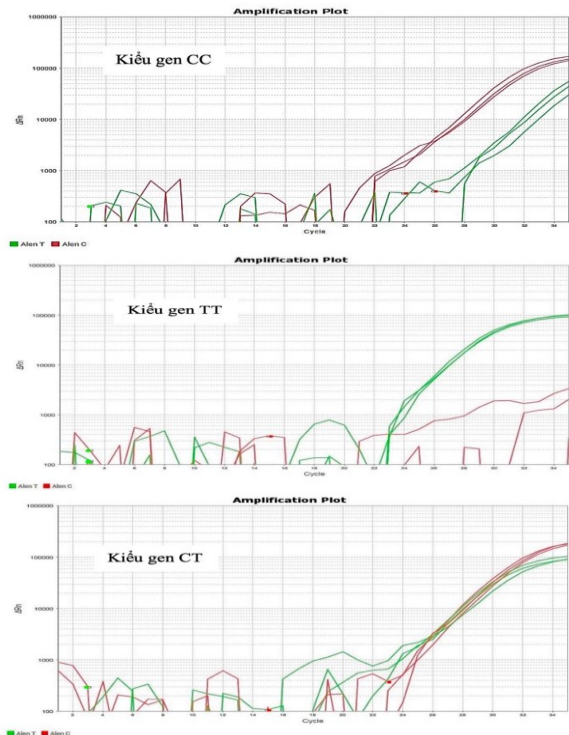
Nghiên cứu mô tả loạt ca, thu mẫu thuận tiện, tiến cứu, thực hiện trên 96 người bệnh được chẩn đoán sICH (theo Hướng dẫn trong kiểm soát sICH của Hiệp hội Tim mạch Hoa Kỳ và Hiệp hội Đột quỵ Hoa Kỳ [4]), có kết quả chụp cộng hưởng từ (MRI) hoặc cắt lớp điện toán (CT scan) sọ não lúc nhập viện, khám điều trị tại bệnh viện Nguyễn Tri Phương, từ 10/2022 đến 06/2023. Biến thể rs216321 được xác định bằng kỹ thuật real-time PCR SYBR trên DNA bộ gen ly trích từ máu toàn phần chống đông EDTA, tại Trung tâm Nghiên cứu Y sinh, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, bằng cặp mồi tự thiết kế và bộ sinh phẩm SensiFAST SYBR (Bioline)[5]. Các biến số thu thập gồm: tuổi, giới, vị trí, số lượng ổ xuất huyết, kích thước ổ xuất huyết. Kích thước ổ xuất huyết được tính theo thể tích khối máu tụ dựa trên công thức của Broderick và cộng sự [6]. Xử lý số liệu bằng phần mềm STATA 14.2. Kiểm tra sự khác biệt về tỷ lệ giữa các nhóm bằng phép kiểm Chi bình phương đối với biến định tính và phép kiểm Mann-Whitney đối với biến định lượng, sự khác biệt có ý nghĩa khi p<0,05. Nghiên cứu được chấp thuận bởi Hội đồng đạo đức của Đại học Y Dược TP.HCM số 788/HĐĐĐ-ĐHYD ngày 26/10/2022.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Áp dụng kỹ thuật real-time PCR với chất phát huỳnh quang SYBR theo quy trình đã được xây dựng [5], xác định tình trạng biến thể đa hình rs216321 trên gen vWF của 96 người bệnh sICH, kết quả được thể hiện trong bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Phân bố kiểu gen của biến thể rs216321 trong quần thể nghiên cứu

Kiểu gen	CC	CT	TT
Số lượng (người) (%)	48(50%)	42(43,76%)	6(6,24%)
Tần số alen C	$\frac{48 \times 2 + 42}{2 \times (48 + 42 + 6)} = 0,72$		
Tần số alen T	$\frac{42 + 6 \times 2}{2 \times (48 + 42 + 6)} = 0,28$		



Hình 1. Minh họa biểu đồ tín hiệu của phản ứng real-time PCR SYBR xác định kiểu gen biến thể rs216321 gen vWF của một đối tượng nghiên cứu.

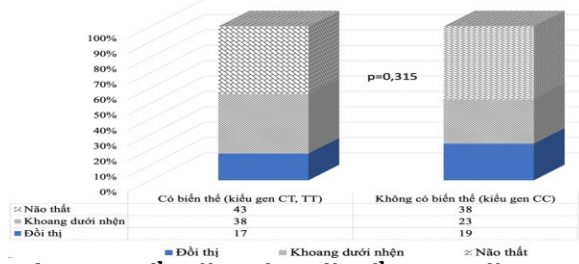
Phân bố kiểu gen của đối tượng nghiên cứu theo tuổi, giới tính, số lượng ổ xuất huyết được trình bày tại bảng 2. Khi so sánh giữa hai nhóm, chưa ghi nhận được sự khác biệt về các phân nhóm đặc điểm trên (p>0,05).

Bảng 2. Phân bố kiểu gen đối tượng nghiên cứu theo nhóm tuổi, giới tính và số lượng ổ xuất huyết

Đặc điểm		Người bệnh có biến thể (kiểu gen CT, TT) (n=48) (n, %)	Người bệnh không có biến thể (kiểu gen CC) (n=48) (n, %)	p
Nhóm tuổi	21 – 40	6 (12,48%)	3 (6,24%)	0,500
	41 – 60	22 (45,82%)	21 (43,76%)	
	> 60	20 (41,70%)	24 (50,0%)	
Giới tính	Nam	22 (45,84%)	27 (56,24%)	0,307
	Nữ	26 (54,16%)	21 (43,76%)	

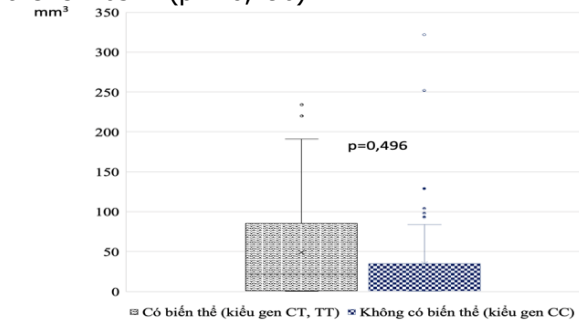
Số lượng ổ xuất huyết	1 ổ	24 (50,0%)	25 (52,08%)	0,838
	Đa ổ (≥ 2 ổ)	24 (50,0%)	23 (47,92%)	

Chọn 3 vị trí có số lượng bệnh nhân xuất huyết nhiều nhất là vùng đồi thị, khoang dưới nhện, não thất. Mỗi bệnh nhân có thể một hoặc nhiều ổ xuất huyết ở các vị trí khác nhau. Kết quả phân bố kiểu gen theo vị trí xuất huyết được trình bày tại hình 2. Không ghi nhận sự khác biệt về vị trí xuất huyết giữa nhóm đối tượng có và không có biến thể rs216321 ($p = 0,315$).



Hình 2. Biểu đồ phân bố kiểu gen đối tượng nghiên cứu theo vị trí xuất huyết

Trong 96 bệnh nhân, chỉ có 34 bệnh nhân có ghi nhận thể tích khối máu tụ, với trung vị và khoảng tứ phân vị được trình bày ở hình 3. Chưa ghi nhận được sự khác biệt về thể tích ổ xuất huyết giữa nhóm đối tượng có và không có biến thể rs216321 ($p = 0,496$).



Hình 3. Biểu đồ về thể tích khối máu tụ của nhóm đối tượng nghiên cứu (n=34)

IV. BÀN LUẬN

Đột quy là nguyên nhân hàng đầu gây tàn tật lâu dài ở các nước phát triển và là một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên toàn thế giới và tại Việt Nam. Trong đó, sICH là nguyên nhân gây đột quy rất phổ biến. Các dấu hiệu và triệu chứng của ICH phụ thuộc vào vị trí, kích thước của ổ xuất huyết và khởi phát dần dần trong thời gian từ vài phút đến vài giờ. Sự lan rộng khối máu tụ có thể làm suy giảm thần kinh sớm và là một yếu tố tiên lượng xấu, quan

trọng với bệnh nhân ICH. Nhiều biến thể di truyền kiểu đa hình đơn nucleotit liên quan đến ICH đã được mô tả, gây các ảnh hưởng đa dạng lên sinh lí bệnh, trong đó được nhắc đến nhiều trong thời gian gần đây là các biến thể đa hình trên gen VWF mã hóa yếu tố von Willebrand, là thành phần chính của quá trình cầm máu và tiêu huyết khối. Biến thể đa hình rs216321 trên gen yếu tố von Willebrand (vWF) gây thay thế alen C bằng alen T ở vị trí nucleotit thứ 6034818, trên exon 20 của gen VWF. Đây có thể được xem là một đột biến sai nghĩa (missense mutation), dẫn đến sự biến đổi axit amin Arginine (Arg, R) thành axit amin Glutamine (Gln, Q) ở vị trí 852, làm thay đổi đáng kể khả năng tiếp cận dung môi vì Glutamine không còn tiếp xúc với bề mặt protein [2, 7]. Biến thể đa hình rs216321, thông qua mã hóa thành biến thể protein R852Q, được cho là có mối liên hệ chặt chẽ với nồng độ yếu tố von Willebrand, liên quan đến sự tăng trưởng của khối máu tụ, làm giảm khả năng hoạt hóa tiểu cầu và tăng cường khả năng mang yếu tố VIII của vWF [3]. Tại Việt Nam, những hiểu biết về các biến thể đa hình trên gen mã hóa yếu tố von Willebrand, cụ thể là biến thể rs216321, còn hạn chế. Sự thiếu hụt nguồn dữ liệu, thông tin về tần suất của biến thể tại Việt Nam đã gây khó khăn phần nào cho công tác thực hành lâm sàng và dự phòng cho những bệnh nhân bị sICH.

Sau khi thực hiện tối ưu hóa và thẩm định quy trình real-time PCR SYBR xác định rs216321 [5], nhóm nghiên cứu sử dụng công cụ này để tiến hành một nghiên cứu pilot khảo sát trên 96 mẫu máu của bệnh nhân sICH. Kết quả cho thấy có tới 50% bệnh nhân sICH mang biến thể rs216321, trong đó có 6 bệnh nhân (6,24%) mang kiểu gen đồng hợp tử TT và 42 bệnh nhân (43,76%) mang kiểu gen dị hợp tử CT. Từ đó tính được tần suất alen của biến thể (T) là 0,28, đây cũng là tần suất cao nhất được ghi nhận trên thế giới. Theo Zsuzsanna Elek và cộng sự [7] tần suất alen T khảo sát trên 72 bệnh nhân bị mắc COVID-19 tại Hungary là 0,24, đây được xem là tần suất cao nhất trên thế giới ghi nhận vào tháng 02/2023. Trong một số nghiên cứu khác, đa phần tần suất alen này khoảng dưới 0,1. Sở dĩ kết quả nghiên cứu này có tần suất cao là do việc chọn lựa đối tượng nghiên cứu là bệnh nhân bị sICH, khi biến thể này được công bố là có tác động đến yếu tố von Willebrand ảnh

hưởng đến quá trình cầm máu của tiểu cầu làm lan rộng khối máu tụ. Trong khi đó, các quần thể nghiên cứu mà có tần suất rs216321 dưới 0,1 đa phần là những người khỏe mạnh hoặc những bệnh nhân không liên quan đến xuất huyết nội sọ. Tuy chưa tìm được sự khác biệt về kiểu gen theo giới tính và nhóm tuổi, tỷ lệ nhóm tuổi ở nhóm đối tượng có mang biến thể thì đa phần từ độ tuổi trung niên (≥ 40 tuổi) trở lên. Điều này có thể lý giải là vì đa phần các bệnh nhân nhập viện đều ở độ tuổi trung niên và nhóm nghiên cứu chỉ chọn đối tượng sICH một cách ngẫu nhiên không theo tuổi nên không thể khảo sát một cách chính xác, khách quan ở những nhóm tuổi nhỏ hơn 40, điều này cũng xảy ra tương tự ở nhóm đối tượng không mang biến thể.

Khi tiến hành khảo sát sự khác biệt về một số đặc điểm của ổ xuất huyết theo sự hiện diện của biến thể rs216321 trên nhóm 96 bệnh nhân cho thấy không có sự khác biệt về số lượng và vị trí xuất huyết giữa nhóm đối tượng có và không có biến thể. Với đặc điểm thể tích khối máu tụ, nhóm nghiên cứu dựa theo công thức của Broderick và cộng sự [6] để tính thể tích ổ xuất huyết và từ đó so sánh thể tích xuất huyết của hai nhóm đối tượng có và không có mang biến thể rs216321, những thông số để tính thể tích đều được nhóm nghiên cứu chỉ lấy kết quả từ chụp CT hay MRI ở lần đầu khi mới nhập viện của bệnh nhân, đối với những bệnh nhân có số lượng ổ từ 2 ổ trở lên thì nhóm nghiên cứu sẽ tính tổng thể tích của các ổ xuất huyết làm giá trị đại diện cho bệnh nhân. Do chỉ thu thập được dữ liệu này ở 34 bệnh nhân, nên dẫn đến việc cũng không phát hiện được sự khác biệt về giá trị trung vị, khoảng tứ phân vị giữa hai nhóm. Sự ghi nhận này là dễ hiểu bởi cỡ mẫu của mỗi nhóm còn ít, chưa đủ để phát hiện các khác biệt nếu có. Mặt khác, theo Vaidya cùng các cộng sự [8] biến thể rs216321 tác động đến yếu tố von Willebrand làm rối loạn chức năng gây nguy cơ chảy máu. Biến thể rs216321 có thể được xem là dấu hiệu quan trọng trong việc dự báo sớm nguy cơ lan rộng khối máu tụ sau ICH. Nhưng do thời gian tiến hành nghiên cứu tương đối ngắn và hạn chế về nguồn lực, nhóm nghiên cứu không thu thập được các phim chụp MRI hoặc CT scan sọ não sau phim đầu tiên lúc nhập viện. Điều này cản trở việc đánh giá diễn tiến của khối máu tụ, điều vốn phản ánh trực tiếp ảnh hưởng của sự hiện diện của biến thể.

Mặc dù không thể tránh khỏi những hạn chế nêu trên, các kết quả của nghiên cứu pilot này

cũng đã cung cấp những thông tin đầu tiên về biến thể rs216321 trên gen VWF cùng một số đặc điểm của ổ xuất huyết trên bệnh nhân sICH trong nhóm đối tượng tham gia nghiên cứu, là tiền đề để chúng tôi tiếp tục tìm hiểu về biến thể rs216321 với một cỡ mẫu lớn hơn, mang tính đại diện hơn để có thể có tần suất chính xác hơn và hiểu hết về sự tăng nguy cơ làm lan rộng ổ xuất huyết ở những bệnh nhân sICH có alen T tại Việt Nam.

V. KẾT LUẬN

Trong nhóm nghiên cứu, tần suất alen C là 0,72, tần suất alen T (alen nguy cơ) là 0,28; không có sự khác biệt về tuổi, giới, vị trí xuất huyết, số lượng ổ xuất huyết, kích thước ổ xuất huyết trong lần đầu nhập bệnh viện Nguyễn Tri Phương giữa nhóm có và không có biến thể. Nghiên cứu cung cấp những dữ liệu ban đầu cho việc đánh giá vai trò của biến thể này đối với khả năng lan rộng của khối máu tụ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wang G and Zhang JJCDT. Hematoma expansion: clinical and molecular predictors and corresponding pharmacological treatment. *Bentham Science*. 2017; 18(12):1367-1376.
2. Guo H, You M, Wu J, et al. Genetics of spontaneous intracerebral hemorrhage: risk and outcome. *Front Neurosci*. 2022; 16:455.
3. Appelboom G, Piazza M, Han JE, et al. von Willebrand factor genetic variant associated with hematoma expansion after intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2013; 22(6): 713-7. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2011.10.018.
4. Hemphill III JC, Greenberg SM, Anderson CS, et al. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2015; 46(7):2032-2060.
5. Phạm Phú Song Huy, Nguyễn Hưng Thịnh, Nguyễn Hoàng Tuyết Minh, Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn (2024). Quy trình kỹ thuật real-time PCR SYBR chẩn đoán biến thể rs216321 trên gen VWF ở người bệnh xuất huyết nội sọ tự phát. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 534(2): 309-313
6. Bộ Y tế. Quyết định số 5331/QĐ-BYT. Quyết định về việc ban hành hướng dẫn chẩn đoán và xử trí đột quỵ não. 2020: 23.
7. Elek Z, Losonczi E, Maricza K, et al. Missense Variants of von Willebrand Factor in the Background of COVID-19 Associated Coagulopathy. *Genes (Basel)*. 2023; 14(3). 10.3390/genes14030617.
8. Vaidya D, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, et al. A common variant in the Von Willebrand factor gene is associated with multiple functional consequences. *American Journal of Hematology*. 2010; 85(12):971.