

R

BỘ Y TẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI CẤP BỘ

TÊN ĐỀ TÀI:

**ĐỊNH NHÓM KHÁNG NGUYÊN TIỂU CẦU Ở
NGƯỜI DÂN TỘC KINH, VIỆT NAM**

Chủ nhiệm đề tài: TS Bạch Khánh Hoà
Cơ quan chủ trì đề tài: Trường đại học Y Hà nội
Cấp quản lý: Bộ Y Tế

Thời gian thực hiện: từ 2002 đến 2004
Tổng kinh phí thực hiện đề tài: 350 triệu đồng
Trong đó kinh phí SNKH: 150 triệu đồng
Nguồn kinh phí hỗ trợ từ hợp tác quốc tế: 200 triệu đồng

Hà nội-2004

5452

18/8/05

DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI THỰC HIỆN CHÍNH CỦA ĐỀ TÀI

Chủ nhiệm đề tài : TS Bạch Khánh Hoà

Thư ký đề tài: BS Phạm Thanh Tân

Những người thực hiện chính:

Số TT	Họ và tên cán bộ thực hiện đề tài	Học vị, học hàm, chức vụ	Cơ quan công tác
1	Lê Văn Phụng	PGS.TS. Trưởng laboTT	Đại học Y Hà nội
2	Lê Thị Kim Tuyến	TS, phó trưởng khoa MD-SHPT	Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương
3	Phạm Thị Nguyệt Hằng	Th.s	Đại học Y Hà nội
4	Trần Thị Sinh	CN	Đại học Y Hà nội
5	Nguyễn Ngọc Minh	PGS.TS, trưởng khoa HH-TM	Bệnh viện Trung ương Huế
6	Nguyễn Ngọc Huỳnh	BS, trưởng khoa HH-TM	Bệnh viện đa khoa Cần thơ

Lời cảm ơn:

Chúng tôi chân thành cảm ơn sự giúp đỡ và tạo điều kiện của vụ Khoa học và đào tạo - bộ Y tế, phòng Nghiên cứu khoa học- trường đại học Y Hà nội, labo trung tâm Y sinh học - trường đại học Y Hà nội, labo Sinh học phân tử- viện Vệ sinh dịch tễ trung ương, labo Miễn dịch bạch- tiểu cầu- viện Truyền máu quốc gia Pháp. Đặc biệt là GS-TSKH Phan thị Phi Phi đã cùng chúng tôi khắc phục những khó khăn trong quá trình thực hiện đề tài.

TÓM TẮT CÁC KẾT QUẢ NỔI BẬT CỦA ĐỀ TÀI

1.KẾT QUẢ NỔI BẬT CỦA ĐỀ TÀI:

1.1. Đưa ra được tần suất kháng nguyên tiểu cầu trên 289 người Kinh, Việt nam từ HPA-1 đến HPA-5, ngoài ra chúng tôi đã kết hợp với viện Truyền máu quốc gia Pháp định nhóm cho 194 người Kinh, Việt nam các kháng nguyên từ HPA-6 đến 15.

1.2 Hiệu quả của đề tài:

* Kỹ thuật PCR-SSP và PCR- RFLP mà chúng tôi sử dụng để định nhóm kháng nguyên tiểu cầu đã được khoa Miễn dịch Bạch - Tiểu cầu của viện Truyền máu quốc gia Pháp công nhận đạt chất lượng cao.

* Đăng hai bài báo (có ở phần phụ lục), một bài đăng ở tạp chí quốc tế: Tissue Antigens và một bài ở tạp chí Nghiên cứu khoa Y học- ĐHYHN

2.ĐÁNH GIÁ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI ĐỐI CHIẾU VỚI ĐỀ CƯƠNG NGHIÊN CỨU ĐÃ ĐƯỢC PHÊ DUYỆT

2.1 Thời gian tiến độ:

Tiến hành đúng như thời gian đã đăng ký trong đề cương, từ 2002 đến 2004

2.2 Mục tiêu nghiên cứu của đề tài: Tính được tần suất gen của kháng nguyên tiểu cầu ở người Kinh, Việt nam.

2.3 Các kết quả đạt được so với dự kiến của đề cương: đạt và vượt mức chỉ tiêu của đề cương vì dự kiến của chúng tôi chỉ định nhóm kháng nguyên tiểu cầu từ HPA-1 đến HPA-5, chúng tôi đã định nhóm thêm từ HPA-6 đến HPA-15.

2.4 Kinh phí được nhận từ Bộ Y tế là 150 triệu (giá thành 1 triệu cho một mẫu định nhóm HPA-1 đến 5), với số kinh phí này chúng tôi chỉ có thể thực hiện được một nửa số liệu như dự kiến trong đề cương, nhưng chúng tôi đã nhận được sự giúp đỡ từ khoa Miễn dịch Bạch Tiểu cầu của Viện truyền máu quốc gia Pháp nên đã đạt được kết quả ngoài dự kiến.

MỤC LỤC

	Trang
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1 . TỔNG QUAN	2
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.	30
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ	42
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN	56
TÀI LIỆU THAM KHẢO.	74
PHỤ LỤC	88

BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
CD	Cluster of Differentiation	Cụm biệt hóa
C3bi	C3b inactive	Thành phần C3b của bổ thể (bất hoạt)
Fact. X	Factor X	Yếu tố X trong đông máu
Fg	Fibrinogen	Fibrinogen
Fn	Fibronectine	Fibronectine
GP	Glycoprotein	Glycoprotein
HPA	Human Platelet Antigen	Kháng nguyên tiểu cầu người
Lm	Laminine	Laminine
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism	
PCR-SSP	Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primer	
TSP	Thrombospondine	Thrombospondine
VLA	Very Late Antigen	Kháng nguyên muộn
Vn	Vitronectine	Vitronectine
vWF	von Willebrand factor	Yếu tố von Willebrand

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh do tiểu cầu gây ra có rất nhiều, với kỹ thuật ngày càng chuyên sâu, bệnh được hiểu biết kỹ hơn nhất là những bệnh có đột biến gen. Những bệnh như: Suy nhược tiểu cầu Glanzmann không có GP IIb-IIIa dẫn đến hiện tượng không có ngưng tập hoặc ngưng tập rất kém, hội chứng Bernard-Soulier không có GP Ib-IX gây ra sự giảm kết dính tiểu cầu do đó thời gian máu chảy kéo dài. Những bệnh này gặp chủ yếu ở trẻ sơ sinh. Ngoài ra, ở những trường hợp xuất huyết ở trẻ sơ sinh mà không có nguyên nhân do nhiễm trùng, bất đồng nhóm máu mẹ con hệ ABO-Rh, tìm kháng thể kháng tiểu cầu ở người mẹ là dương tính cũng cần phải được điều trị sớm và đúng để tránh biến chứng thần kinh cho trẻ sau này. Tuy nhiên, cho đến nay việc chẩn đoán bệnh lý của tiểu cầu như đã trình bày ở trên tại các bệnh viện lớn ở Việt nam như bệnh viện Nhi trung ương, viện Huyết học truyền máu trung ương còn chưa được nghiên cứu sâu. Vì vậy việc chẩn đoán chính xác nguyên nhân của bệnh còn chưa thực hiện được. Với lý do trên chúng tôi thực hiện nghiên cứu đề tài này với mục tiêu:

Định nhóm kháng nguyên tiểu cầu ở người Kinh, Việt nam, trên cơ sở kết quả thu được sẽ tính tần xuất gen tiểu cầu của người kinh-Việt nam.

Với kết quả thu được chúng tôi sẽ ứng dụng trong chẩn đoán một số bệnh lý của tiểu cầu, dự kiến khả năng bệnh lý đồng miễn dịch của tiểu cầu trong những trường hợp bất đồng nhóm tiểu cầu giữa mẹ và con, hoặc do truyền pool tiểu cầu trong điều trị bệnh kéo dài.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN

I. TIỂU CẦU

Những tổn thương thành mạch dẫn đến chảy máu mà hậu quả có thể rất nặng, đôi khi dẫn đến tử vong (xuất huyết nội tạng, não...). Cơ chế sinh lý học nhằm bảo vệ sự toàn vẹn cho thành mạch bị tổn thương được gọi chung dưới một tên là “đông máu”. Để bịt lỗ hổng thành mạch và dừng chảy máu cần sự tham gia của 3 yếu tố:

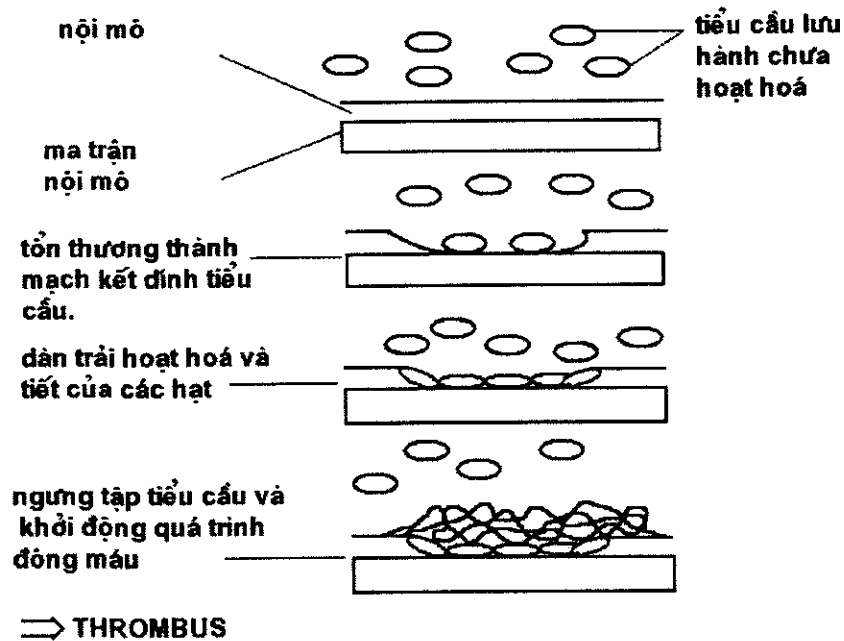
- Mạch máu (sự co mạch);
- Huyết tương (cơ chế đông máu);
- Tế bào (tiểu cầu: đông máu sơ cấp)

Tiểu cầu đóng vai trò quan trọng trong quá trình đông và cầm máu. Tổn thương thành mạch biểu hiện bằng kích thước ở dưới nội mô to ra và tiểu cầu sẽ đến kết dính ở đó. Tuy nhiên giai đoạn kết dính của tiểu cầu phải trải qua giai đoạn dàn trải, tạo ra chân giả, hoạt hoá, tiết ra những hạt nhỏ và ngưng tập chúng lại thành nút (Hình 1). Ngưng tập tiểu cầu và hoạt hoá quá trình đông máu (lưới fibrin) tạo thành cục đông làm ngưng chảy máu. Sự tổn thương tiểu cầu hay suy giảm chức năng sẽ dẫn đến tình trạng xuất huyết hoặc giảm đông máu.

Tiểu cầu là những tế bào nhỏ nhất trong các thành phần hữu hình của máu, đường kính từ 3-5 μm , thể tích 7-10 μm^3 . Số lượng bình thường ở mỗi người là từ 150 000-400 000 tiểu cầu/ μl máu và đời sống của tiểu cầu từ 7-10 ngày. Tiểu cầu có nguồn gốc từ đoạn tách ra của bào tương tế bào tủy và những mẫu tiểu cầu.

Cấu trúc của tiểu cầu chưa hoạt hoá được mô tả như sau: màng tế bào được cấu tạo bởi một lớp phospholipid kép giống như mọi tế bào khác. Những phospholipid kỵ nước không có mặt ở mặt ngoài của lớp kép và chỉ

có trên bề mặt tiểu cầu sau khi hoạt hoá. Sự trình diện những phospholipid cho phép cố định yếu tố đông máu Xa và Va và tạo cho tiểu cầu hoạt động đông máu ban đầu.

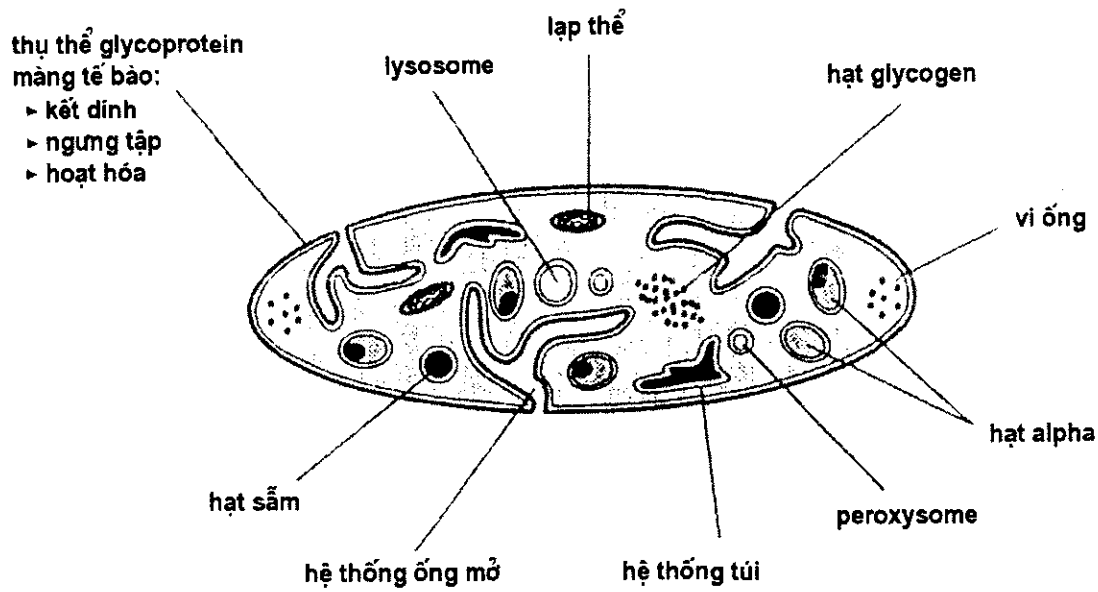


Hình 1. Giai đoạn tiếp xúc của cầm máu ban đầu

(Trang 6, sách UV 29-ParisVI)

Màng tế bào mang nhiều glycoprotein mà phần lớn là những thụ thể tham gia quá trình kết dính và ngưng tập tiểu cầu. Hệ thống màng trong tiểu cầu có 2 mạng lưới (Hình 2):

1. Hệ thống ống mở: nó có cấu tạo tụt vào màng bào tương để tạo ra con đường ngoại tiết cho những hạt tiết khi hoạt hoá tiểu cầu.
2. Hệ thống ống dày đặc của lưới nội sinh của những mẫu tiểu cầu: Hệ thống này không thông với môi trường ngoài tế bào và có nhiệm vụ chính là lưu trữ canxi trong tế bào cần thiết cho quá trình hoạt hoá.



Hình 2: Cấu trúc của một tiểu cầu không hoạt hoá (lát cắt ngang)

(Trang 8, sách UV 29-ParisVI)

Tiểu cầu mang 2 kiểu hạt khi tiết cho phép cung cấp toàn bộ những yếu tố cần thiết cho ngưng tập tiểu cầu và tuyển lựa tiểu cầu lưu hành không hoạt hoá:

1. Hạt α mang những protein kết dính (fibrinogen, yếu tố von Willbrand, vitronectine...) và nhiều protein huyết tương (IgG, Alb, yếu tố tiểu cầu 4, β -thromboglobulin...).
2. Những hạt dày đặc (hạt sẫm) trong tiểu cầu chứa phần lớn những nucleotid như ADP, cation Ca^{2+} , Mg^{2+} và serotonin.

Những yếu tố khác không xác định rõ ràng trong tương bào: những hạt lysosom, ty thể, peroxysome và những hạt glycogen dự trữ năng lượng. Cuối cùng nó bảo tồn một tương bào gồm 3 yếu tố: màng tế bào, bào tương và một lưới vi ống. Những tương bào có vai trò cấu trúc nhưng cũng động học, khi được hoạt hoá nó tham gia vào quá trình làm biến đổi cấu trúc tiểu cầu (thay đổi hình dạng, tiết, tái tạo sự phân bố glycoprotein trong lớp phospholipid kép) và co rút cục đông.

II. NHỮNG GLYCOPROTEIN CHÍNH CỦA MÀNG TIỂU CẦU

Sự kết dính và ngưng tập tiểu cầu phụ thuộc vào sự tác động qua lại giữa glycoprotein nằm trên bề mặt và những protein kết dính có trong khuôn dưới nội mạc và trong huyết tương. Nghiên cứu bệnh học kế thừa của đông máu như hội chứng Bernard-Soulier và suy nhược tiểu cầu glanzmann liên quan tới sự suy giảm chức năng kết dính và ngưng tập tiểu cầu cho phép xác định cơ chế phân tử trong quá trình này (Bảng 1).

Bảng I. Những glycoprotein chính trên màng tiểu cầu và chức năng của chúng

Glycoprotein	CD#	Ligand*	Chức năng*
Glycoprotein giàu leucine			
Ib-IX		vWF, thrombine [†]	Kết dính [†] / ngưng tập
Ib α	42b		
Ib β			
IX	42a	thrombine	?
V			
Integrine			
Kháng nguyên VLA			
Ia-IIa		Collagen	Kết dính
Ia	w49b		
IIa	29	Fibronectine	Kết dính
Ic	w49e		
Ic'-IIa		laminine	Kết dính
Ic'	w49f		
Cytoadhesine			
IIb-IIIa	41a	Fibrinogen, vWF Fibronectine, vitronectine	Ngưng tập
IIb	41b		
IIIa	61		
VnR		Vitronectine, fibrinogen, vWF	Kết dính
VnR	51		

Selectine			
GMP-140	62	Chuỗi oligosaccharide của bạch cầu	Tương tác liên bào
Protein dạng immunoglobuline			
PECAM-1	31		" "
FcgRII	w32	IgG (mảnh Fc)	
Protein có 7 đoạn xuyên màng			
≈ 66 kDa		thrombine	Ngưng tập
≈ 40 kDa		adrenaline	" "
Protein có 4 đoạn xuyên màng			
p24	9		?
Protein có 2 đoạn xuyên màng			
GP IV	36	Collagen, TSP	Ngưng tập

[†]: Kết dính là chức năng chính của GP Ib;

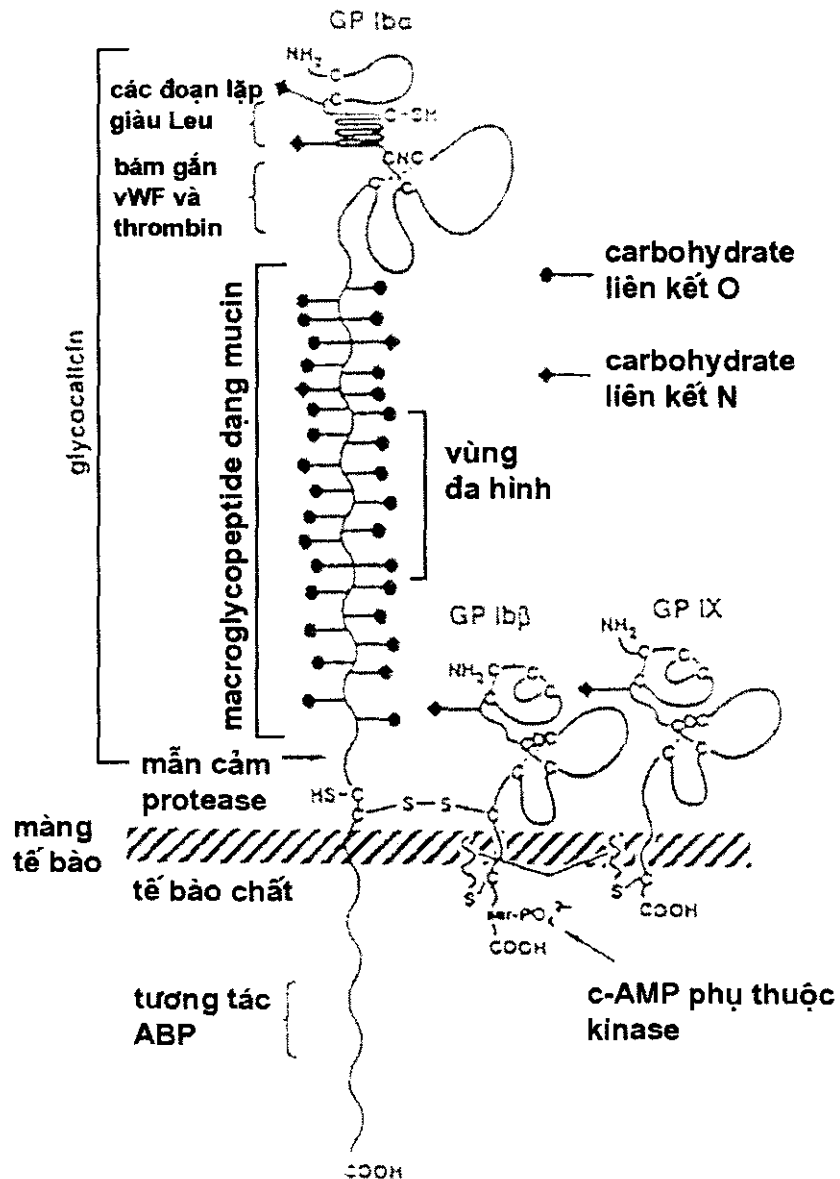
2.1. Phức hợp glycoprotein Ib-IX (GP Ib-IX)

Sự kết dính tiểu cầu là nhờ một phức hợp có sự tham gia của nhiều protein kết dính theo khuôn mẫu của nội mạc (vWF, collagen, laminine, fibronectine). Giai đoạn tiếp xúc ban đầu với khuôn mẫu của nội mạc sẽ phát động hoạt hoá tiểu cầu, thay đổi hình dạng của nó và dàn trải để tạo cơ chế kết dính. Sự va chạm tăng lên cũng như sự tái gấp gở trong vi mao mạch, đó là tác động qua lại chính của phức hợp GP Ib-IX và của vWF nhằm chịu trách nhiệm giai đoạn khởi động (ban đầu) kết dính tiểu cầu. Ngoài ra còn có những va chạm mạnh bao gồm kiểu tác động qua lại khác như: Fibronectrin/GP Ic-IIa, collagen/GP Ia-IIa và GP IV, laminine/GP Ic'-IIa.

2.1.1. Cấu trúc phức hợp GP Ib-IX

GP Ib và GP IX là một phức hợp không đồng hoá trị với 25 000 copy/tiểu cầu. GP Ib (168 kDa) bao gồm 2 dưới đơn vị: GP Ib- α (143 kDa) và GP Ib- β (24 kDa) nối với nhau bằng một cầu disulfide. GP IX được tạo bởi một chuỗi peptide 17 kDa. GP Ib có 4 kiểu: A, B, C, D khác nhau khi điện di SDS-PAGE là 168, 162, 159 và 153 kDa, theo thứ tự (72,69). Những thay đổi về trọng lượng phân tử cho mỗi dạng A, B, C, D phụ thuộc vào kết

quả đa hình phân tích trình tự lặp lại của 13 axit amin nằm trên macroglycopeptide của GP Ib- α (65) (Hình 3).

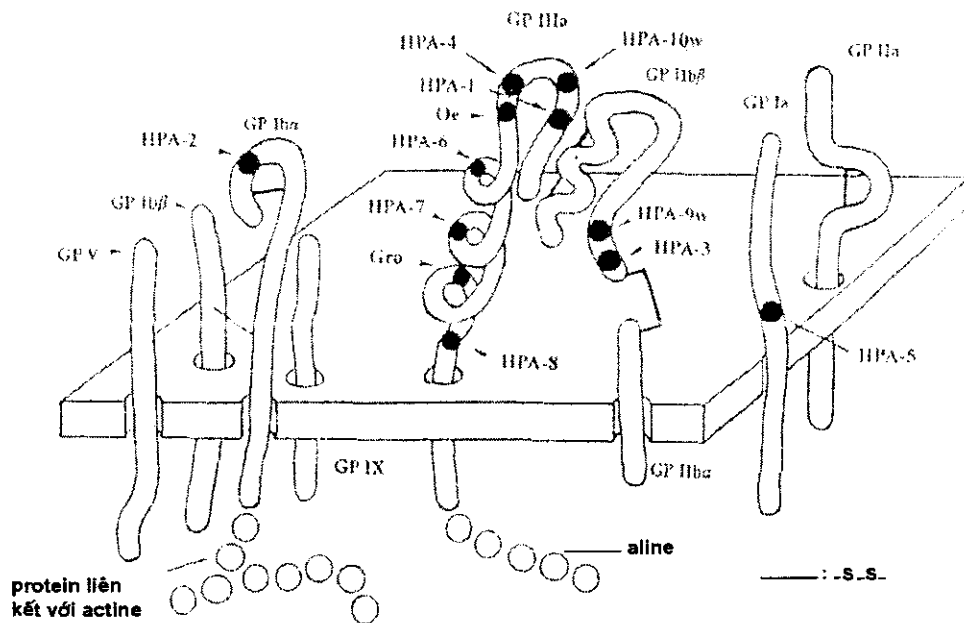


Hình 3. Sơ đồ phức hệ GP Ib-IX (Theo Lopez và cộng sự, 1994)

Khi xử lý GP Ib bằng chymotrypsin hay calpain sẽ giải phóng một đoạn peptide hoà tan 120 kDa được gọi là glycolalicine tương ứng với phần lớn đoạn GP Ib α ngoài màng.

Khi tiêu glycolalicin bằng trypsin sẽ cho một đoạn 45 kDa là đoạn N-tận cùng của GP Ib α và một đoạn 80 kDa. Cuối cùng là những macroglycopeptid giàu những glycosylation type O mà sialohexasaccharides chiếm phần lớn. Những phân tử acid sialic tận cùng của chuỗi các oligosaccharides nhiều nhánh chịu trách nhiệm giữ điện tích âm của GP Ib. Lopez và cộng sự (64) đã chứng minh phần ADN bổ sung cho GP Ib α gồm 610 acides amines (aa) chia làm 3 phần: ngoài màng tế bào (481aa), màng (29aa), bào tương (100aa). Phần ngoài màng của GP Ib α bao gồm 7 trình tự lặp lại và giàu leucin, hai vùng ưa nước là vùng giàu aa (“hinge region”). Bốn vị trí tiềm tàng của N-glycosylation đã được xác định ở cạnh vị trí của N tận cùng.

GP Ib β bao gồm 181 aa (63) chiếm một vùng giàu leucin và phần bào tương mang hai vị trí tiềm tàng của phosphoryl hoá. GP IX mang một vùng giàu leucin và một phần bào tương rất ngắn (6aa). Trình tự giàu leucin (24 aa) được lặp đi lặp lại và cấu tạo cơ bản gồm 3 glycoprotein của màng thuộc gia đình glycoprotein giàu leucin (85). Tính chất về cấu trúc của 3 glycoprotein được trình bày ở **hình 4**.



Hình 4. Hệ thống glycoprotein màng của các HPA- 1 đến 10

(theo Ulliamson và cộng sự , 1992)

Phức hợp GP Ib-IX đã được gắn trên bề mặt của tiểu cầu không bị hoạt hoá mà ở đó chúng tác động qua lại với những tương bào ở đầu C tận cùng của GP Ibα và của Actine- Binding- Protein (hình 3). Khi tiểu cầu hoạt hoá nó sẽ chuyển sang hệ thống ống mở (43).

2.1.2. Chức năng của phức hợp GP Ib-IX

a. Thụ thể của yếu tố vWF

Vị trí cố định của vWF nằm trên đoạn N tận cùng của GP Ibα. Tác động qua lại GP Ib-IX/vWF cần sự có mặt của các cation $2+$ và vWF hút trên bề mặt (khuôn mẫu của nội mô). vWF hoà tan chỉ liên kết hiệu lực với phức hợp GP Ib-IX có mặt ở ristocetine, kháng sinh có thể dẫn đến sự thay đổi bề mặt tiểu cầu hoặc phân tử vWF.

b. Thụ thể của thrombin:

GP Ibα có 2 receptor có ái lực một cao, một thấp với thrombin nằm trên phần N tận cùng 45 kDa. Hoạt hoá tiểu cầu bởi thrombin độc lập với

một thụ thể đặc hiệu, ngược lại phức hợp GP Ib α IX có vai trò trong động học hoạt hoá và chỉ cần 1 lượng ít thrombin.

2.2. GP V

Gồm glycoprotein 82 kDa, có 11 000 copy/tiểu cầu. Nó cũng như GP Ib và GP IX gia đình của glycoprotein giàu leucine. Dạng phức hợp liên kết đồng hoá trị như phức hợp GP Ib-IX so với phân tử GP V cho 2 phức hợp GP Ib-IX.

2.3. Phức hợp GP IIb- IIIa

2.3.1. Cấu trúc

Khi tiểu cầu không hoạt hoá thì có 40000 đến 50000 copie của phức hợp GP IIb-IIIa trên bề mặt và khoảng 30000 copie bổ sung liên quan với màng của SCO và hạt α . Sự giữ lại bên trong tiểu cầu được biểu hiện trên bề mặt tiểu cầu khi có tiết do sự có mặt của những yếu tố hoạt hoá tiểu cầu (thrombin, collagen...). Thụ thể này tham gia với vitronectin (VnR) trong họ của tế bào dính là một phân trong gia đình lớn của nó bao gồm các thụ thể giúp cho sự dính tế bào bên ngoài hay trong những phản ứng giữa những tế bào với tế bào (44). Những thụ thể này được tạo ra bởi liên kết không đồng hoá trị và calci- phụ thuộc vào hai dưới đơn vị: dưới đơn vị α (140 đến 180 kDa) được coi là đặc hiệu của thụ thể, một dưới đơn vị β (90 đến 100 kDa) chung cho nhiều kiểu thụ thể (xem Bảng 2).

Bảng 2. Đại gia đình integrin

		Định danh	Ligand	Phân bố
$\beta 1$	$\alpha 1$	VLA-1	Coll, Lm	Lympho T act., nguyên bào sợi, tế bào gan, ...
	$\alpha 2$	VLA-2, Ia-IIa	Coll I-IV	Lympho T act., nguyên bào sợi, biểu mô, TB đơn nhân, TB nội mô, tiểu cầu
	$\alpha 3$	VLA-3	Fn, Lm, Coll	Lympho T act., nguyên bào sợi, TB biểu mô, TB đơn nhân, nội mô

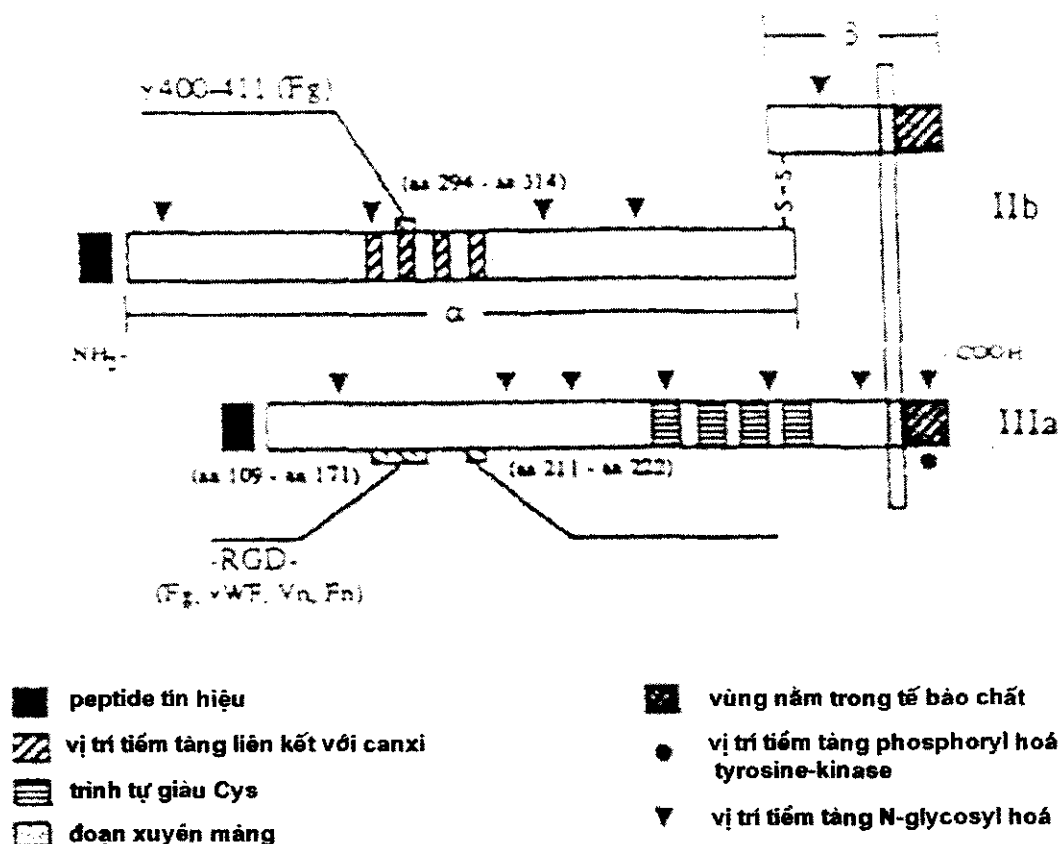
	$\alpha 4$	VLA-4, LPAM-2	Fn, VCAM-1	Lympho T act., myelolymphoblast, thymocyte
	$\alpha 5$	VLA-5, Ic-IIa	Fn	Lympho bào, TB biểu mô, nội mô, tiểu cầu
	$\alpha 6$	VLA-6, Ic'-IIa	Lm	Lympho T act., TB biểu mô, nội mô, tiểu cầu
	$\alpha 7$		Lm	
	$\alpha 8$		?	
	αV		Vn, fn(?)	
$\beta 2$	αL	LFA-1	ICAM-1, ICAM-2	Lympho B, T, TB đơn nhân, đại thực bào, bạch cầu hạt
	αM	Mac-1	C3bi, Fg, fact.X, ICAM-1	TB đơn nhân, đại thực bào, bạch cầu hạt
	αX	p150,95	Fg, C3bi	TB đơn nhân, đại thực bào, bạch cầu hạt
$\beta 3$	αIIb	GP IIb-IIIa	Fg, Fn, TSP, vWF, Vn	Tiểu cầu
	αV	VnR Osteopontin	Vn, Fn, vWF, TSP, Coll	Tiểu cầu, TB nội mô
$\beta 4$	$\alpha 6$		Lm	TB biểu mô
$\beta 5$	αV		Vn	TB biểu mô
$\beta 6$	αV		Fn	
$\beta 7$	$\alpha 4$	LPAM-1	Fn, VCAM-1	Lympho bào
	αIEL		?	
$\beta 8$	αV		?	

act.: hoạt hoá

a. GP IIb: đó là một glycoprotein có 145 kDa bao gồm hai dưới đơn vị, GP IIb α (125 kDa) và GP IIb β (23 kDa). ADNc của GP IIb mã hoá cho các chuỗi sau khi giải mã cho chuỗi nặng (GP II α) có 871 aa và chuỗi nhẹ (GP IIb) có 137 aa còn lại là liên quan giữa chúng với nhau bằng một cầu disulfur

(6) (Hình 5). GP IIb α tạo nên phần chính của ngoài màng là GP IIb. Phần quan trọng của GP IIb và tế bào của GP IIIa là biểu lộ của phức hợp trên bề mặt tiểu cầu gồm hai dưới đơn vị (GP IIb và GP IIIa)(24). Như vậy tính chất cấu tạo quan trọng của 4 trình tự lặp lại gồm 65 aa mà mỗi phần gồm 12 aa tương tự tế bào có vị trí cố định của Ca²⁺ của calmodulin. GP IIb β nằm trong vùng xuyên màng gồm 26 aa, 9 cầu disulfur chia GP IIb thành những chuỗi nhẹ và chuỗi nặng giữa những Cystein 826 (GP IIb α) và 880 (GP IIb β) (13). GP IIb mang những chuỗi oligosacchridic phức hợp giàu đường và mang 5 sites tiềm tàng của glycosylation type N (67)

b. GP IIIa: Glycoprotein này có 90 kDa tương ứng với dưới đơn vị β_3 integrin thuộc họ cytoadhesin. Nó gồm có một chuỗi polypeptit 762aa. GP IIIa có đặc tính chứa nhiều cystein (56) mà đa số tham gia tạo thành các cầu S-S trong phân tử. Các cầu S-S bị khử oxy dẫn đến sự thay đổi cấu tạo của GP IIIa làm cho protein giảm chuyển động tương đối (110 kDa) khi điện di SDS-PAGE. Có thể xác định nhiều nét đặc trưng về cấu trúc như sau : 1) Đầu cuối -N (từ aa 1 đến 62) giàu cysteine và kháng lại các proteaza; 2) vùng từ aa số 101 đến 422 tham gia vào ngưng kết các protein dính và tương tác với GP IIb; 3) vùng từ aa số 423 đến 622 giàu cystein và kháng lại các proteaza, được nối vào đầu cuối -N của phân tử bằng một cầu S-S (Cys 5- Cys 435); 4) vùng xuyên qua màng (từ aa số 693 đến 721) kết nối tiếp theo với vùng nguyên sinh chất (từ aa số 722 đến 762) (13,14). Vùng kháng lại các proteaza bao gồm một trình tự (~ 40 aa) lặp đi lặp lại 4 lần và gồm có 31 cystein GP IIIa đều tham gia vào cầu S-S (13). Vùng trong nguyên sinh chất chứa một vị trí có tiềm tàng photphat hoá do threonin làm đại diện (27). GP IIIa chứa 7 vị trí tiềm tàng glycosyl hoá. Glycosyl hoá này chiếm 15% khối lượng GP IIIa và giàu mannose (67).



Hình 5. Cấu trúc của phức hợp GP IIb-IIIa (theo Souza, Ginberg và cs, 1990)

Sự liên kết GP IIb và GP IIIa lại thành một phức hợp đòi hỏi sự có mặt của calci ở một hoặc nhiều vị trí gắn trên GP IIb.

2.3.2. Chức năng

a. Kết dính tiểu cầu

Phức hợp GPIIb-IIIa có thể gắn fibrinogen cũng như các protein dính khác chứa trình tự RGD: fibronectin, vitronectin. Nhưng fibrinogen là protein chính tham gia vào kết dính tiểu cầu. Như Gawaz và cs. (34) đã chỉ ra, phức hợp GP IIb-IIIa một mình nó có thể bảo đảm ngưng tập tế bào khi fibrinogen có mặt. Khi fibrinogen muốn gắn lên phức hợp GP IIb-IIIa thì tiểu cầu phải được hoạt hoá trước. Điều này gợi ý rằng phức hợp GP IIb-IIIa tồn tại ở nhiều trạng thái cấu trúc gắn liền với hoạt tính của nó. Giả thuyết này đã được khẳng định bằng sử dụng các kháng thể đơn clon kháng epitop "hoạt

tính phụ thuộc" (2 ; Abraham and Shattil, 1991). Sự điều hoà hoạt tính (của cấu trúc) phức hợp này có thể phụ thuộc về trạng thái phosphoryl hoá GP IIIa (79,106). Những tiểu cầu không hoạt hoá có thể gắn vào fibrinogen (hoặc fibrin) hấp thụ trên bề mặt nhờ phức hợp GP IIb-IIIa làm trung gian (91). Đó là lý do cho phép các tiểu cầu tham gia vào cấu tạo cục nghẽn *in vivo* (86).

Ba vị trí gắn fibrinogen đã được xác định trên phức hợp GP IIb-IIIa: 1) một vị trí gắn trình tự RGD trên GP IIIa (aa số 109 đến 171); 2) một vị trí gắn của 12 peptit -HHLGGAKQAGDV- (aa số 400 đến 411) chuỗi g của fibrinogen trên GP IIb (aa số 296 đến 306) và 3) một vị trí gắn trên GP IIIa (aa số 211 và 222) cho một trình tự chưa được xác định (83). Các cơ chế tương tác giữa fibrinogen và phức hợp GP IIb-IIIa còn chưa được sáng tỏ.

Tuy nhiên, một nghiên cứu mới chỉ ra rằng 12 peptit chuỗi g fibrinogen có một vai trò trội nhất trong ngưng tập tiểu cầu (25)

Ngưng tập tiểu cầu cũng cần sự tham gia của các cơ chế dính khác của tiểu cầu (GP Ia-IIa/collagen, ...) dẫn đến sự cố định các phức hợp để tạo cục nghẽn. Khi tác nhân kích thích yếu, ví dụ liều ADP thấp, fibrinogen có thể tách ra khỏi thụ thể, lúc đó sự ngưng tập là có hồi phục. Quá trình này có thể giúp cho việc kết dính những đứt đoạn của nội mạc xảy ra khi giãn mạch. Ngưng tập không hồi phục xảy ra khi có nồng độ cao chất cảm ứng liên quan với hiện tượng tiết.

b. Sự trải ra ("platelet spreading")

Những tiểu cầu không thể hiện phức hợp GP IIb-IIIa (é suy nhược tiểu cầu Glanzmann) có khả năng dính vào dưới nội bì nhưng không thể trải ra được như tiểu cầu bình thường (75). Tuy có nhiều thụ thể kết dính khác tham gia vào hiện tượng trải ra nhưng phức hợp GP IIb-IIIa vẫn có vai trò quan trọng đặc biệt do tác động qua lại với collagen sau khi đã gắn một protein dính (30).

c. Truyền tín hiệu

Ngoài vai trò quan trọng là ngưng tập tiểu cầu, phức hợp GP IIb-IIIa cũng can thiệp vào việc truyền tín hiệu tế bào bằng nhiều cách: 1) sự gắn của

fibrinogen có thể dẫn đến tăng cường các trao đổi Na^+/H^+ (4); 2) có thể có vai trò làm kênh calci (31); 3) sau khi thrombin và chất cảm ứng khác hoạt hoá tiểu cầu, quá trình phosphoryl hoá nhiều protein được điều hoà do sự gắn fibrinogen lên phức hợp (26); và 4) sự gắn các protein dính lên phức hợp GP IIb-IIIa gây hoạt hoá calpain tiểu cầu (29). Chức năng kép làm vai trò thụ thể cho các protein dính và truyền tín hiệu quan sát được ở phức hợp GP IIb-IIIa có vẻ là một đặc điểm chung cho nhiều integrin (119).

d. Liên kết trên khung tế bào và sự co cục máu đông

Sau khi tiểu cầu được hoạt hoá, phức hợp GP IIb-IIIa tác động qua lại với sợi actin và myosin (81). Sự tác động qua lại này có thể được thực hiện qua trung gian talin (5). Hiện tượng này được phối hợp với sự kết nối các protein dính và tập hợp các thụ thể. Sự co cục máu đông phụ thuộc vào tác động qua lại này, tạo ra mối liên kết giữa hệ thống co lại (actin/myosin) của tiểu cầu và fibrin.

2.4. VLA-2 (phức hợp GP Ia-IIa)

Kháng nguyên VLA (Very Late Antigen) tạo ra họ thứ hai của những integrin được miêu tả đầu tiên trên lympho T hoạt hoá và tiếp theo trên nhiều loại tế bào khác nhau (3). Nhiều kháng nguyên VLA (VLA-2, VLA-5 và VLA-6) đã được nhận biết trên tiểu cầu (41). Những thụ thể này là các phức hợp gồm hai phân tử không đồng nhất, không đồng hoá trị và phụ thuộc calci, dưới đơn vị α (140 đến 165 kDa) và dưới đơn vị β_1 (110 đến 130 kDa). Giải trình tự ADNc các dưới đơn vị α của VLA cho thấy có trình tự giống nhau với các integrin khác cũng như có một số đặc tính cấu trúc chung : 1) số và vị trí cystein như nhau; 2) có 3 đến 4 vị trí tiềm tàng để gắn calci giống như ở các protein loại calmoduline; có một vùng xuyên qua màng duy nhất tiếp theo một vùng nguyên sinh chất ngắn (40,98). Ngược lại, trình tự dưới đơn vị β_1 là đặc hiệu thuộc họ các kháng nguyên VLA.

2.4.1. Cấu trúc

Đặc điểm dưới đơn vị β_1 (GP IIa) 110/130 kDa là phân tử đơn kết hợp với dưới đơn vị α_2 (GP Ia) 160/170 kDa (khử oxy/không khử oxy). Dưới đơn

vị α_2 cũng có một trình tự 191 aa mang tên "I-đoạn" lồng vào vùng ngoài tế bào giống trình tự đã được tìm thấy ở dưới đơn vị α của các integrin loại β_2 thuộc họ Leu-CAM ("Leukocyte Adhesion Molecule") (3). Vùng đặc biệt này có trình tự (23-41 %) giống nhau với vùng protein của khuôn sụn và vWF, hai protein này tham gia vào gắn collagen (98).

2.4.2. Chức năng

Phức hợp này là thụ thể: collagen Mg^{2++} - phụ thuộc (97). Sự có mặt collagen sợi được trình diện ở dưới nội mạc, gây cảm ứng hoạt hoá tiểu cầu. Các tiểu cầu biểu hiện ở bề mặt khoảng 800 bản sao và không tiết nội sinh như với phức hợp GP IIb-IIIa (18). Phức hợp GP Ia-IIa cũng đã được nhận định trên tế bào sợi, bạch cầu, tế bào nội mô và tế bào gây ung thư (82). Tuy nhiên, tính đặc hiệu có vẻ phụ thuộc vào loại tế bào biểu hiện nó. Ví dụ trong tế bào nội mô, phức hợp này phản ứng với laminine (55).

2.5. GP IV

2.5.1. Cấu trúc

GP IV có một chuỗi polypeptit duy nhất 88kDa, 26% khối lượng là hydrat-carbon. Glycoprotein này được biểu hiện trên bề mặt tiểu cầu và SCO với tổng số 12.000 (1) đến 20.000 bản sao/tiểu cầu (60). Nhiều loại tế bào khác biểu hiện GP IV như tế bào biểu mô, bạch cầu đơn nhân ... (54). Trọng lượng GP IV có thể thay đổi từ 78 đến 88 kDa tùy theo glycosyl hoá đặc hiệu với loại tế bào biểu hiện nó. Việc tách dòng ADNc của GP IV làm sáng tỏ nhiều đặc điểm cấu trúc đặc biệt (78) : 1) có 2 vùng xuyên màng, ở đuôi -C và ở đuôi N, vị trí peptit không bị cắt trong quá trình trưởng thành của tế bào (những đuôi -N và -C nằm ở phía nguyên sinh chất); 2) một trình tự liên kết tiềm tàng với màng; 3) một trình tự giàu prolin; 4) 10 vị trí tiềm tàng glycosyl hoá loại N và 10 cystein không tham gia vào cầu S-S (không có thay đổi về chuyển động tương đối bằng SDS-PAGE với sự có mặt của tác nhân khử oxy).

2.5.2. Chức năng

GP IV là một trong những thụ thể collagen trên tiểu cầu. Nó đóng một vai trò sớm trong quá trình gắn collagen với sự can thiệp của một số thụ thể khác (38). Người ta đã cho rằng thrombospondin (TSP) có thể là một chất nối GP IV, nhưng các tiểu cầu không biểu hiện GP IV (tiểu cầu Nak-âm tính) và các tiểu cầu thường gắn TSP với tỷ lệ như nhau (100,50).

Khi tế bào hoạt hoá, GP IV cũng có vai trò trong quá trình truyền xuyên màng các dấu hiệu hoạt hoá tế bào. Nhiều protein (collagen và kháng thể đa dòng hoặc đơn dòng) khi gắn lên trên GP IV gây cảm ứng hoạt hoá tiểu cầu bằng cụm biệt hoá nhiều thụ thể. Loại hiện tượng này giống như những gì xảy ra ở các thụ thể ghép đôi với tyrosin-kinase (10).

III. DANH PHÁP

Những đặc điểm chính của các hệ thống kháng nguyên tiểu cầu được mô tả trên sẽ tóm tắt trong bảng 1. Bảng này tóm tắt những đặc điểm các hệ thống kháng nguyên chính và kháng nguyên hiếm của tiểu cầu.

Cho đến nay nhiều kháng thể đã được sử dụng trong định nhóm kháng nguyên tiểu cầu. Tùy theo giai đoạn và kỹ thuật sử dụng, tên gọi của kháng nguyên tiểu cầu cũng khác nhau.

Khi sử dụng kỹ thuật huyết thanh học người ta chỉ có thể xác định được cấu trúc khác nhau của polysaccharide hay protein bình thường do đó tên gọi theo cổ điển của 5 hệ chính được ghi trong bảng 1. Những kỹ thuật đó là: phản ứng ngưng kết, miễn dịch huỳnh quang hoặc ELISA. Tuy nhiên nó vẫn có nhược điểm là không xác định được đầy đủ kháng nguyên. Nhờ kỹ thuật sinh học phân tử xác định những glycoprotein của kháng nguyên chúng ta đã định được nhiều kháng nguyên mới của tiểu cầu và người ta đã đặt tên cho nó theo kỹ thuật mới (như đã ghi trong Bảng 3).

Bảng 3. Hệ thống danh pháp mới của kháng nguyên tiểu cầu

Tên gọi hiện nay	Năm phát hiện	Kháng nguyên	Tên trước đây	Tần số gen	Đa hình	Định khu
HPA-1	1959	HPA-1a	Zw ^a , PI ^{A1}	0.830	Leu ³³	GP IIIa
		HPA-1b	Zw ^b , PI ^{A2}	0.170	Pro ³³	"
HPA-2	1961	HPA-2a	Ko ^b	0.920	Thr ¹⁴⁵	GP Ib α
		HPA-2b	Ko ^a	0.080	Met ¹⁴⁵	"
HPA-3	1980	HPA-3a	Bak ^a , Lek ^a	0.992	Ile ⁸⁴³	GP IIb α
		HPA-3b	Bak ^b	0.008	Ser ⁸⁴³	"
HPA-4	1985	HPA-4a	Pen ^a , Yuk ^b	0.992	Arg ¹⁴³	GP IIIa
		HPA-4b	Pen ^b , Yuk ^a	0.008	Gln ¹⁴³	"
HPA-5	1988	HPA-5a	Br ^b , Zav ^b	0.890	Glu ⁵⁰⁵	GP Ia
		HPA-5b	Br ^a , Zav ^a , Hc ^a	0.110	Lys ⁵⁰⁵	"
HPA-6w	1992	HPA-6a	Tu ^b	?	Arg ⁴⁸⁹	GP IIIa
		HPA-6b	Tu ^a , Ca	<0.01	Gln ⁴⁸⁹	"
HPA-7w	1992	HPA-7a	/	?	Pro ⁴⁰⁷	GP IIIa
		HPA-7b	Mo ^a	<0.01	Ala ⁴⁰⁷	"
HPA-8w	1990	HPA-8a	/	?	Cys ⁶³⁶	GP IIIa
		HPA-8b	Sr ^a	<0.01	Arg ⁶³⁶	"
HPA-9w	1995	HPA-9a	/		Val ⁸³⁷	GP IIb
		HPA-9b	Max ^a		Met ⁸³⁷	"
HPA-10w	1997	HPA-10a	/		Arg ⁶²	GP IIIa
		HPA-10b	La ^a		Gln ⁶²	"
Gov	1990	/	Gov ^a	0.532	?	GP 150
			Gov ^b	0.468	?	"
Gro	1992	/	Gro ^a	<0.01	?	GP IIIa
						"

IV. CÁC KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN TIỂU CẦU

Các kỹ thuật định nhóm kháng nguyên tiểu cầu: bằng kỹ thuật huyết thanh học người ta đã đưa ra rất nhiều sự lựa chọn khác nhau cho người sử dụng tuy nhiên kỹ thuật huyết thanh học chưa có độ nhạy cao và thời gian thực hiện kỹ thuật dài. Ví dụ như MPHA- Mixed Passive Hemagglutination test, kháng thể đơn dòng đặc hiệu cố định lên kháng nguyên tiểu cầu và tiếp tục làm ELISA. Tuy nhiên vẫn gặp những khó khăn như kháng thể lưu hành có trong bệnh nhân cố định lên tiểu cầu thì những trường hợp này khó khẳng định được, đặc biệt là anti-2a và anti-3b.

Kỹ thuật sinh học phân tử ra đời đã giải quyết được rất nhiều vấn đề trong đó có định nhóm máu nói chung và định nhóm kháng nguyên tiểu cầu nói riêng. Kỹ thuật định nhóm bằng ADN nó không phụ thuộc vào kháng thể đặc hiệu với tiểu cầu hoặc tiểu cầu tươi mà chỉ cần một lượng máu hoặc tổ chức rất ít cũng đủ để định nhóm HPA. Sự đa hình của 8 kháng nguyên đặc hiệu của tiểu cầu chủ yếu nằm trên GP. Kỹ thuật PCR-RFLP có thể định nhóm được HPA-1,2,3 và 5, tuy nhiên phương pháp này phải sử dụng enzym đặc hiệu để cắt ADN. Bên cạnh đó nó không định nhóm được cho HPA-4 mặc dù người ta đã sử dụng enzym CviR1 cho HPA-4 PCR-RFLP nhưng không cho kết quả tốt. Ngoài ra còn có kỹ thuật ASPCR (Allele specific PCR) để định nhóm HPA-2,3 và 4, tuy nhiên nó vẫn chưa đáp ứng được cho việc định nhóm toàn bộ các kháng nguyên tiểu cầu. Kỹ thuật ngày nay được sử dụng nhiều nhất trong các labo huyết học là PCR-SSP (PCR- Sequence-Specific Primer).

V. ỨNG DỤNG: NHỮNG BỆNH DI TRUYỀN ĐÔNG MÁU LIÊN QUAN VỚI CÁC GLYCOPROTEIN MÀNG

Nhiều bệnh di truyền đông máu có nguyên nhân do cấu trúc tiểu cầu (màng, hạt nhỏ) hoặc chuyển hoá tiểu cầu bị sai lạc (75,84). Các bệnh hay gặp nhất là hội chứng Bernard-Soulier và suy nhược tiểu cầu Glanzmann có tác động bởi tính chất dính của tiểu cầu. Hội chứng Bernard-Soulier liên quan với biểu hiện không bình thường của phức hợp GP Ib-IX gây ra một thiếu hụt đặc hiệu của tính kết dính. Suy nhược tiểu cầu Glanzmann kết hợp với một thay đổi của phức hợp GP IIb-IIIa gây giảm ngưng tập tiểu cầu. Hai bệnh này nằm ở nhiễm sắc thể thường-lặn, tuy rằng có một trường hợp đã được mô tả như một thể nhiễm sắc thể thường- trội do biến đổi của hội chứng Bernard-Soulier (70).

5.1. Hội chứng Bernard-Soulier (BSS)

Hội chứng này có các đặc điểm thời gian chảy máu kéo dài, biểu hiện giảm thrombin, các tiểu cầu trở thành "khổng lồ" và có thể xảy ra xuất huyết nghiêm trọng. Tiểu cầu các bệnh nhân này to hơn tiểu cầu bình thường hai đến ba lần và hình dạng có xu hướng trở nên hình cầu (55).

Tiểu cầu có sự thiếu hụt đặc hiệu của GP Ib và các protein phối hợp với nó là GP IX và GP V. Khi phức hợp GP Ib-IX vắng mặt, tiểu cầu không gắn vWF và kết dính dưới nội mô giảm đi nhiều. Các tiểu cầu BSS ngưng tập bình thường không tùy thuộc chất cảm ứng trừ khi có lượng thrombin thấp. Trong điều kiện đó, mật độ ngưng tập giảm đi và khởi động của nó được chậm lại ("lag phase"). Tiểu cầu BSS bất bình thường về cấu trúc màng tương bào và sự phân bố các phospholipit (80, 7). đời sống của nó rất hạn chế, từ 24 giờ đến 3 ngày so với từ 8 đến 10 ngày ở tiểu cầu bình thường (75).

Hội chứng Bernard-Soulier không đồng bộ về mặt phân tử, hiện nay chia làm hai loại:

1. Loại thứ nhất có đặc điểm phức hợp GP Ib-IX giảm rất nhiều hoặc vắng mặt trên bề mặt tiểu cầu người bệnh. Một số đột biến liên quan với BSS đã được xác định trong gen GP Ib α (113; 94) và GP IX (116) (Hình 3). Mặc

dù các đột biến này chỉ là một trong những tác động đến duy nhất một dưới đơn vị của phức hợp, nó liên quan với hiện tượng ba glycoprotein ($Ib\alpha$, $Ib\beta$ và IX) không được biểu hiện trên bề mặt tiểu cầu của những bệnh nhân này.

2. Loại thứ hai tương đương với những biến đổi của hội chứng Bernard-Soulier. Đó là sự rối loạn chức năng của phức hợp GP Ib -IX mặc dù được biểu hiện (với tỷ lệ thay đổi) trên bề mặt tiểu cầu. Hai đột biến này đã được xác định là nằm trong vùng giàu leucin của GP $Ib\alpha$ (21; 70). Hai đột biến này tác động đến sự cố định vWF vì người ta cho rằng trình tự giàu leucin có thể tham gia vào việc cố định vWF hoặc chắc chắn hơn là tạo ra một hình dạng cấu trúc cần thiết để cho vị trí gắn bó cục ra ngoài.

5.2. Suy nhược tiểu cầu Glanzmann (TG)

Nhiều bệnh nhân từ khi ra đời, đã có biểu hiện xuất huyết từ nhẹ đến nghiêm trọng ở dưới da và thời gian chảy máu kéo dài. Ngoài ra số lượng và hình dạng tiểu cầu vẫn bình thường. Tiểu cầu TG không ngưng tập với tất cả các loại chất cảm ứng (ADP, collagen, thrombin và epinephrin) (35). Các tiểu cầu này dính vào khuôn dưới nội mô nhưng không tạo được cục nghẽn (114). Ngoài sự giảm ngưng tập và quá trình trải ra ngay cả khi lực co rất mạnh (114;89), các chức năng tiểu cầu khác như kết dính, biến đổi hình dạng và sự tiết đều bình thường. Cuối cùng sự co lại của cục máu không xảy ra hoặc xảy ra hạn chế. Sự khác nhau về mức độ co lại của cục máu này đánh dấu nhiều loại TG. Caen (12) phân biệt hai dưới nhóm bệnh:

a. TG typ I : 75% các bệnh nhân suy nhược tiểu cầu thuộc vào dưới nhóm này và có đặc điểm là tiểu cầu chứa ít hơn 5% của GP IIb - $IIIa$ bình thường. Ở một số bệnh nhân GP $IIIa$ có thể tới 15% trường hợp là bình thường cùng với tỷ lệ GP IIb được biểu hiện ít hơn 3%. Sự khác nhau về biểu hiện giữa hai dưới nhóm có thể phụ thuộc vào sự kết hợp của GP $IIIa$ với dưới đơn vị α_v của thụ thể vitronectin (19). Điều này gợi ý rằng có sự bất thường nằm trong gen GP IIb . Về mặt phân tử, TG typ I không đồng nhất như các nghiên cứu đầu tiên về trình tự mã hoá cho GP IIb và $IIIa$ của bệnh nhân suy nhược tiểu cầu được trình bày ở bảng 1.

b. TG typ II: Dưới nhóm này gồm 16 % các bệnh nhân suy nhược tiểu cầu. Ở bệnh nhân này phức hợp GP IIb-IIIa được biểu hiện trên bề mặt tiểu cầu nhưng có số lượng nhỏ hơn bình thường (giữa 5 đến 25%) (48, 47, 76). Các hạt nhỏ α tiểu cầu chứa từ 30 đến 70% khối lượng bình thường của fibrinogen. Đây là một đặc điểm đáng chú ý vì fibrinogen trong tiểu cầu là kết quả của một quá trình nội sinh hoạt hoá phụ thuộc vào phức hợp GP IIb-IIIa (39). Điều này chứng tỏ rằng TG typ II là do tổng hợp phức hợp bị giảm đi hơn là do một đột biến tác động đến chức năng hoặc do một quá trình hình thành và đi tới màng sinh chất. Newman và cs (74) đã nhận dạng một đột biến Arg (216) $\rightarrow$ Gln trong GP III liên quan với TG typ II. Sự biểu hiện GP IIb và GP IIIa tái tổ hợp (Gln 216) trong tế bào COS chỉ ra rằng hai dưới đơn vị được tổng hợp và liên kết tạo thành một phức hợp. Tuy nhiên sự ổn định của phức hợp bị tác động và phức hợp được biểu lộ trên bề mặt tế bào với số lượng nhỏ hơn bình thường.

c. Những "dạng biến dị": Thời gian gần đây người ta đã xác định được một loại bệnh thứ ba đó là những ca ở dạng biến dị. Nhóm các bệnh nhân này có tiểu cầu không ngưng tụ mặc dù tỷ lệ GP IIb-IIIa là đủ nhưng có những tính chất khác (co cục máu, thành phần fibrinogen) rất thay đổi (76). Trong thể TG này một hoặc nhiều chức năng của phức hợp bị tác động đến. Ở loại bệnh nhân này các đột biến điểm đã được xác định và nằm chủ yếu trong một số vị trí chức năng của GP IIIa như vị trí gắn trình tự RGD hoặc vị trí gắn fibrinogen.

VI. ĐỘT BIẾN/SỰ ĐA HÌNH CÁC GLYCOPROTEIN VÀ MIỄN DỊCH TIỂU CẦU

6.1. Đột biến và kháng thể anti-isotyp (isoantibody)

Bệnh nhân bị hội chứng Bernard-Soulier typ I hoặc suy nhược tiểu cầu Glanzmann không biểu hiện các phức hợp GP IIb-IIIa và GP Ib-IX trên bề mặt của tiểu cầu. Sự truyền các tiểu cầu bình thường cho những bệnh nhân xuất huyết này có khả năng gây miễn dịch kháng glycoprotein mà chúng vắng mặt ở tiểu cầu của bệnh nhân. Nguy cơ này có thể xảy ra khi mang thai,

người mẹ có thể tạo ra kháng thể kháng tiểu cầu của con mình. Trong trường hợp đó, kháng thể sẽ qua màng nhau và có khả năng gây ra giảm tiểu cầu ở phôi thai (46). Kháng thể này có phản ứng không phụ thuộc các hệ thống kháng nguyên cùng loài (alloantigen) được gọi kháng thể anti-isotyp (là cấu trúc vùng hằng định của kháng thể có mặt ở mọi cá thể ví dụ lớp và dưới lớp kháng thể)

Đa số các kháng thể anti-isotyp kháng GPIIb-IIIa có xu hướng chống lại hai dưới đơn vị của phức hợp GP IIb hoặc GP IIIa và có khả năng ức chế tiểu cầu ngưng tập "*in vitro*" (61,20, 59, 8). Một trường hợp IgG chống lại GP Iba đã được Degos và cs. (22) xác định ở một bệnh nhân có hội chứng Bernard-Soulier được truyền máu nhiều lần. Kháng thể anti-isotyp này có khả năng gây cảm ứng một thiếu hụt chức năng giống như đã quan sát trong hội chứng Bernard-Soulier khi được ủ cùng các tiểu cầu bình thường: ức chế của kết dính trên/dưới nội mô và của ngưng kết do ristocetine hoặc yếu tố VIII của bò gây cảm ứng (101).

Những kháng thể anti-isotyp có thể làm cho các bệnh nhân này không chịu được các lần truyền máu mới do hạn chế đời sống của tiểu cầu truyền vào, kháng thể này được phát hiện nhiều năm sau phản ứng miễn dịch ban đầu. Mặt khác, đa số kháng thể anti-isotyp ức chế ngưng tập tiểu cầu và làm cho truyền máu trở nên vô hiệu.

Các kháng thể kháng Nak^a tìm thấy ở một bệnh nhân có phản ứng khi truyền máu (45) đã được phân loại lúc đầu như các kháng thể cùng loài (alloanticorps) chống lại GP IV (102). Thế nhưng, chúng tương tự các kháng thể anti-isotyp vì tiểu cầu có kiểu hình Nak^a âm không chứa GP IV ở mức độ phát hiện được (115).

6.2. Đa hình gen và miễn dịch cùng loài

Đối với cùng một gen, các trình tự mã hoá được biểu lộ ở hai người khoẻ mạnh có thể thay đổi một đến nhiều base. Những thay đổi này do đột biến điểm không ảnh hưởng đến biểu hiện gen nhưng chúng có thể dẫn đến sự thay thế một aa bằng aa khác ở trong trình tự peptid của một protein tuy

nhiên không có biến đổi về mặt biểu hiện hoặc chức năng của nó, các đột biến đại diện cho hiện tượng đa hình. Các alen của một gen tương đương với các trình tự mã hoá khác nhau được xác định bởi một hoặc nhiều hiện tượng đa hình.

Những glycoprotein tiểu cầu chính (GP Ib, GP IIb, GP IIIa, GP Ia, ...) được mã hoá bởi các gen đa hình. Những hiện tượng đa hình này làm cho các glycoprotein có khả năng gây miễn dịch. Khi một người nhận tiểu cầu từ bên ngoài (truyền máu, mang thai), có thể tạo ra các kháng thể chống lại kháng nguyên tiềm tàng do hiện tượng đa hình của glycoprotein khi glycoprotein này được mã hoá bởi một alen khác alen của chính mình. Quá trình gây miễn dịch trên cơ sở các alen khác nhau được gọi quá trình miễn dịch đồng loài. Tập hợp các alen cùng một gen tạo ra một hệ thống đôi alen hoặc đa alen (>2). Đến nay các hệ thống kháng nguyên cùng loài của glycoprotein tiểu cầu thuộc vào hệ thống đôi. Bảng 4 ghi 5 loại hệ kháng nguyên chính của tiểu cầu cũng như tỷ lệ kiểu hình của mỗi kháng nguyên cùng loài trong các dân tộc vùng Cáp-ca và Nhật.

Bảng 4. Các kháng nguyên chính ở tiểu cầu

Kháng nguyên	Định danh	Tần số kiểu hình (%)		Định khu
		Capcaz	Nhật Bản	
HPA-1a	Zw ^a , Pl ^{A1}	97,9	99,9	GP IIIa
HPA-1b	Zw ^b , Pl ^{A2}	26,5	3,7	
HPA-2a	Ko ^b	99,3	NT*	GP Ib
HPA-2b	Ko ^a , Slb α	14,6	25,4	
HPA-3a	Bak ^a , Lek ^a	87,7	78,9	GP IIb
HPA-3b	Bak ^b , Lek ^b	64,1	NT	
HPA-4a	Pen ^a , Yuk ^b	99,9	99,9	GP IIIa
HPA-4b	Pen ^b , Yuk ^a	0,2	1,7	

HPA- 5a	Br ^b , Zav ^b	99,2	NT	GP Ia
HPA-5b	Br ^a , Zav ^a , Hc ^a	20,6	NT	

(*) NT: chưa xét nghiệm

Những quá trình miễn dịch đồng loài gây ra hai bệnh lý lâm sàng do tiểu cầu bị huỷ: xuất huyết sau truyền máu (purpura post-transfusionnel-PTP) và Giảm tiểu cầu ở trẻ sơ sinh do đồng miễn dịch (thrombopenie neonatale alloimmune-NAIT).

6.2.1. Các kháng nguyên HPA

a. Hệ thống HPA-1 (PI^A, Zw)

Tiểu cầu ở bệnh nhân suy nhược tiểu cầu Glanzmann, các kháng thể kháng HPA-1a hoặc 1b giảm khả năng phản ứng với kháng nguyên và điều này đã cho phép Kunicki và Aster (58) chứng tỏ rằng epitop nhận biết có liên quan với GP IIIa.

Newman và cs. (1989) đã xác định có một đột biến T (196) ↔ C gây ra hiện tượng đa hình Leu ↔ Pro ở vị trí 33 của trình tự GP IIIa kết hợp với hệ thống kháng nguyên cùng loài HPA-1a/1b. Sự kết hợp này đã được khẳng định khi dùng một hệ thống biểu hiện (tế bào COS), trong đó Leu³³ chỉ phản ứng lại với huyết thanh kháng HPA-1a và với huyết thanh kháng HPA-1b (36). Đa hình Leu³³ ↔ Pro³³ là điều kiện cần thiết và đủ để tạo ra hệ thống kháng nguyên cùng loài HPA-1a/HPA-1b nhưng cấu trúc liên quan với epitop có vai trò kháng nguyên HPA-1 chưa được xác định. Những epitop này khu trú trong vùng 66 aa đầu cuối -N của GP IIIa chứa Leu³³/Pro³³ (11). Epitop không phụ thuộc vào các glycosyl hoá của GP IIIa nhưng phụ thuộc vào sự nguyên vẹn của các cầu S-S có ở đoạn cuối N- của GP IIIa có nghĩa rằng nó phụ thuộc vào cấu trúc ba chiều của GP III (11). Điều này được khẳng định vì không có sự ức chế các kháng thể kháng PI^{A1} và PI^{A2} gắn các peptit nhân tạo gồm 13 aa tương tự với vùng N- cuối của GPIII và chứa điểm đa hình Leu/Pro (28). Mặt khác, Honda và cs. (42) cùng Valentin và cs. (103) đã chứng tỏ rằng sự đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên HPA-1a

là dị gen. Sự biểu hiện kháng nguyên HPA-1a liên quan với sự có mặt của leucin ở vị trí 33, nhưng cấu trúc peptit xung quanh tham gia vào sự tạo thành thể quyết định kháng nguyên có thể thay đổi tùy theo các kháng thể kháng HPA-1a.

Những kháng thể cùng loài kháng HPA-1 (a hoặc b) nhận ra toàn bộ các phức hợp GP IIb-IIIa biểu hiện ở bề mặt tiểu cầu. Giả thuyết về sự tác động các kháng thể cùng loài kháng HPA-1 a/b đến chức năng tiểu cầu, sự hoạt hoá hoặc sự ức chế ngưng tập đã được chứng minh (17, 92, 105). Tuy nhiên, Ryu và cs. (87) đã chứng minh rằng một kháng thể cùng loài kháng HPA-1a ức chế ngưng tập tiểu cầu ở nồng độ bão hoà (≈ 64.000 phân tử/tiểu cầu) bằng cách ngăn cản sự cố định của fibrinogen trong khi bình thường nó gây ra sự ngưng tập chỉ cần có mặt từ 2000 phân tử kháng thể cố định lên mỗi tiểu cầu, hiệu quả tối đa là 23.500 phân tử/tiểu cầu.

b. Hệ thống HPA-2 (Ko hoặc Sib)

Sự đa hình Ko (104) và Sib (88) được xác định một cách độc lập. Các epitop Ko và Sib nằm trên chuỗi nặng của GP Ib ($Ib\alpha$) và hoàn toàn giống nhau về huyết thanh học (57, Ishida và cs., 1991). Kuijpers và cs. (56), Murata và cs. (73) đã chứng minh rằng các hệ thống kháng nguyên cùng loài Ko^a/Ko^b và Sib^a/Sib^b phụ thuộc vào cùng một đa hình của $Thr^{145} \leftrightarrow Met^{145}$ do đột biến $C(1018) \leftrightarrow T$. Trong danh pháp mới, hai hiện tượng đa hình này được tập hợp trên hệ thống kháng nguyên cùng loài HPA-2 (107). Sự biểu hiện epitop Sib^a liên quan với dạng A và B lớn nhất của đa hình GP $Ib\alpha$ (Ishida và cs., 1991, 95). Kháng nguyên Sib^a phụ thuộc vừa vào đặc điểm đa hình Thr^{145} vừa vào đoạn 5kDa của GP $Ib\alpha$ chịu trách nhiệm về trọng lượng khác nhau giữa dạng B và C, điều này khác biệt với các hệ thống kháng nguyên cùng loài khác dựa trên đặc điểm đa hình của một aa duy nhất.

Các kháng thể kháng HPA-2 ức chế sự ngưng tập tiểu cầu với vWF do tác động của ristocetin (57).

c. Hệ thống HPA-3 (Bak, Lek)

Các epitop của kháng thể cùng loài kháng Bak^a và kháng Lek^a được khu trú trên chuỗi nặng của GP IIb (IIb α) (109, 9, 53). Von dem Born và van der Plas-van Dalen (108) đã chứng minh rằng các kháng thể kháng Bak^a và kháng Lek^a là giống nhau về mặt huyết thanh. Hệ thống kháng nguyên cùng loài Bak^a/ Bak^b là do sự đa hình của Ile⁸⁴³ $\leftrightarrow$ Ser⁸⁴³ phụ thuộc vào sự thay đổi threonin (2622) thành guanin (66). Sự biểu hiện epitop Bak/Lek phụ thuộc vào sự đa hình Ile/Ser cũng như sự trưởng thành sau phiên mã của pro-GP IIb (36). Người ta xác định được vị trí nằm ở 29 aa của đầu C- GP IIb α và phụ thuộc một phần vào các carbohydrat liên quan với một serin sát Ile⁸⁴³/Ser⁸⁴³(23). Gần đây Calvete và Muniz-Diaz (15) đã chứng minh rằng Bak/Lek khu trú trên đoạn 704-856 của GP IIb và Ser⁸⁴⁷ mang glycosyl hoá typ O. Các epitop do kháng thể cùng loài nhận biết hệ thống HPA-3 có thể thay đổi tùy theo bệnh nhân (99, 23). Khả năng tạo thành kháng nguyên của các epitop này phụ thuộc vào sự có mặt của acid sialic (99). Ngược lại với các hệ thống kháng nguyên cùng loài, đặc biệt như GP IIIa và GP Ia, hệ thống HPA-3 chỉ có mặt trên tiểu cầu.

d. Hệ thống HPA-4 (Pen, Yuk)

Hệ thống kháng nguyên cùng loài Pen/Yuk được định vị trên glycoprotein IIIa (33, 93). Đột biến G (526) $\leftrightarrow$ A gây ra đa hình Arg¹⁴³ $\leftrightarrow$ Gln¹⁴³ liên quan về mặt huyết thanh để định nhóm Pen^a (Yuk^b)/Pen^b (Yuk^a) (111). Sự đa hình này là cần thiết và đủ để kiểm soát sự biểu hiện các epitop của hệ thống HPA-4 (111). Tuy nhiên epitop kháng nguyên phụ thuộc vào cấu trúc ba chiều của chuỗi polypeptit GP IIIa bởi vì các peptit đa hình không thể ức chế sự cố định các kháng thể kháng Pen lên GP IIIa (111). Sự đa hình bao gồm vị trí (aa 109 đến 171) của trình tự RGD và cho phép các kháng thể kháng Pen^a trở thành các chất hiệu quả để ức chế ngưng tập tiểu cầu (33). Tỷ lệ gắn kháng thể kháng Pen ở mức độ bão hoà giao động giữa 14 000 và 24 000 phân tử trên một tiểu cầu (không hoạt hoá) (33). Số IgG gắn này là $\approx$ 50% tổng số bản sao GP IIb-IIIa thể hiện trên bề mặt tiểu cầu không hoạt hoá khi được đo với các kháng thể đơn clon hoặc các kháng thể

kháng PI^{A1} . Vấn đề còn lại là phải tìm cách giải thích tại sao tỷ lệ gần này lại thấp.

e. Hệ thống HPA-5 (Br, Hc, Zav)

Ba phòng thí nghiệm độc lập đã cùng đưa ra hệ thống kháng nguyên cùng loài HPA-5 nằm trên GPIa được gọi hệ thống Br (52), Hc (115) và Zav (96). Ba hệ thống Br, Hc và Zav như nhau về mặt huyết thanh học (96). Hệ thống Br^a/Br^b liên quan tới đa hình $Lys^{505} \leftrightarrow Glu^{505}$ do đột biến $A(1512) \leftrightarrow G(90)$. Mặc dù số bản sao GPIa-IIa (1000 đến 2000) được thể hiện trên bề mặt tiểu cầu, các kháng thể kháng Br^a có thể gây ra PTP kết hợp với giảm tiểu cầu nghiêm trọng (26×10^9 tiểu cầu/L) (16). Đối với NAIT, giảm tiểu cầu và các triệu chứng xuất huyết do kháng thể kháng Br^a là bình thường, ít nghiêm trọng so với xuất huyết do kháng thể kháng PI^{A1} (49).

f. Hệ thống HPA-6 (Ca/Tu)

Ca (HPA-6b) và Tu là các kháng nguyên tiểu cầu có bản chất là GP IIIa do McFarland và cs mô tả (68). Các kháng nguyên Ca và Tu giống nhau về mặt huyết thanh học (68). Một số nghiên cứu về sinh học phân tử đã khẳng định sự giống nhau của hai phân tử kháng nguyên này: hệ thống kháng nguyên có tính đa hình $Arg^{489} \leftrightarrow Gln^{489}$ trên cơ sở đột biến $G(1564) \leftrightarrow A(112)$. Xác suất biểu hiện kháng nguyên HPA-6b rất ít vì trên 200 người hiến máu không có ai có tiểu cầu HPA-6b (68), nhưng đây không phải là một kháng nguyên vì đã được xác định trong nhiều gia đình không có quan hệ huyết thống với nhau (68, 57).

Bảng 5. Các kháng nguyên tiểu cầu ở người (hệ HPA)

Kháng nguyên tiểu cầu	Glycoprotein	Bazơ	Axit amin
HPA-1a (Zw^a , PI^{A1})	GP IIIa	T	Leu (33)
HPA-1b (Zw^b , PI^{A2})		C	Pro (33)
HPA-2a (Ko^b)	GP Ib α	C	Thr (145)
HPA-2b (Ko^a)		T	Met (145)

HPA-3a (Bak ^a)	GP IIb	T	Ile (843)
HPA-3b (Bak ^b)		G	Ser (843)
HPA-4a (Pen ^a , Yuk ^b)	GP IIIa	G	Arg (143)
HPA-4b (Pen ^b , Yuk ^a)		A	Gln (143)
HPA-5a (Br ^b)	GP Ia	G	Glu (505)
HPA-5b (Br ^a)		A	Gly (505)
HPA-6a	GP IIIa	G	Arg (489)
HPA-6b (Tu ^a)		C	Gln (489)
HPA-7a	GP IIIa	C	Pro (407)
HPA-7b (Mo ^a)		G	Ala (407)
HPA-8a	GP IIIa	C	Arg (636)
HPA-8b (Sr ^a)		T	Cys (636)
HPA-9a	GP IIb	G	Val (837)
HPA-9b (Max ^a)		A	Met (837)

Bảng 6. Các kháng nguyên tiểu cầu hiếm gặp

Kháng nguyên tiểu cầu	Glycoprotein	Bazơ	Axit amin
/	GP IIIa	G	Arg (633)
Gro ^a		A	His (633)
/	GP IIIa	/	/
Oe ^a		-AAG	Del.lys (611)
/	GP Ib-IX	?	?
Ly		?	?
/	GP IIb-IIIa	?	?
Va ^a		?	?
Gov ^a	GP 175	?	?
Gov ^b		?	?

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng

* Mẫu máu được lấy từ ở người cho máu tự nguyện đại diện ở ba vùng Bắc, Trung, Nam.

Miền bắc: Viện Huyết học- Truyền máu trung ương, Hà nội.

Miền trung: Trung tâm truyền máu khu vực miền trung, Huế.

Miền nam: Trung tâm truyền máu khu vực phía nam, Cần thơ.

* Được khám lâm sàng theo quy định của người hiến máu, bảo đảm là những người khoẻ mạnh, không có bệnh mãn tính và không có quan hệ huyết thống.

* Dân tộc Kinh.

Chúng tôi dựa trên công thức:

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \cdot P \cdot Q}{d^2} = 245$$

Trong đó:

n: cỡ mẫu nghiên cứu tối thiểu.

$Z_{1-\alpha/2}$: hệ số tin cậy, ứng với độ tin cậy 95% thì $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$

$P = 0.8$

$Q = 0.2$

d: độ chính xác tuyệt đối mong muốn, với $d = |\mu - X|$, trong đó μ là số trung bình ước đoán của quần thể, X là số trung bình đo được trên mẫu điều tra.

Dựa vào công thức này, dự kiến $n = 287$.

2. Phương pháp nghiên cứu

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng kỹ thuật SHPT để định nhóm kháng nguyên tiểu cầu, PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction- Sequence Specifique- Primers); PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism)

2.1. Dụng cụ và hoá chất

Dụng cụ:

Pipett 5 và 10 ml.

Micropipettes và đầu côn phù hợp với các loại micropipettes.

Cân chính xác (Mettler Toledo AB204).

Máy đo pH (Mettler Toledo 320 pH Metter)

Ly tâm lạnh (Avanti 30 Centrifuge Beckman).

Ống nghiệm các loại: tubes Falcon 15 ml, 50 ml, Eppendorf 1,5 ml.

Máy vortex.

Máy khuếch đại gen (GeneAmp-PCR System 9700 của Applied Biosystems).

Máy điện di (Power Pac 300 của BioRad).

Hoá chất:

Tách ADN

Sucrose	SDS 20%
TRITON X100 (Sigma)	HCL
NaCl	EDTA-Na
Isopropanol (Sigma)	Na Perchlorate (Sigma)
TRIS (Prolabo)	Na acetate (Labosi)

MgCl₂ (Merck)

Cồn 70°C

Thực hiện phản ứng PCR-SSP

DNTP (Invitrogen)

MgCl₂(VNBiolabs)

Nước cất tinh sạch

Taq DNA polymerase (VNBiolabs)

Đệm cho Taq

Mỗi đặc hiệu cho từng kháng nguyên (Invitrogen)

2.2. Kỹ thuật tách ADN

Tách AND theo phương pháp Perchlorat và Proteinase K(S.A. Miller, D.D.Dykes, H.F.Polesky. Nucleic acid research 1988; 16: 1215-1218)

Chuẩn bị hoá chất cần thiết:

1- Lyse I: (cho 1 lít)

	Nồng độ cuối cùng
102 g sucrose	0,3M
10 mL Tris HCl 1 M pH	7,510mM
1 g MgCl ₂ .6 H ₂ O	5mM
10 mL Triton 100 Sigma	1 %
Nước cất vừa đủ	1 litre

2- Lyse II: (cho 500 mL)

2,19 g NaCl (MM: 58,4 g/mol)	0,075 M
4,46 g EDTA (MM: 372,2 g/mol)	0,024 M

Pha trong 400 mL, điều chỉnh pH8 bằng NaOH sau đó cho vừa đủ 500 mL.

- 3 - SDS (Sodium dodecyle sulfate): 10 g trong 100 mL
- 4 - Sodium perchlorate 5M (MM: 122,4 g/mol): 61,2 g trong 100 mL
- 5 - NaCl 6M (MM: 58,4 g/mol): 70 g trong 200 mL
- 6 - Côn tuyệt đối
- 7 - Côn 70°

Lấy mẫu: máu lấy chống đông trong EDTA: khoảng 7ml máu, sau khi lấy xong cần được lắc kỹ để tránh bị đông, nếu mẫu chưa tách ADN ngay thì được bảo quản ở -70°C cho đến khi sử dụng. Các mẫu máu được lấy ở Huế và Cần thơ sẽ bảo quản ở nhiệt độ -20°C và vận chuyển ra Hà nội trong đá bảo đảm mẫu không bị tan đông trong quá trình vận chuyển.

Tách ADN

*** Phá vỡ hồng cầu**

- Máu lấy chống đông lắc nhẹ nhàng, tránh để bị đông để không mất bạch cầu. Nếu máu đang được bảo quản ở -70°C thì bỏ ra nhiệt độ phòng để tan đông tự nhiên.
- Thêm vào đó dung dịch Lyse I cho đủ 50 ml
- Trộn đều rồi ly tâm 4200 vòng/ 10 phút / 4°C
- Loại bỏ nước nổi, thu được cặn trắng, nếu cặn vẫn còn màu hồng của hồng cầu thì tiếp tục phá hồng cầu bằng lyse I.

*** Phá vỡ bạch cầu**

Cho vào cặn trắng thu được sau khi đã phá vỡ hồng cầu:

- 4,5 ml dung dịch lyse II
- 125 ml SDS 10%
- 1,1 ml Perchlorat de sodium 5M

10 ml Proteinase K 10mg/ml

Dùng pipet trộn đều rồi ủ 42°C/30 phút/ lắc nhẹ

* Loại bỏ protein

Thêm 2ml NaCl 6M

Trộn đều, ly tâm 3500 vòng/15 phút/ 4°C

* Tủa ADN

Lấy nước nổi sang một tube sạch mới,

Thêm vào 2,5 V cồn tuyệt đối, lắc nhẹ, ủ ở – 30°C ít nhất 1 giờ

Ly tâm 4200 vòng/ 10 phút / 4°C, lấy cạn, rửa cạn bằng cồn 70 °C

Để khô cạn và tan cạn tủa trong TE.

2.3. Trình tự mỗi của các kháng nguyên (theo Jau-Yi Lyou và cộng sự. Transfusion 2002; 42: 1089-1095)

	Mỗi	Trình tự
1	HGF-f	5 – GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA 3
	HGF-r	5 – TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C 3
2	HPA-5 a	5 – AGG AAG AGT CTA CCT GTT TAC TAT CAA AG 3
	HPA-5 b	5 - AGG AAG AGT CTA CCT GTT TAC TAT CAA AA 3
	HPA5 common	5 – CTC TCA TGG AAA ATG GCA GTA 3
3	HPA4 a	5 – AGC TGG CCA CCC AGA TGC G 3
	HPA4 b	5 – AGC TGG CCA CCC AGA TGC A 3
	HPA4 common	5 – AAG GAT GCT GTC CTG GCG TCT GGA G 3
4	HPA3 a	5 – GGG GGA GGG GCT GGG GA 3
	HPA3 b	5 – GGG GGA GGG GCT GGG GC 3
	HPA3 common	5 – GGC CCT GGG ACT GTG AAT G 3

5	HPA2 a	5 – CCC CCA GGG CTC CTG AC 3
	HPA2 b	5 – CCC CCA GGG CTC CTG AT 3
	HPA2 common	5 – GCC AGC GAC GAA AAT AGA GG 3
6	HPA1 a	5 – ACT TAC AGG CCC TGC CTC T 3
	HPA1 b	5 – ACT TAC AGG CCC TGC TC 3
	HPA1 common	5 – GTG CAA TCC TCT GGG GAC T 3

2.4. Phản ứng PCR- SSP

Chạy PCR: thành phần cho một phản ứng PCR-SSP là 10 μ l, bao gồm:

Buffer 10X	1 μ l	Môi HGF f	1 μ l
dNTPs 25mM	1 μ l	Môi HGF r	1 μ l
Môi a hoặc b	1 μ l	Taq 5UI/ μ l	0.2 μ l
Môi chung c	1 μ l	AND	1 μ l
		Nước	3 μ l

Chương trình chạy như sau: 95°C: 10 giây, 13 chu kỳ (95°C: 10 giây, 63°C: 30 giây, 72°C: 30 giây), 22 chu kỳ (95°C: 10 giây, 58°C: 30 giây, 72°C: 30 giây), , 72°C: 5 phút, 4°C.

Điện di đọc kết quả: điện di trên gen agarose 2%, 100v/ 15 phút. Nhuộm BET(Ethidium Bromide), đọc kết quả dưới đèn UV.

Kích thước từng loại sản phẩm:

Allel	Sản phẩm (bp)
HPA-1a	189
HPA-1b	189
HPA-2a	241
HPA-2b	241
HPA-3a	293
HPA-3b	293
HPA-4a	195
HPA-4b	195
HPA-5a	255
HPA-5b	255
HGF	440

2.5. Phản ứng PCR-RFLP cho HPA-3 và 5

PCR-RFLP cho HPA-3

Exon 26 GP IIb

RFLP3-a 5' CCT GGG CCT GAC CAC TCC TT 3'

RFLP3-b 5' CCA CAG AGG CCC ACA GCA CA 3'

- **Primers : 40 pmoles/ μ l**
- **0,5 μ g DNA của mẫu nghiên cứu**
- **dNTP = dATP + dCTP + dTTP + dGTP = 25 mM**

Thành phần của PCR cho một mẫu nghiên cứu

- 1µl	Primer 1	- 5µl	Tp10 X Qiagen
- 1µl	Primer 2	- 2µl	MgCl ₂ 25 mM
- 1µl	dNTP	- 0,2µl	Taq Qiagen (1 U)
- 2,5µl	DMSO	- 1 µl	DNA 0,5 µg
⇒ nước cất vừa đủ 50µl (36,3µl)			

Chú ý có một ống không cho ADN

Chu kỳ nhiệt

	Kéo dài	Biến tính	Lai
1 chu kỳ	-	94°C 5 min	64°C 2 min
32 chu kỳ	72°C 30 sec	94°C 30 sec	64°C 20 sec
1 chu kỳ	72°C 2 min	-	-

Perkin Elmer 2400, 9700

Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

Xử lý enzym: Enzyme *Fok I*, site 5' GGATG(9)/ 3'
3' CCTAC(13)/.....5'

- 8µl sản phẩm PCR
- 0,5µl enzyme *Fok I* (2 U)
- 2µl dung dịch đệm của enzym
- Nước cất vừa đủ 20µl (9,5µl)

Ủ tối thiểu 2 giờ ở 37°C sau đó để vào bình cách thủy 94°C cho đến khi nhiệt độ xuống đến 80°C. Ly tâm nhanh rồi đặt tube vào đá cho đến khi điện di

Điện di trên gel polyacrylamide để đọc kết quả

- Gel polyacrylamide 8 %, dày 1 mm, thành phần gồm có:

- 8 ml bis-acrylamide 40 %
- 4 ml TBE 10 X
- Nước cất vừa đủ 40 ml (28 ml)
- 240 μ l persulfate d'ammonium 10 %
- 30 μ l TEMED

Đổ gel dưới đèn vàng khoảng 20 phút sau khi đổ gel lên kính

• Chuẩn bị mẫu :

Mẫu	- Tất cả các mẫu đã xử lý enzym
	- 4 μ l màu xanh (bromophenol + xylene)

Chứng không xử lý enzym	- 4 μ l ADN-PCR không xử lý enzym
	- 4 μ l màu xanh

AND chuẩn	- 0,5 μ l PhiX174
	- 4 μ l màu xanh

Điện di khoảng 2 giờ/ 200 V/ đệm TBE 1X, (chú ý khi màu xanh đến gần cuối gel thì dừng)

Nhuộm gel trong bromure ethidium (BET), lắc nhẹ trong khoảng 10 phút

Đọc kết quả dưới đèn UV và chụp ảnh

Phân tử : HPA-3 (không xử lý enzym: 259 bp)

HPA-3 a/a	HPA-3 a/b	HPA-3 b/b
-	226	226
191	191	-
35	35	-
33	33	33

PCR-RFLP của HPA-5

Exon ? GP Ia

RFLP5-a 5' GTG ACC TAA AGA AAG AGG 3'

RFLP5-b 5' CTC TCA TGG AAA ATG GCA G 3'

- **Primers : 20 pmoles/ μ l**
- **0,5 μ g DNA của mẫu nghiên cứu**
- **dNTP = dATP + dCTP + dTTP + dGTP = 25 mM**

Thành phần của PCR cho một mẫu nghiên cứu

- 1 μ l	Primer 1	- 4 μ l	MgCl ₂ 25 mM
- 1 μ l	Primer 2	- 0,2 μ l	Taq Qiagen (1 U)
- 0.5 μ l	dNTP	- 1 μ l	DNA 0,5 μ g
- 5 μ l	Tp10 X Qiagen	$\Rightarrow$ nước cất vừa đủ 50 μ l (36,3 μ l)	

Chú ý có một ống không cho ADN

Chu kỳ nhiệt

	Biến tính	Lai	Kéo dài
1 chu kỳ	95°C 5 min.	-	-
30 chu kỳ	94°C 30 sec	51°C 20 sec	72°C 30 sec
1 chu kỳ	-	-	72°C 5 min.

Perkin Elmer 2400 , 9700

Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

Xử lý enzyme cho HPA-5

Enzyme *Mnl I* , site CCTC(7/6)

- 10 µl sản phẩm PCR
- 0,4µl enzyme *Mnl I* (2 U)
- 2µl dung dịch đệm của enzyme
- Nước cất vừa đủ 20 µl (7.6 µl)

Ủ tối thiểu 4 giờ ở 37°C sau đó để vào bình cách thủy 94°C cho đến khi nhiệt độ xuống đến 80°C. Ly tâm nhanh rồi đặt tube vào đá cho đến khi điện di

Điện di trên gel polyacrylamide để đọc kết quả

- Gel polyacrylamide 8 %, dày 1 mm, thành phần gồm có:
 - 8 ml bis-acrylamide 40 %
 - 4 ml TBE 10 X
 - Nước cất vừa đủ 40 ml (28 ml)
 - 240 µl persulfate d'ammonium 10 %
 - 30 µl TEMED

Đổ gel dưới đèn vàng khoảng 20 phút sau khi đổ gel lên kính

- Chuẩn bị mẫu :

Mẫu	- Tất cả các mẫu đã xử lý enzym - 4 µl màu xanh (bromophenol + xylene)
Chứng không xử lý enzym	4 µl ADN-PCR không xử lý enzym - 4 µl màu xanh
AND chuẩn	- 0,5 µl PhiX174 - 4 µl màu xanh

Điện di khoảng 2 giờ/ 200 V/ đệm TBE 1X, (chú ý khi màu xanh đến gần cuối gel thì dừng)

Nhuộm gel trong bromure ethidium (BET), lắc nhẹ trong khoảng 10 phút

Đọc kết quả dưới đèn UV và chụp ảnh

- Phân tử của: HPA-5 (không xử lý enzym: 274 bp)

HPA-5 b/b	HPA-5 a/b	HPA-5 a/a
169	169	-
-	136	136
98	98	98
-	33	33
7	7	7

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ

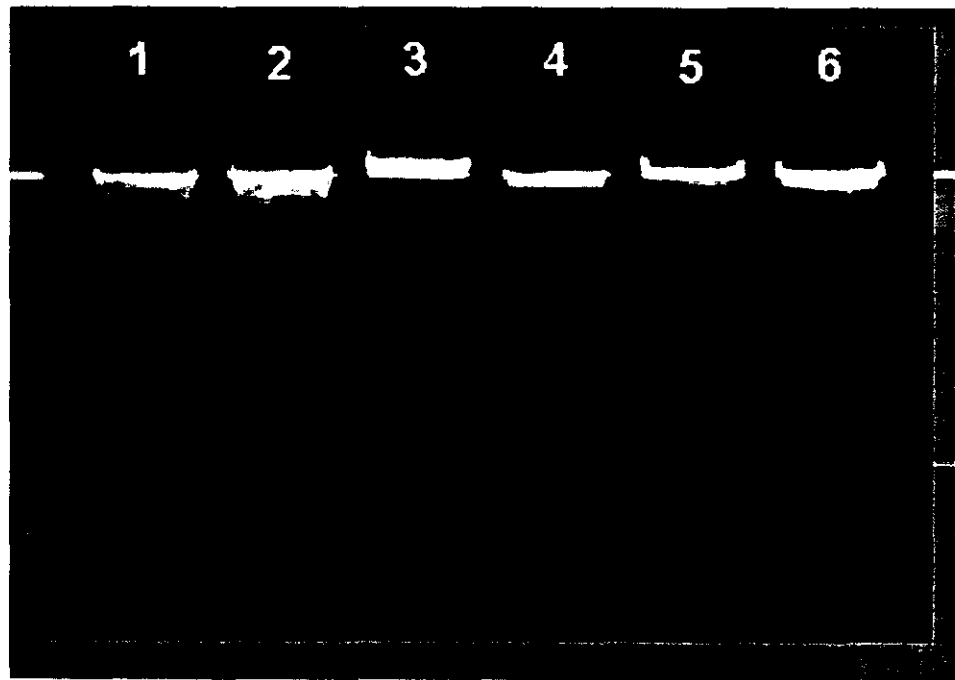
Sau khi tách ADN từ máu toàn phần chúng tôi tiến hành điện di ADN trên gel agarose 0,8% để kiểm tra sơ bộ số lượng và chất lượng ADN. Sau đó chúng tôi tiến hành đo trên máy quang phổ kế để tính ra nồng độ ADN có trong mỗi mẫu. Công thức tính:

$$[\text{ADN}] \mu\text{g/ml} = \text{OD}_{260} \cdot \text{Hệ số pha loãng} \cdot 50$$

Đánh giá độ tinh khiết của ADN qua tỷ số $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$. ADN được coi là tinh khiết khi $1,6 < \text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} < 2$.

Bảng . Hàm lượng và độ tinh khiết của ADN tách bằng kỹ thuật Perchlorat

Số mẫu	OD_{260}	OD_{280}	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$	ADN ($\mu\text{g/ml}$)
1	0,0323	0,0165	1,955	32,30
2	0,0329	0,0175	1,875	32,90
3	0,0034	0,0176	1,900	33,40
4	0,0294	0,0158	1,862	29,40
5	0,0335	0,0184	1,821	33,50



Hình 1: Điện di ADN kiểm tra sau khi tách từ máu toàn phần

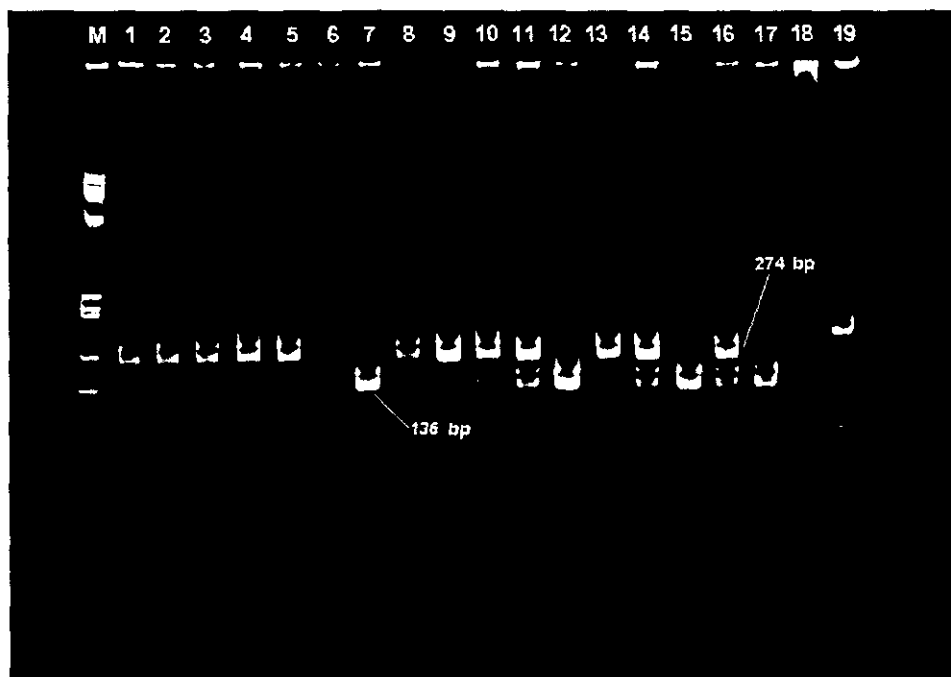
Đây là hình ảnh ADN điện di trên gel agarose 0,8%, kết quả cho thấy băng ADN gọn, sắc, không còn lẫn protein và ADN không bị gãy.

Như đã trình bày ở chương II, chúng tôi tính sự phân bố kiểu gen và tần số gen được xác định dựa vào định luật HARDY-WEINBERG.

$$q^2AA : 2q(1-q)Aa : (1-q)^2aa$$

Trong đó: q : là tần số của gen A

$1 - q$: là tần số của gen a



Hình 2: Điện di sản phẩm PCR- RFLP: HPA-5

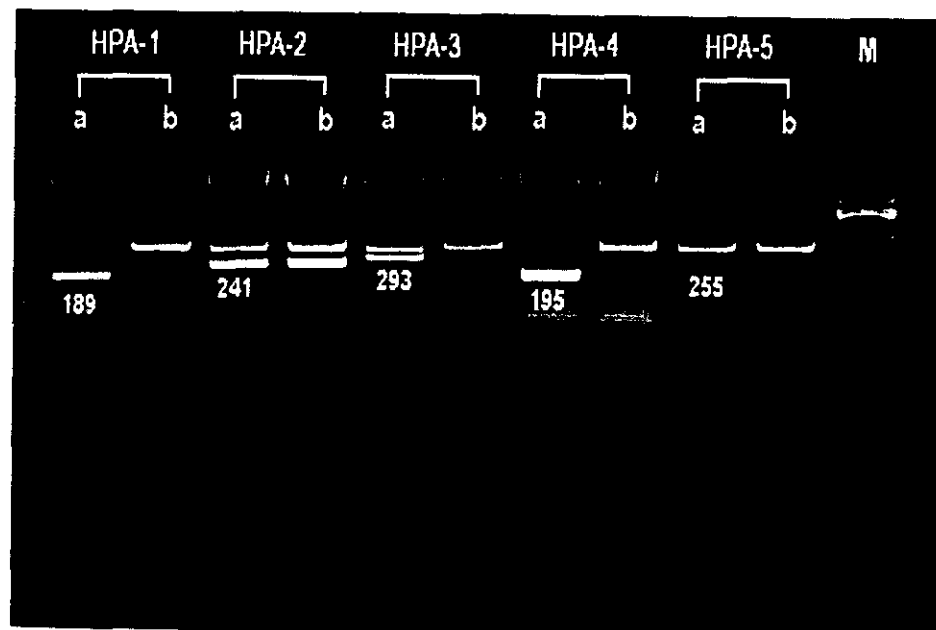
Hình 2 cho thấy kết quả của định nhóm HPA-5 bằng kỹ thuật PCR-RFLP, trong 19 mẫu được xét nghiệm chúng tôi không thấy băng 98bp xuất hiện (băng đặc hiệu của HPA-5b) mà chỉ có băng 136bp (băng đặc hiệu của HPA-5a) như vậy toàn bộ số mẫu trên chỉ mang kháng nguyên HPA-5a và không có HPA-5b.



Hình 3: Điện di sản phẩm PCR-SSP- HPA-1 đến HPA- 5 của 1 ADN

Hình 3 cho thấy kết quả định nhóm của các kháng nguyên tiểu cầu từ HPA-1 đến HPA-5. Trên tất cả các mẫu điện di đều có băng 440 bp, đây là băng để kiểm tra phản ứng có chạy tốt hay không (gọi là băng nội kiểm- Internal positive control), nếu không có băng này xuất hiện có nghĩa là phản ứng không đạt yêu cầu, cần phải làm lại mới có thể xác định kết quả được. Trên hình này HPA-1a có băng 189 bp và không có ở HPA-1b như vậy người này chỉ mang kháng nguyên HPA-1a. Ở HPA-2, chúng tôi thấy có cả hai băng

241 bp xuất hiện như vậy người này mang cả hai kháng nguyên HPA-2a và 2b. Đối với nhóm HPA-3 chúng tôi cũng thấy sự xuất hiện cả hai băng ở 293 bp như vậy người này mang cả hai kháng nguyên HPA-3a và 3b. Nhóm HPA-4, sau khi điện di chỉ thấy xuất hiện một băng 195 bp ở HPA-4a còn 4b thì không có như vậy người này chỉ có kháng nguyên HPA-4a. Nhóm HPA-5 cũng như vậy chỉ có băng 255 bp của kháng nguyên 5a còn kháng nguyên 5b không có như vậy người này chỉ có kháng nguyên HPA-5a. Kết luận đối với ADN này: HPA-1a; HPA-2a,2b; HPA-3a,3b; HPA-4a; HPA-5a.



Hình 4: Điện di sản phẩm PCR-SSP- HPA-1 đến HPA- 5 của 1 ADN

Cũng như phân tích trên hình 3, chúng tôi thấy đối với ADN này chỉ có băng ở HPA-1a, 2a,2b,3a,4a, 5a. Kết luận đối với ADN này: HPA-1a; HPA-2a,2b; HPA-3a; HPA-4a; HPA-5a.

Kết quả: qua phân tích ADN của 289 người kinh, Việt nam chúng tôi quan sát và tính sự phân bố kiểu gen và tần số gen được xác định dựa vào định luật HARDY-WEINBERG:

$$q^2AA: 2q(1-q)Aa : (1-q)^2aa$$

Trong đó: q: là tần số của gen A

1- q: là tần số của gen a

Dựa theo công thức trên chúng tôi tính tần số kiểu hình và kiểu gen của các quần thể bắc, trung, nam. Kết quả được trình bày ở các bảng sau:

3.1.Tần suất kiểu hình, kiểu gen của HPA-1→ HPA- 5

Bảng 1: Tần số kiểu hình HPA ở người Kinh, miền Bắc Việt nam

Kiểu hình HPA (n=107)		Tần số
HPA-1	a+ b-	0.972
	a+ b+	0.028
	a- b+	0.0
HPA-2	a+ b-	0.906
	a+ b+	0.094
	a- b+	0.0
HPA-3	a+ b-	0.215
	a+ b+	0.542
	a- b+	0.243
HPA-4	a+ b-	1.000
HPA-5	a+ b-	0.944
	a+b+	0.056
	a- b+	0.0

Bảng 2. Tần số kiểu gen HPA ở người kinh, miền Bắc Việt Nam

Kiểu gen HPA (n=107)	Tần số
HPA-1a	0.986
HPA-1b	0.014
HPA-2a	0.953
HPA-2b	0.047
HPA-3a	0.599
HPA-3b	0.401
HPA-4a	1.000
HPA-4b	0.000
HPA-5a	0.972
HPA-5b	0.028

Qua kết quả ở bảng 1, 2 chúng tôi thấy tần số HPA-1a, 2a,5a chiếm trên 90%, riêng HPA-4a chiếm 100%, còn HPA-3a, b chiếm 50%

Bảng 3. Tần số kiểu hình HPA ở người Kinh, miền trung Việt Nam

Kiểu hình HPA (n= 87)		Tần số
HPA-1	a+ b-	0.977
	a+ b+	0.023
	a- b+	0.0
HPA-2	a+ b-	0.827
	a+ b+	0.161
	a- b+	0.011
HPA-3	a+ b-	0.276
	a+ b+	0.552
	a- b+	0.172
HPA-4	a+ b-	1.000
HPA-5	a+ b-	0.920
	a+ b+	0.080
	a- b+	0.0

Bảng 4. Tần số kiểu gen HPA ở người kinh, miền trung Việt Nam

Kiểu gen HPA (n=87)	Tần số
HPA-1a	0.986
HPA-1b	0.011
HPA-2a	0.908
HPA-2b	0.092
HPA-3a	0.552
HPA-3b	0.448
HPA-4a	1.000
HPA-4b	0.000
HPA-5a	0.960
HPA-5b	0.040

Qua kết quả ở bảng 3,4 chúng tôi thấy tần số HPA-1a, 5a chiếm trên 90%, riêng HPA-4a chiếm 100%, còn HPA-3a,b chiếm 50%.

Bảng 5. Tần số kiểu gen HPA ở người Kinh, miền nam Việt Nam

Kiểu gen HPA (n=95)	Tần số
HPA-1a	0.987
HPA-1b	0.013
HPA-2a	0.927
HPA-2b	0.073
HPA-3a	0.528
HPA-3b	0.472
HPA-4a	1.000
HPA-4b	0.000
HPA-5a	0.966
HPA-5b	0.034

Bảng 6. Tần số kiểu hình HPA ở người kinh, miền nam Việt Nam

Kiểu hình HPA (n= 95)	Tần số
HPA-1 a+ b-	0.975
a+ b+	0.025
a- b+	0.0
HPA-2 a+ b-	0.854
a+ b+	0.146
a- b+	0.0
HPA-3 a+ b-	0.257
a+ b+	0.542
a- b+	0.201
HPA-4 a+ b-	1.000
HPA-5 a+ b-	0.932
a+ b+	0.068
a- b+	0.0

Qua kết quả ở bảng 5,6 chúng tôi thấy tần số HPA-1a, ,5a chiếm trên 90%, riêng HPA-4a chiếm 100%, còn HPA-3a,b chiếm 50%.

3.2. Tần suất kiểu hình, kiểu gen của HPA-6 →15

Riêng quần thể người kinh ở miền bắc và miền trung chúng tôi kết hợp với viện truyền máu quốc gia Pháp tiến hành định nhóm HPA-6,7,8,9,10,11,15. Kết quả ghi nhận ở bảng 7, 8.

Bảng 7: Tần số kiểu hình HPA- 6,7,8,9,10,11,15 ở quần thể người kinh sống ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam.

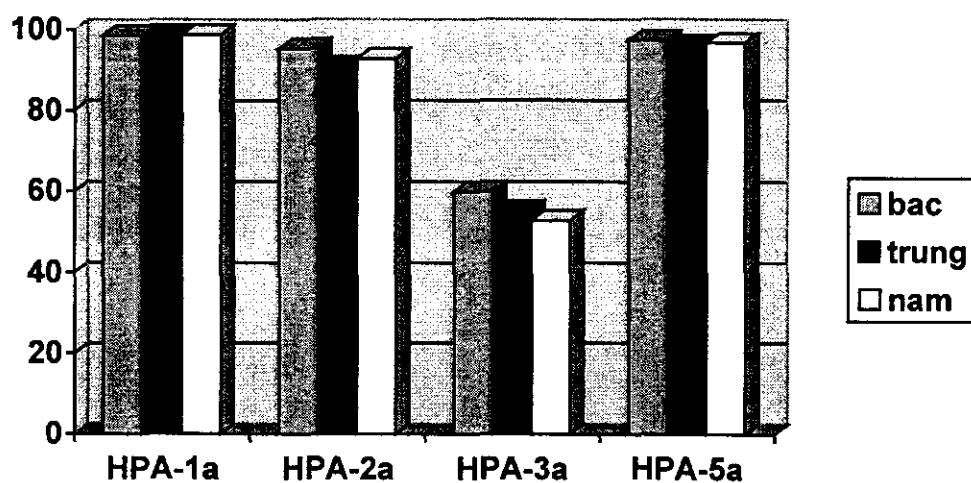
Kiểu hình HPA		Tần số miền Bắc (n=107)	Tần số miền Trung (n=87)	Tần số chung Việt Nam
HPA-6	a+ b-	0.972	0.967	0.970 ± 0.004
	a+ b+	0.028	0.033	0.031 ± 0.004
	a- b+	0.000	0.000	0.000
HPA-7	a+ b-	1.000	1.000	1.000
	a+ b+	0.000	0.000	0.000
	a- b+	0.000	0.000	0.000
HPA-8	a+ b-	1.000	1.000	1.000
	a+ b+	0.000	0.000	0.000
	a- b+	0.000	0.000	0.000
HPA-9	a+ b-	1.000	1.000	1.000
	a+ b+	0.000	0.000	0.000
	a- b+	0.000	0.000	0.000
HPA-10	a+ b-	1.000	1.000	1.000
	a+ b+	0.000	0.000	0.000
	a- b+	0.000	0.000	0.000
HPA-11	a+ b-	1.000	1.000	1.000
	a+ b+	0.000	0.000	0.000
	a- b+	0.000	0.000	0.000
HPA-13	a+ b-	1.000	1.000	1.000
	a+ b+	0.000	0.000	0.000
	a- b+	0.000	0.000	0.000
HPA-14	a+ b-	1.000	1.000	1.000
	a+ b+	0.000	0.000	0.000
	a- b+	0.000	0.000	0.000
HPA-15	a+ b-	0.186	0.319	Khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$
	a+ b+	0.578	0.361	
	a- b+	0.235	0.319	

Bảng 8: Tần số kiểu gen HPA-6,7,8,9,10,11,13,14,15 của miền Bắc và miền Trung

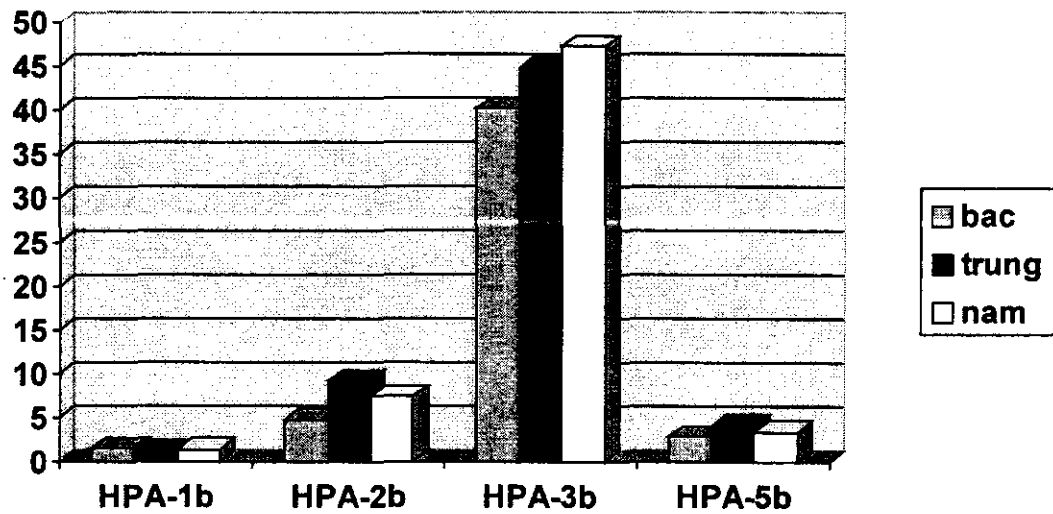
Kiểu gen HPA	Tần số miền Bắc (N=107)	Tần số miền Trung (N=87)	Tần số chung Việt Nam
HPA-6a	0.986	0.984	0.985 ± 0.001
HPA-6b	0.014	0.016	0.015 ± 0.001
HPA-7a	1.000	1.000	1.000
HPA-7b	0.000	0.000	0.000
HPA-8a	1.000	1.000	1.000
HPA-8b	0.000	0.000	0.000
HPA-9a	1.000	1.000	1.000
HPA-9b	0.000	0.000	0.000
HPA-10a	1.000	1.000	1.000
HPA-10b	0.000	0.000	0.000
HPA-11a	1.000	1.000	1.000
HPA-11b	0.000	0.000	0.000
HPA-13a	1.000	1.000	1.000
HPA-13b	0.000	0.000	0.000
HPA-14a	1.000	1.000	1.000
HPA-14b	0.000	0.000	0.000
HPA-15a	0.521	0.507	0.514 ± 0.001
HPA-15b	0.478	0.492	0.485 ± 0.001

Như vậy qua nghiên cứu trên quần thể người kinh sống ở 3 vùng Bắc, Trung, Nam thì tần suất xuất hiện kháng nguyên HPA khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Kháng nguyên chiếm tỷ lệ cao là HPA-1a, HPA-2a và HPA-5a, riêng đối với HPA-4a chiếm tỷ lệ 100% điều này cũng giống kết quả nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới. Đối với kháng nguyên HPA-3 thì có xuất hiện đầy đủ các kiểu hình đồng hợp tử aa-bb và dị hợp tử ab, đây chính là nguy cơ gây miễn dịch đồng loại mà chúng tôi sẽ bàn luận đến ở phần sau.

3.3. So sánh tần suất kiểu gen HPA1→ 5 giữa 3 vùng bắc, trung, nam.



Biểu đồ 1. Tần suất gen HPA1a,2a,3a,5a giữa các vùng



Biểu đồ . Tần suất gen HPA1b,2b,3b,5b giữa các vùng.

Biểu đồ 1 và 2 thể hiện tần số gen của HPA1 đến 5 cho thấy sự khác biệt giữa các vùng không có ý nghĩa thống kê.

Như vậy, qua nghiên cứu trên 289 người cho máu khoẻ mạnh, không có bệnh mãn tính, không có quan hệ huyết thống, chúng tôi đã tính toán và đưa ra tần suất kiểu hình và kiểu gen của HPA ở người Việt nam như sau:

Bảng 9. Tần số kiểu hình HPA ở người Việt Nam

Kiểu hình (n=289)		Tần số
HPA-1	a+b-	0.9747 ± 0.0025
	a+b+	0.0253 ± 0.0025
	a-b+	0
HPA-2	a+b-	0.8623 ± 0.0402
	a+b+	0.1340 ± 0.0355
	a-b+	0.0037 ± 0.0064
HPA-3	a+b-	0.2493 ± 0.0312
	a+b+	0.5453 ± 0.0058
	a-b+	0.2053 ± 0.0357
HPA-4	a+b-	1.000
HPA-5	a+b-	0.932 ± 0.012
	a+b+	0.068 ± 0.012
	a-b+	0

Bảng 10. Tần số kiểu gen HPA ở người Việt Nam

Kiểu gen (n=289)	Tần số
HPA-1a	0.9863 ± 0.0006
HPA-1b	0.0127 ± 0.0015
HPA-2a	0.9293 ± 0.0226
HPA-2b	0.0707 ± 0.0226
HPA-3a	0.5597 ± 0.0361
HPA-3b	0.4403 ± 0.0361
HPA-4a	1.000 ± 0.000
HPA-4b	0.000
HPA-5a	0.966 ± 0.006
HPA-5b	0.034 ± 0.006

CHƯƠNG 4

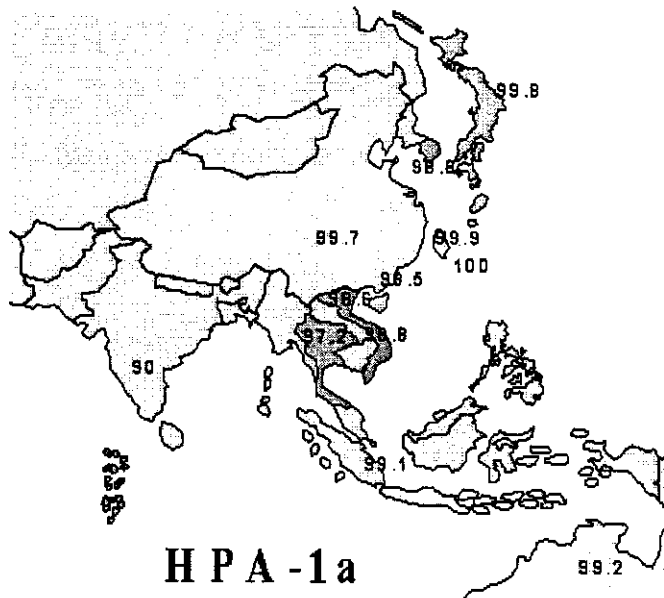
BÀN LUẬN

4.1. So sánh giữa các vùng

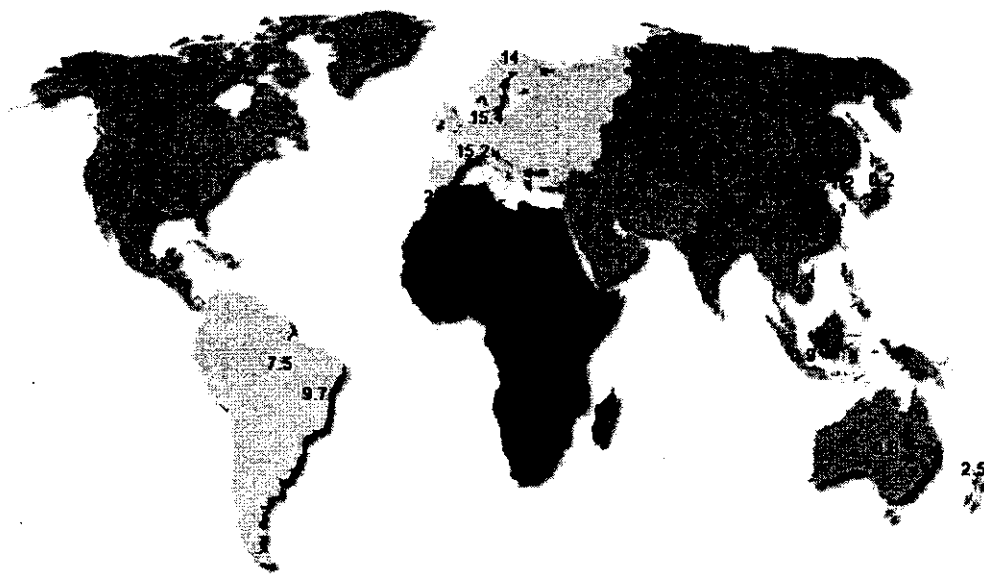
Qua các biểu đồ 1,2 so sánh kết quả giữa các vùng bắc trung nam chúng tôi thấy không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê. Như vậy có thể coi đây là tần suất gen của người Việt nam (dân tộc kinh).

Trong số 5 HPA thì HPA-3 có biểu hiện kiểu gen dị hợp tử cao nhất, đây cũng chính là nguyên nhân gây kháng thể đồng miễn dịch cao nhất. Đặc biệt HPA-4 không có 4ab hoặc 4bb mà chỉ có 4aa, có thể không có kháng nguyên 4b cũng giống như trong RH không có gen d mà chỉ có D.

So sánh của HPA-1a trong châu á chúng tôi thấy tần suất ở người Việt nam(98,8%) thấp hơn so với Trung quốc, Nhật, Triều tiên(99,9%), như vậy nguy cơ gây miễn dịch là có và khả năng gặp là cao hơn so với họ (bản đồ HPA-1a).

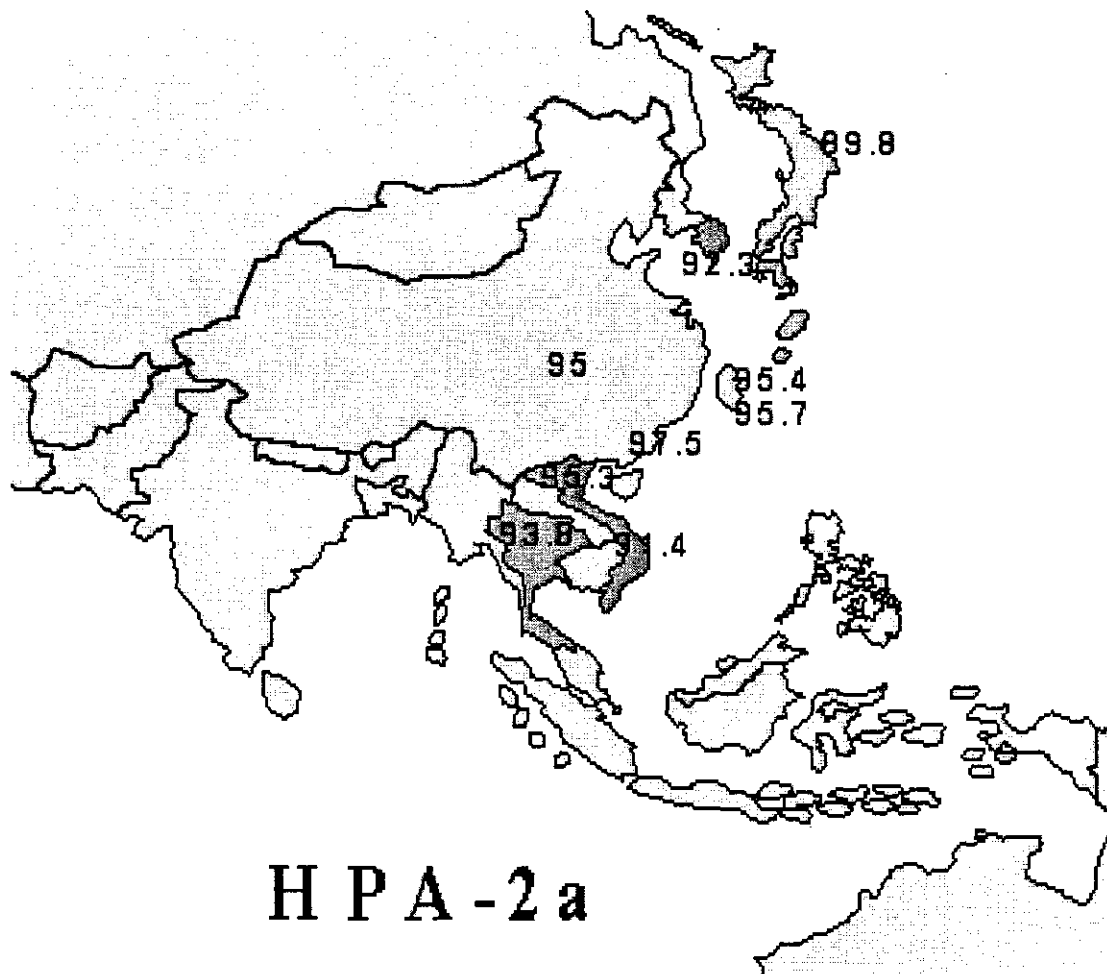


Trong khi đó so sánh HPA-1b ở chúng ta là 1.2% còn ở châu Âu và châu Mỹ thì tỷ lệ này cao hơn vì vậy khả năng gây miễn dịch cao hơn và bệnh giảm tiểu cầu do nguyên nhân miễn dịch cũng cao hơn. So sánh với các nước trong khu vực và trên thế giới chúng ta thấy HPA- 1b gặp nhiều ở Tây Âu khoảng 15 %, còn ở Bắc Phi là 25%. Châu Á hiếm gặp, tỷ lệ thấp: khoảng 1%, châu Úc cũng vậy (0,8%). Như vậy khả năng có bệnh lý về đồng miễn dịch của kháng nguyên này ở người Việt Nam là thấp tuy nhiên nếu có thì sẽ rất nặng nhất là trong trường hợp bào thai và mẹ. (bản đồ HPA-1b)

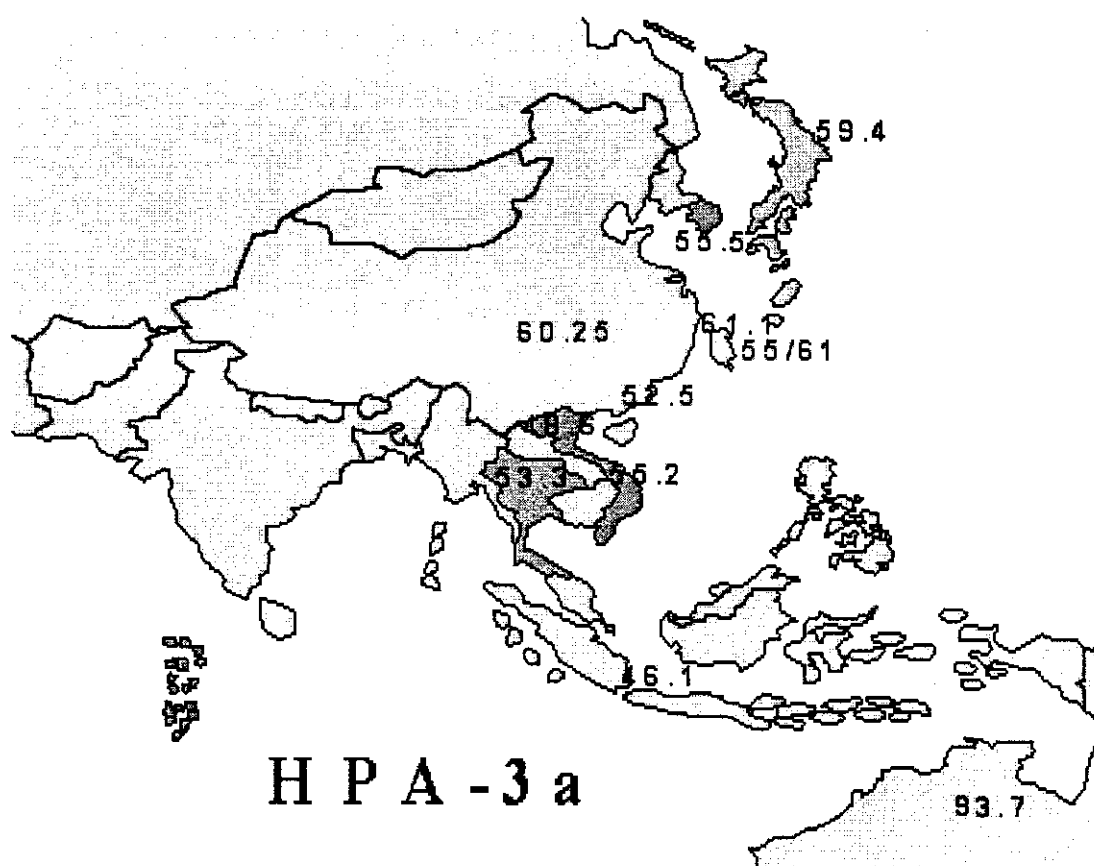


HPA-1b

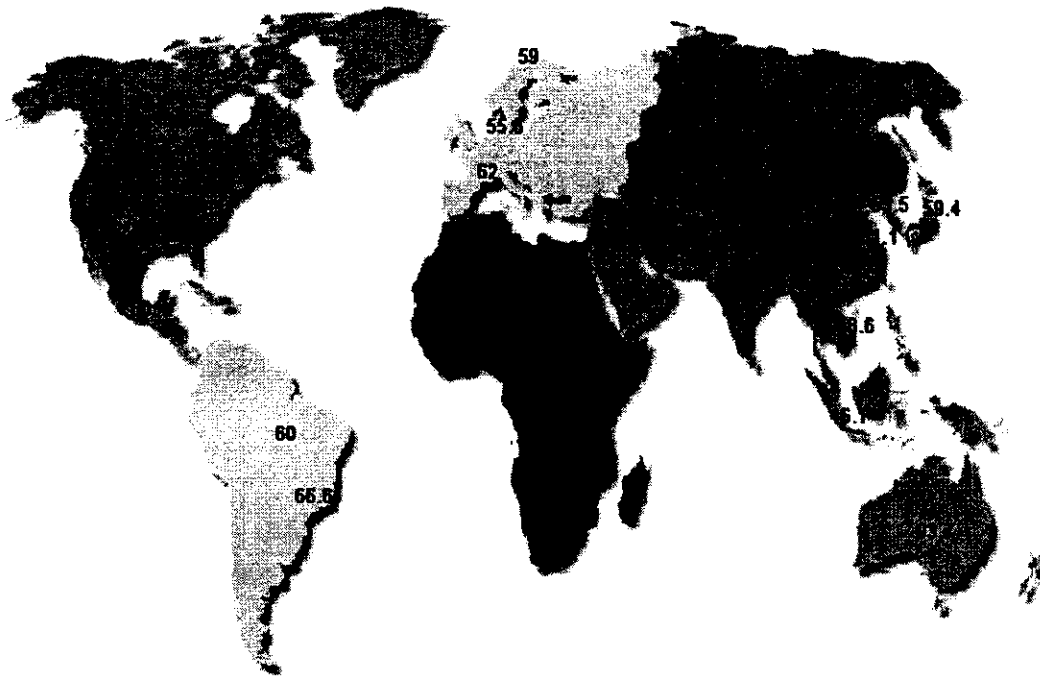
Với kháng nguyên HPA-2, HPA-2a chiếm 98,6%, so sánh với các nước trong khu vực chúng ta cũng có tần suất kháng nguyên gần giống họ (bản đồ HPA-2a) như vậy theo thống kê thì khả năng gây kháng thể miễn dịch ở nhóm kháng nguyên này cũng thấp.



Kháng nguyên HPA-3a, tần suất của người Việt nam là 55,9%, chúng ta so với châu Á tỷ lệ xuất hiện gần như nhau, khoảng trên dưới 50%. Với tỷ lệ này khả năng bị miễn dịch là cao vì chúng ta khó truyền được kháng nguyên cùng nhóm trong pool tiểu cầu.(bản đồ HPA-3a)



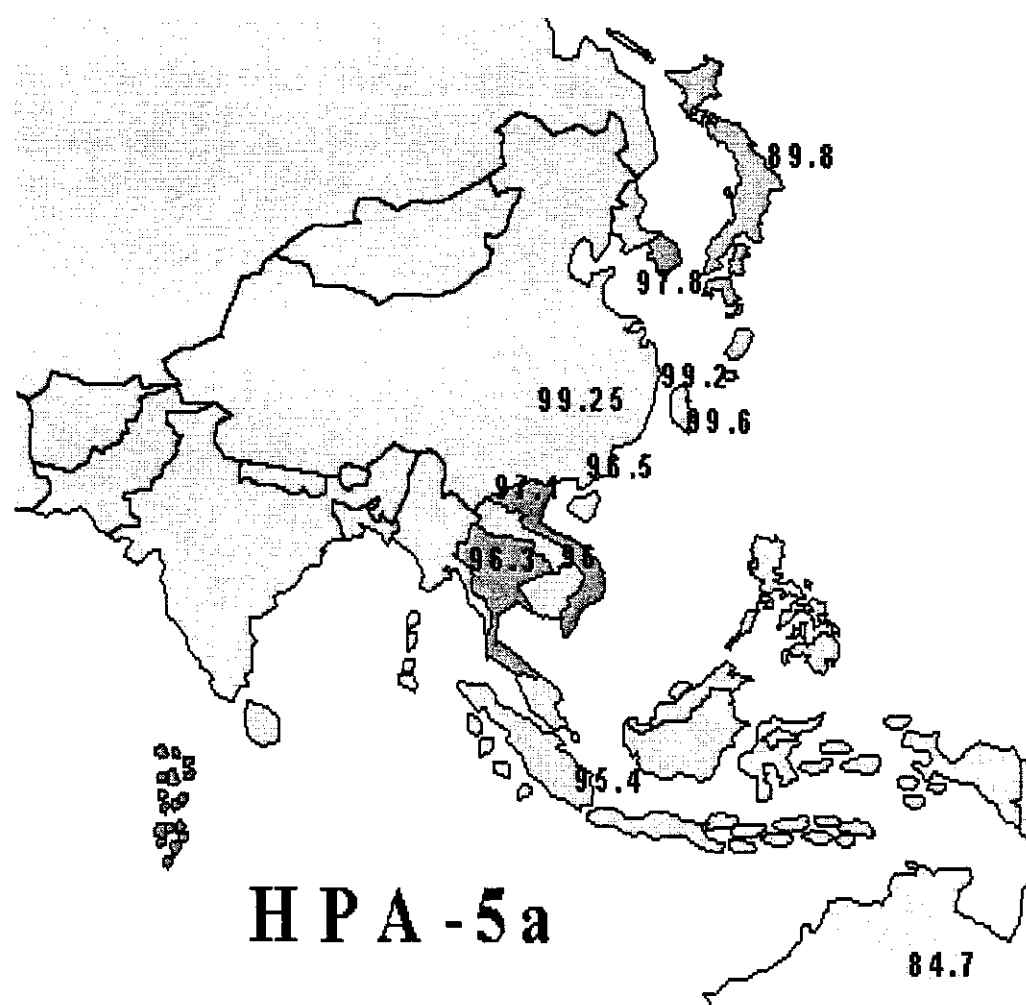
So với các châu lục thì tỷ lệ HPA-3a ở châu Âu, châu Mỹ, châu Phi là trên 60% trong khi đó châu Á chỉ trong khoảng 50%. (bản đồ HPA-3a)

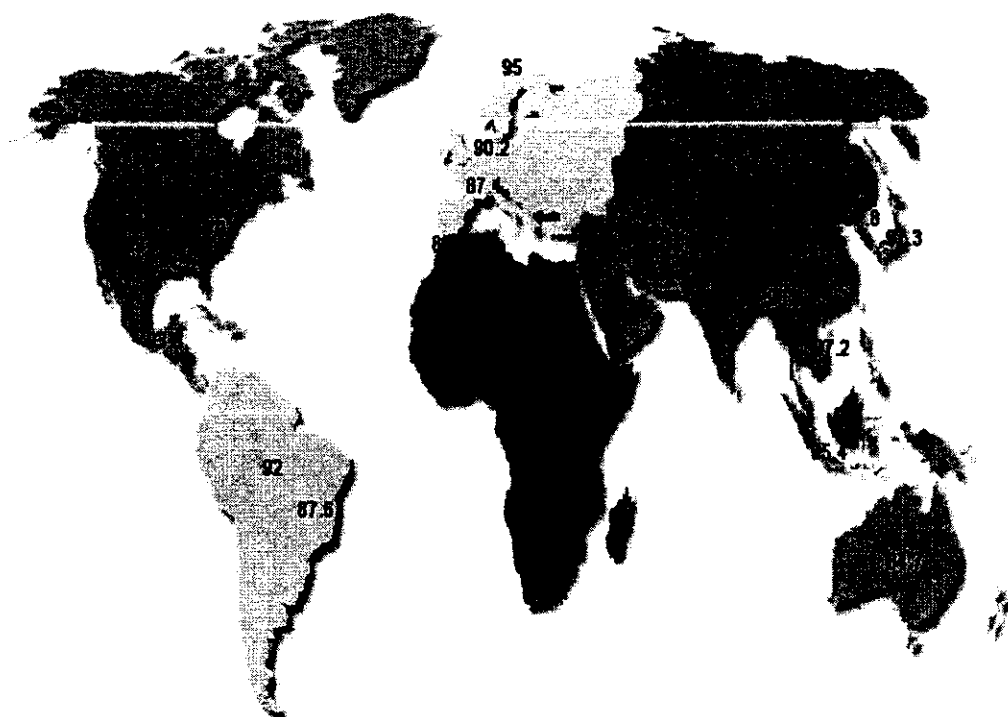


HPA-3a

Kháng nguyên HPA-4, không gặp kháng nguyên HPA-4b trong các quần thể khác nhau, vì vậy việc khẳng định có kháng nguyên này hay không còn phải bàn luận thêm.

Nhóm kháng nguyên HPA-5a cũng có tần xuất suất hiện tương tự như HPA-1 (97%), vì vậy khả năng gây miễn dịch ở quần thể người Việt nam nói riêng và châu Á nói chung sẽ ít gặp hơn ở châu Âu và châu Mỹ(87 đến 89%)





HPA-5

Các kháng nguyên HPA-7,8,9,10,11,12,13,14 rất ít quần thể dân tộc khác nhau đã được nghiên cứu và ở đây chúng tôi chỉ thấy xuất hiện kháng nguyên a mà không có kháng nguyên b ở Việt nam, so với các quần thể khác cũng có kết quả như vậy. Riêng HPA-6 tần suất kháng nguyên a và b cũng giống như HPA-1 và HPA-5. Đối với HPA-15 tần suất ở châu Á theo tài liệu chúng tôi tham khảo chỉ có quần thể Đài loan, Indonesie, Philipin đã có tần

suất kháng nguyên nhóm này. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự với các nước trên, HPA-15a là trên 50% (Việt nam: 52,17% nhóm người kinh miền bắc, 50,7% ở nhóm người kinh miền trung). Với tần suất này kháng nguyên HPA-15 cũng sẽ đóng vai trò quan trọng trong bệnh lý miễn dịch do truyền tiểu cầu không cùng nhóm hoặc bất đồng nhóm máu mẹ con...

4.2. Bệnh lý do kháng nguyên tiểu cầu gây ra.

Kháng nguyên tiểu cầu người (HPA) thực chất là những phân tử có trên màng tiểu cầu, nó được cấu tạo bởi những glycoprotein. Với những đặc tính như: hấp phụ và vận chuyển các chất- khi tiểu cầu hấp phụ các chất có trong huyết tương và các tế bào của tổ chức khác trong quá trình tiếp xúc sẽ tạo ra một lớp khí quyển quanh tiểu cầu. Nhờ vào quá trình này mà các chất tham gia vào quá trình cầm máu và đông máu được lưu hành đến nơi cần thiết để làm nhiệm vụ. Ví dụ: tiểu cầu hấp phụ serotonin từ các tế bào ở ruột non; hấp phụ adrenalin, noradrenalin và các yếu tố trong huyết tương...Tiểu cầu còn có khả năng dãn ra và dính vào một số bề mặt trong *invivo* như tổ chức dưới nội mạc, nhưng trong *invitro* thì tiểu cầu dính vào tất cả các bề mặt như ống nghiệm, bi thủy tinh, bentonit, barbiturat...). Hiện tượng dính của tiểu cầu xảy ra còn có sự tham gia của một số các yếu tố khác nữa: ion calci, các yếu tố huyết tương, GP Ib, GP IIb/ IIIa, yếu tố von-Willebrand, fibronectin, thrombospondin....Dính tiểu cầu còn là sự khởi đầu cho sự tiết và giải phóng các chất hoạt động, là hiện tượng vật lý do lực hút tĩnh điện giữa các tiểu cầu và cơ chất. Hiện tượng dính thường tăng lên sau mổ, sau đẻ hoặc tổn thương tổ chức. Trên lâm sàng người ta sử dụng đo độ dính để đánh giá chức năng của tiểu cầu.

Một chức năng khác cũng rất quan trọng của tiểu cầu đó là chức năng ngưng tập, đây là một chức năng rất đặc biệt của tiểu cầu. Tuy nhiên để thực hiện được chức năng này tiểu cầu cũng cần có một số yếu tố tham gia kích hoạt tiểu cầu. Ví dụ như: ADP, thrombin, serotonin, collagen, ... Và một số chất có mặt trong huyết tương, đặc biệt là fibrinogen.

Kháng nguyên tiểu cầu cũng tham gia vào quá trình miễn dịch và tự miễn, trước đây với kỹ thuật huyết thanh học chúng ta cũng đã nhận biết được đầy đủ các kháng nguyên, tuy nhiên hiểu biết sâu về nó chỉ mới từ khi có kỹ thuật sinh học phân tử. Thành phần chủ yếu của kháng nguyên tiểu cầu là các glycoprotein, mỗi kháng nguyên đã được xác định cấu trúc phân tử của nó và dưới nhóm của mỗi kháng nguyên này chỉ khác nhau một acid amin ở tại một vị trí, ví dụ: HPA-1a (leu³³), HPA-1b (Pro³³). Đối với chức năng làm kháng nguyên thì tiểu cầu cũng là nguyên nhân của một số bệnh miễn dịch và tự miễn như: xuất huyết giảm tiểu cầu vô căn, xuất huyết giảm tiểu cầu do bất đồng nhóm máu mẹ con, xuất huyết giảm tiểu cầu sau truyền máu nhất là truyền khối tiểu cầu nhiều lần... Những nghiên cứu về giảm tiểu cầu do đông miễn dịch thường là kháng thể chống lại một hay nhiều xác định kháng nguyên của hệ thống tiểu cầu. Những kháng nguyên thường gặp như HLA lớp I, ABO không nằm trong nguyên nhân này mà nó chỉ xuất hiện khi có hiện tượng xuất huyết do giảm tiểu cầu. Hệ thống kháng nguyên tiểu cầu là hai allen và sinh hoá học của nó đã được xác định, đó là những phức hợp glycoprotein nằm trên màng của tiểu cầu (Ia-IIa, IIb-IIIa, Ib-IX). Những phức hợp này đóng vai trò chính trong sinh lý học tiểu cầu: phức hợp GP Ib-IX là thụ thể của vWF và nó tham gia vào quá trình dính của tiểu cầu ở nội mạc khi có tổn thương, phức hợp GP IIb-IIIa là thụ thể của fibrinogen giúp cho quá trình ngưng tập tiểu cầu.

Những đồng kháng thể cố định lên các vị trí thụ thể của protein dính (vWF, Fg,...) có thể tham gia vào chức năng của tiểu cầu, do đó khi giảm tiểu cầu sẽ dẫn đến tình trạng bệnh lý của đông máu.

Những nghiên cứu sinh học phân tử cho phép xác định tính đa hình của các kháng nguyên đồng loài. Bệnh hay gặp do miễn dịch đồng loài do nguyên nhân là tiểu cầu: xuất huyết sau truyền máu và xuất huyết giảm tiểu cầu ở trẻ sơ sinh do miễn dịch mẹ con.

Xuất huyết sau truyền máu: đây là một tai biến ít gặp, nó được đưa ra từ 1959 và thường gặp ở phụ nữ trung niên. Triệu chứng xuất huyết xảy ra vào ngày thứ 8 đến 10 sau truyền máu. Nguyên nhân do thai nghén hay đã được

truyền máu là thường hay gặp. Những biến chứng muộn giữa nguyên nhân miễn dịch và nguyên nhân khác là cũng rất dao động, từ 3 đến 35 năm sau, có nhiều bệnh án khác nhau. Hội chứng này tuy đã được xác định là hậu quả của kháng thể miễn dịch chống lại kháng nguyên đặc hiệu của tiểu cầu. Tuy nhiên cơ chế tự huỷ của tiểu cầu còn phức tạp và chưa được sáng tỏ. Mặc dù cơ chế tự huỷ của tiểu cầu cũng nằm trong cơ chế phản ứng miễn dịch của kháng thể chống lại kháng nguyên đặc hiệu của tiểu cầu mà bệnh nhân không mang kháng nguyên đó. Đáp ứng miễn dịch này là một phản ứng do bệnh nhân có tiền sử bị miễn dịch từ trước như: thai nghén hay truyền máu, có thể là từ rất lâu năm về trước. Các lần truyền máu có thể lặp lại nhưng chỉ xuất hiện xuất huyết sau truyền máu ở những lần sau này. Nhiều giả thuyết đã giải thích ngược nhau:

Theo Shulman thì ủng hộ ý kiến nó là một phức hợp miễn dịch lưu hành. Đó là những kháng thể kết hợp với kháng nguyên tiểu cầu truyền vào gắn lên thụ thể Fc của tiểu cầu và đó là sản phẩm của hệ thống đại thực bào. Trong trường hợp đếm số lượng tiểu cầu bình thường thì kháng thể của bệnh nhân sẽ giảm dần vì có sự hấp phụ kháng thể lên bề mặt của tiểu cầu.

Một giả thuyết thứ hai là trong những chế phẩm của máu truyền vào có kháng thể hoà tan sẽ gắn lên tiểu cầu của bệnh nhân, nó giải thích tình trạng “kháng nguyên âm tính” thành “kháng nguyên dương tính”, những tiểu cầu này sẽ bị tự huỷ.

Một giả thuyết thứ ba là hiện tượng một sự nhận biết không đặc hiệu của kháng thể đồng miễn dịch với kháng nguyên của bệnh nhân. Những kháng thể này nhận biết những kháng nguyên yếu của tiểu cầu và những kháng thể không đặc hiệu hấp phụ lên tiểu cầu và lượng kháng thể sẽ giảm đi.

Cuối cùng là vấn đề đáp ứng miễn dịch của những bệnh nhân có tiền sử truyền máu không hoà hợp dẫn đến đáp ứng miễn dịch rất rộng với việc sản xuất kháng thể tự miễn và kháng thể miễn dịch. Tuy nhiên những kháng thể tự miễn không phải là nguyên nhân của xuất huyết sau truyền máu. Thật vậy nó có nhiều cơ chế không rõ ràng và bệnh học của nó cũng có nhiều yếu

tổ tham gia. Nhưng cũng có cơ chế còn chưa được biết đến, tần suất này thấp nhưng khả năng là do không hoà hợp kháng nguyên giữa người cho và người nhận do truyền máu, tìm kháng thể thì thấy anti-HPA-1a do đồng miễn dịch mẹ con từ trước. Trong các bệnh nhân có kháng thể người ta cũng đã xác định được đó là kháng HPA-1a là chủ yếu.

Chẩn đoán của những bệnh nhân này là tìm kháng nguyên của bệnh nhân và kháng thể miễn dịch có trong bệnh nhân. Tuy nhiên sẽ là khó khăn nếu như bệnh nhân giảm tiểu cầu được truyền máu nhiều lần. Những xét nghiệm cơ bản như: đếm số lượng tiểu cầu dưới $10.10^9/l$, thiếu máu do xuất huyết kéo dài. Tuỷ đồ không nằm trong giới hạn bình thường. Phân tích dòng tiểu cầu thấy số lượng tiểu cầu ở ngoại vi thì giảm, số mẫu tiểu cầu bình thường hoặc tăng.

Xét nghiệm miễn dịch cho thấy trong huyết tương hay huyết thanh của bệnh nhân có kháng thể kháng tiểu cầu, đôi khi có liên quan với kháng thể kháng HLA. Thông thường hiệu giá kháng thể đặc hiệu này rất cao dựa trên những kỹ thuật chính xác. Tần xuất kháng thể hay gặp ở người châu Âu là kháng thể kháng HPA-1a. Những kháng nguyên khác ít gặp hơn nhưng cũng là nguyên nhân gây miễn dịch. Những kháng nguyên đó là phức hợp GP IIb-IIIa (HPA-3a,3b,Ib). Nhiều trường hợp cũng được xác định là kháng nguyên HPA-5 (GP Ia).

Định nhóm kháng nguyên của tiểu cầu ở giai đoạn cấp bằng các kỹ thuật sinh học phân tử đã giúp cho việc xác định kháng thể kháng tiểu cầu một cách dễ dàng hơn. Bệnh nhân không có những kháng nguyên được truyền vào, hậu quả là sinh kháng thể. Kháng thể kháng tiểu cầu có mặt trong tất cả các giai đoạn giảm tiểu cầu và có hiệu giá cao, duy trì rất lâu trong cơ thể, từ vài tháng đến vài năm.

Tiến triển của bệnh thường dẫn đến xuất huyết não hoặc màng não và đòi hỏi điều trị phải rất tích cực để thoát khỏi tình trạng xuất huyết. Truyền tiểu cầu không định nhóm hiệu quả thấp vì tiểu cầu sẽ bị huỷ diệt nhanh. Những tiểu cầu hoà hợp sẽ giúp việc lui bệnh nhanh vì thời gian sống của tiểu cầu

là dài. Hiện nay việc điều trị gamaglobulin tĩnh mạch liều cao vẫn là có hiệu quả nhất.

Chú ý: truyền tiểu cầu hoà hợp giúp cho điều trị có hiệu quả và giảm tình trạng giảm tiểu cầu.

Giảm tiểu cầu ở trẻ sơ sinh hay miễn dịch mẹ con.(NAT Neonatale Alloimmune Thrombopenie)

Những kết quả xác định được từ những trường hợp miễn dịch mẹ con thường do nguyên nhân kháng nguyên tiểu cầu bào thai không mang kháng nguyên tiểu cầu của mẹ.

Bệnh sinh của nó được khẳng định giống như bệnh tan máu ở trẻ sơ sinh. Tuy nhiên có điểm khác là bệnh này có thể xảy ra ngay từ đứa con đầu tiên. ở Pháp có khoảng 1/1000 trẻ sơ sinh bị bệnh này.

1. Kháng nguyên liên quan:

Đó là những kháng nguyên đặc hiệu của tiểu cầu.

Quả vậy, những kháng thể HLA của lớp I có mặt trên tiểu cầu như kháng nguyên nhóm máu AB không được xem là nguyên nhân của NAT. Những kháng thể được xác định thường có mặt trong dòng mẫu tiểu cầu và phụ thuộc vào tần suất kháng nguyên của từng dân tộc. Hiện nay, những kháng nguyên của tiểu cầu cũng được tìm thấy trên một số tế bào khác như tế bào nội mô, lymphocyte T hoạt hoá. Sự phát hiện này đã điều chỉnh lại cơ chế sinh lý bệnh học đặc biệt là ở mức độ hệ thống thần kinh trung ương mà có nguy cơ bị tắc mạch do tế bào nội mô mạch máu, gọi là chứng thiếu máu cục bộ.

Những kháng nguyên của HPA sau khi đã đếm số lượng và ghi nhận ngày làm xét nghiệm, người ta đã tổng kết theo bảng 3, những allele có tần suất cao gọi là a và có tần suất thấp gọi là b.

Những kháng nguyên hay gặp ở người châu âu trong NAT là HPA-1a, sau đó là HPA-5b. Trong quần thể mongoloid thì có thể là HPA-4. ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về vấn đề này. chúng tôi hy vọng trong tương lai sẽ

làm tiếp nghiên cứu trên lâm sàng nhằm tránh hiện tượng trẻ bị xuất huyết sau sinh không rõ nguyên nhân. Những glycoprotein Ib, IIb và IIIa có vai trò quan trọng trong thời kỳ đầu tiên của đông cầm máu với sự có mặt của những protein dính và ngưng tập tiểu cầu, fibrinogen. Trong trường hợp này nếu kết dính và ngưng tập tiểu cầu bị rối loạn do kháng thể miễn dịch cố định trên những epitop của tiểu cầu và hậu quả là xuất huyết, thường dẫn đến giảm tiểu cầu và bệnh lý tiểu cầu đối với NAT.

2. Triệu chứng lâm sàng của NAT

a. Giảm tiểu cầu ở bào thai: nó có triệu chứng của xuất huyết não khi siêu âm trong thời kỳ thai nghén. Khả năng chẩn đoán trước sinh bằng cách lấy máu cuống rốn đếm số lượng tiểu cầu, nếu dưới $30.10^9/l$ ở tuần thứ 20 thai nghén và thường có triệu chứng xuất huyết nặng trong thời kỳ mang thai thì cần phải theo dõi. Mức độ giảm tiểu cầu nặng dẫn đến xuất huyết não (10% trường hợp), tử vong hay biến chứng thần kinh. Tuy nhiên những năm gần đây nhờ những tiến bộ trong chẩn đoán sớm và loại trừ ngay trong thời kỳ bào thai (thử nghiệm saperin với chức năng tiểu cầu, điều trị cho mẹ hoặc trong tử cung) đã cho phép giảm hoặc loại trừ những trường hợp bệnh lý trong thời kỳ bào thai.

b. Giảm tiểu cầu ở trẻ sơ sinh:

Chẩn đoán đặt ra trước tiên là dựa trên lâm sàng và loại trừ những nguyên nhân khác gây ra giảm tiểu cầu.

Thường là đứa con đầu tiên của sản phụ đẻ ra bình thường nếu trước đó sản phụ không có gì đặc biệt. Khi sinh hoặc trong những giờ đầu, những chấm xuất huyết hay ban xuất huyết có thể xuất hiện. Bên cạnh đó nó không có triệu chứng nhiễm trùng hoặc dị tật. Tuy nhiên theo một nghiên cứu của Kaplan thì có 13,4% trường hợp liên quan với một số bệnh. Xuất huyết màng não thường hiếm gặp. Nặng nhất là xuất huyết não và tử vong 10% trường hợp, hoặc biến chứng thần kinh 20% trường hợp. Vấn đề đặt ra là nguy cơ xuất huyết phải xét nghiệm tiểu cầu và có chỉ định điều trị ngay lập tức.

Trước tiên phải khẳng định có giảm tiểu cầu hay không. Đếm số lượng tiểu cầu ngay trong 24 đến 48 giờ đầu sau khi sinh. Giảm tiểu cầu được khẳng định, còn thiếu máu chỉ xuất hiện khi có xuất huyết nặng. Hội chứng đông máu rải rác đôi khi gặp và có liên quan với sốc hay suy hô hấp. Trong một số trường hợp, giảm tiểu cầu không có triệu chứng mà chỉ phát hiện được khi làm công thức máu. Trường hợp này cần phải tìm kháng thể miễn dịch, hỏi bệnh sử của mẹ và xét nghiệm để loại trừ bệnh của mẹ.

3. Chẩn đoán sinh học

Lấy huyết thanh của mẹ có kháng thể chống lại kháng nguyên tiểu cầu của thai, mà kháng nguyên này không có ở mẹ. Đó là lý do dẫn đến giảm tiểu cầu ở trẻ, cách duy nhất là lấy máu của bố mẹ để xét nghiệm.

Tiếp theo là làm những xét nghiệm: định nhóm kháng nguyên tiểu cầu của bố mẹ, tìm kháng thể trong huyết thanh của mẹ và xác định tính đặc hiệu của kháng thể.

Trong mọi trường hợp việc xác định loại kháng nguyên dựa trên tần xuất kháng nguyên trong quần thể của từng dân tộc. Có nhiều phương pháp đơn giản để xác định tính đặc hiệu của kháng thể với kháng nguyên tiểu cầu. Tuy nhiên cũng có những trường hợp khó và cần phải sử dụng nhiều kỹ thuật khác nhau để khẳng định thì phải đưa đến những phòng xét nghiệm chuyên khoa sâu: miễn dịch huỳnh quang, miễn dịch phóng xạ, MAIPA, ...

Sự không hoà hợp kháng nguyên của cha mẹ sẽ là chỉ điểm cho việc tìm kháng thể lưu hành trong máu tuy nhiên việc kháng thể âm tính cũng không loại trừ một cách chắc chắn là không có kháng thể. Quả vậy, trong 20% trường hợp có kháng thể chống HPA-1a, kháng thể yếu đôi khi cần phải sử dụng những kỹ thuật có độ nhạy cao. Trong một số trường hợp, đặc biệt là không hoà hợp HPA-3 (Bak) rất ít khi xuất hiện kháng thể, chỉ tìm được khi có tai biến. Cuối cùng là một số tình trạng đặc biệt, có kháng thể nhưng không có sự khác nhau trong kháng nguyên tiểu cầu giữa bố và mẹ.

Những khó khăn này chính là nguyên nhân đòi hỏi phải có một phòng thí nghiệm với những kỹ thuật có độ nhạy cao, phát hiện thêm những kháng

nguyên mới của tiểu cầu bố mẹ và con. Quả vậy, chẩn đoán đồng miễn dịch rất quan trọng ngay trong thời kỳ mang thai.

Hiện nay bằng kỹ thuật sinh học phân tử kết hợp với huyết thanh học chúng ta có thể định nhóm kháng nguyên tiểu cầu.

Đối với hệ thống HLA chúng ta có thể xác định sự không hoà hợp giữa mẹ và con ngoài thời kỳ cấp cứu, miễn dịch di truyền cũng là bệnh cảnh chung của miễn dịch mẹ con.

Trong quần thể người châu Âu, có khoảng 2,5% HPA-1b và miễn dịch mẹ con do không hoà hợp chiếm khoảng 80% các trường hợp. Tuy nhiên, miễn dịch này là hiếm. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng ở phụ nữ có DR52 sẽ xuất hiện miễn dịch HPA-1a. Việc phát hiện trong gia đình và xét nghiệm sớm trong thời kỳ mang thai sẽ tránh được tình trạng xuất huyết bào thai hoặc sơ sinh.

4. Tiến triển và tiên lượng.

Giảm tiểu cầu chỉ là tạm thời, thường người ta theo dõi khoảng từ 8 đến 15 ngày. Tiến triển của bệnh phụ thuộc vào tình trạng nặng nhẹ ban đầu và đáp ứng điều trị tốt hay xấu trên mỗi bệnh nhân; nguy cơ xuất huyết là nguy hiểm trong giai đoạn bào thai và kéo dài trong khi tiểu cầu giảm. Sự không hoà hợp là nguyên nhân của xuất huyết màng não và dẫn đến tử vong. Trong một nghiên cứu gồm 137 trường hợp miễn dịch mẹ con có anti HPA-1a, người ta theo dõi được 89% trẻ ra đời và thấy có khoảng 64% có tiến triển bình thường, 19% có ảnh hưởng thần kinh và 6% trẻ chết. Những tiến triển xấu thường có xuất huyết não/ màng não. Tóm lại 90% trẻ có sự không hoà hợp giữa mẹ và con thì giảm tiểu cầu là càng ngày càng nặng lên trong bào thai.

5. Điều trị:

Có hai thái độ điều trị: thứ nhất là sự giảm tiểu cầu từ từ và tình trạng cấp cứu bị mờ nhạt, thứ hai là trong bào thai đã có giảm tiểu cầu và tiên lượng tai biến là rất cao.

a. Điều trị giảm tiểu cầu ở trẻ sơ sinh do miễn dịch mẹ con:

- Trước mọi nguy cơ xuất huyết cũng như giảm tiểu cầu dưới $30.10^9/l$ trong vòng 24 đến 48 giờ sau sinh, điều trị cần phải chú ý truyền tiểu cầu “hoà hợp”, tránh truyền tiểu cầu hoà hợp với kháng thể lưu hành trong trẻ. Truyền tiểu cầu của mẹ thường dễ nhất nhưng phải loại bỏ những kháng thể có trong huyết tương và xử lý tia xạ để tránh hiện tượng thải ghép. Thay máu bằng máu lưu trữ dưới 2 ngày và không bị nhiễm CMV có thể đặt ra nếu đó là máu hoà hợp. Như vậy sẽ đảm bảo cho quá trình đông máu và loại trừ kháng thể lưu hành. Trong trường hợp giảm tiểu cầu liên quan với miễn dịch ngoài hệ thống HPA, ngoài mẹ ra thì chỉ dùng máu của các thành viên trong gia đình mặc dù việc định nhóm HPA không thực hiện được.

- Truyền tĩnh mạch những globulin miễn dịch đa giá với liều cao (1g/Kg/ngày trong hai ngày) có thể hỗ trợ để loại trừ nguy cơ xuất huyết.

- Trong mọi trường hợp, theo dõi lâm sàng kết hợp với chụp mạch hoặc chụp cắt lớp não để có chỉ định điều trị kịp thời.

Theo dõi số lượng tiểu cầu ở mức giới hạn bình thường trong khoảng từ 8 đến 15 ngày. Khám hệ thống thần kinh cho trẻ phải được kiểm tra thường xuyên định kỳ để phát hiện sớm những rối loạn của hệ thống thần kinh.

b. Điều trị cho những trẻ có tiền sử giảm tiểu cầu trong thời kỳ bào thai.

Do tần xuất tai biến xuất huyết cao trong thời kỳ bào thai và nhờ có phương tiện chẩn đoán sớm, nhiều phác đồ điều trị đã được đưa ra. Nên khuyến sản phụ theo dõi và xét nghiệm bắt đầu từ tuần thứ 20 của tuổi thai và lặp lại ở quý hai và ba của thời kỳ mang thai.

Điều trị chủ yếu cho những trường hợp này là tiêm tĩnh mạch globulin miễn dịch với liều cao hoặc corticoid.

Tóm lại, giảm tiểu cầu ở bào thai và sơ sinh do nguyên nhân miễn dịch là hậu quả của những kháng thể của mẹ đi qua màng rau và dẫn đến tử vong do xuất huyết hoặc di chứng thần kinh. Điều này đòi hỏi phải có một điều trị tích cực và kịp thời. Điều trị trong thời kỳ bào thai sẽ tránh những biến chứng

trên. Trong trường hợp giảm tiểu cầu do kháng thể tự miễn thì việc điều trị chỉ có hiệu quả khi phát hiện được kháng thể.

KẾT LUẬN

1. Qua nghiên cứu 289 người Việt nam chúng tôi nhận thấy tần suất kháng nguyên HPA-1 đến 5 ở người Kinh ở cả 3 miền Bắc, Trung, Nam không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Chúng tôi tính trung bình của cả 3 vùng để có số liệu cho người Việt Nam, tần suất gen của kháng nguyên tiểu cầu là: HPA-1a: 0,986; HPA-2a: 0,929; HPA-3a: 0,559; HPA-3b: 0,440; HPA-4a: 1,0; HPA-5a: 0,966;

2. Đối với kháng nguyên HPA-6 đến 15 chúng tôi chỉ nghiên cứu trên hai quần thể miền bắc và miền trung, kết quả cho thấy tần suất gen của kháng nguyên HPA-6: 0,985,(cũng có tần suất như HPA-1 và 5); HPA-15a: 0,514; HPA-15b: 0,485; Các HPA-7,8,9,10,11,13,14 có tỷ lệ 100% gen a, không có gen b.

KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục sử dụng kỹ thuật PCR-SSP để định nhóm kháng nguyên tiểu cầu trong những trường hợp nghi ngờ có bất đồng nhóm tiểu cầu giữa mẹ và con ở trẻ sơ sinh hoặc những người phụ nữ mang thai có tiền sử sinh con bị xuất huyết giảm tiểu cầu.

2. Tìm kháng thể kháng tiểu cầu với panel tiểu cầu để xác định bệnh xuất huyết giảm tiểu cầu tự miễn hay miễn dịch do truyền máu, thai nghén...

3. Ứng dụng trong chẩn đoán lâm sàng cho những bệnh nhân bị bệnh lý về đột biến glycoprotein của màng tiểu cầu .

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aiken ML, Ginsberg MH, Byers-Ward V, Plow EF (1990) effects of OKM5, a monoclonal antibody to glycoprotein IV, on platelet aggregation and thrombospondin surface expression. *Blood* 76:2501-2509.
2. Andrieux A, Rabiet M-J, Chapel A, Concord E, Marguerie G (1991) A Highly conserved sequence of the Arg-Gly-Asp binding domain of the integrin $\beta 3$ subunit is sensitive to stimulation. *J Biol Chem* 266:14202-14207.
3. Arnaout MA (1990) Structure and function of the leucocyte adhesion molecules CD 11/CD18. *Blood* 75:1037-1050.
4. Banga HS, Simons ER, Brass LF, Rittenhouse SE (1996) Activation of phospholipase A and C in human platelets exposed to epinephrine. Role of glycoprotein IIb/IIIa and dual role of epinephrine. *Proc Nat Acad Sci, USA* 83:9197-9201.
5. Beckerle MC, Yeh (1990) Talin: Role at sites of cell substratum adhesion. *Cell motility and Cytoskeleton* 16:7-12.
6. Bennett JS (1990) The molecular biology of platelet membrane proteins. *Semin Hematol* 27:186-204.
7. Bevers EM, Comfurius P, Nieuwenhuis HK, Levy-toledano S, Enouf J, Belluci S, Caen JP, Zwaal RFA (1986) Platelet prothrombin converting activity in hereditary disorders of platelet function. *Br J Haematol* 63:335-345.
8. Bierling P, Fromont P, Elbez A, Duaderi N, Kieffer N (1988) Early immunisation against platelet glycoprotein IIIa in a newborn Glanzmann-type I patient. *Vox Sang* 55:109-113.

9. Boizard B, Wautier J-L (1984) Le^a , a new platelet antigen absent in Glanzmann's thrombasthenia. *Vox Sang* 46:47-54.
10. Bolen JB (1991) Signal transduction by src family of tyrosine protein kinase in haematopoietic cells. *Cell Growth Differ* 2:409-414.
11. Bowditch RD, Tani PH, Hallora CE, Frelinger III AL, McMillan R, Ginsberg MH (1992) Localization of a P_1^{A1} epitope to the amino terminal 66 residues of platelet glycoprotein IIIa. *Blood* 79:559-562.
12. Caen JP (1972) Glanzmann's thrombasthenia. *Clin Haematol* 1:383-392.
13. Calvete JJ, Henschen A, González-Rodríguez J (1991) Assignment of disulphide bonds in human platelet GP IIIa. A disulphide pattern for the β -subunits of the integrin family. *Biochem J* 274:63-71.
14. Calvete JJ, Karleheinz M, Alvarez MV, López MM, González-Rodríguez J (1992) proteolytic dissection of the platelet fibrinogen receptor, integrin GP IIb/IIIa. Localization of GP IIb and GP IIIa sequences putatively involved in the subunit interface and in intrasubunit and intrachain contacts. *Biochem J* 282:523-532.
15. Calvete JJ, Muniz-Diaz E (1993) Localization site in the α -subunit of the human platelet integrin GP IIb-IIIa involved in Bak^a (HPA-3a) allo antigen expression. *FEBS* 328:30-34.
16. Christie DJ, Pulkrabek S, Putnam JL, Slatkoff ML, Pischel KD (1991) post-transfusion purpura due to an alloantibody reactive with glycoprotein Ia/IIa (anti-HPA-5b). *Blood* 77:2785-2789.
17. Cines DB, Schreiber AD (1979) Effect of anti- P1^{A1} antibody on human platelet. I. The role of complement. *Blood* 53:567-576.
18. Collier BS, Beer JH, Scudder LE, Steinberg MH (1989) Collagen-platelet interactions: Evidence for a direct interaction of collagen with platelet GP IIb/IIIa mediated by adhesive proteins. *Blood* 74:182-192.

19. Coller BS, Cheres DA, Asch E, Seligsohn U (1991) Platelet vitronectin receptor expression differentiates Iraqi-Jewish from Arab patients with Glanzmann thrombasthenia in Israel. *Blood* 77:75-83.
20. Coller BS, Peerschke E I, Seligsohn U, Scudder L E, Nurden A T, Rosa J-P (1986) Studies on the binding of an alloimmune and two murine monoclonal antibodies to the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex receptor. *J Lab Clin Med* 170:384-392.
21. De Marco L, Mazzucato M, Fabris F, DE Roia D, Coser P, Girolami A, Vincente V, Ruggeri ZM (1990) Variant Bernard-Soulier Syndrom type Bolzano. A congenital Bleeding disorder due to a structural and functional abnormality of the platelet glycoprotein Ib-IX complex. *J Clin Invest* 86:25.
22. Degos L, Tobelem G, Lethielleux P, Levy- Toledona S, Caen J, Colombani J (1977) Molecular defect in platelets from patients with Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 50:899-903.
23. Djaffa I, Villette D, Pidard D, Wautier J-L, Rosa J-P (1993) human platelet antigen 3 (HPA -3): Localization of the interminant of the alloantibody Lek^a (HPA -3a) to the C- terminus of the platelet glycoprotein IIb heavy chain and contribution of O-linked carbonhydrates. *Thromb Haemost* 69:485-489.
24. Duperray A, Troesch A, Berthier R, Chagnon E, Frachet P, Uran G, and Marguerie G (1989) Biosynthesis of platelet GP IIb-IIIa in human megakaryocytes: evidence that asembly between pro-GP IIb and GP IIIa is a prerequisite for expression of the complex on the cell surface. *Blood* 74:1603-1611.
25. Farrell DH, Thiagarajan P, Chung DW, Davie EW (1992) Role of fibrinogen α and γ chain sites in platelet aggregation. *Proc Nat Acad Sci USA* 89:10729-10732.

26. Ferrell JD, Martin GS (1989) Tyrosine- specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein IIb-IIIa in platelets. *Proc Nat Acad Sci, USA* 86:2234-2238.
27. Fitzgerald LA, Poncz M, Steiner B, Rall Sc, Lo S-S, Phillips DR (1987a) Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa and similarity to "integrin". *J Biol Chem* 262:3936-3939.
28. Flug F, Espinola R, Liu L-X, SinQuee C, DaRosso R, Nardi M, Karparkin S (1991) A 13-mer peptide straddling the leucine³³/proline³³ polymorphism in glycoprotein IIIa does not defined the P1^{A1} epitope. *Blood* 77:1964-1969.
29. Fox JEB, Taylor RG, Taffarel M, Boyles JK, Goll DE (1993) Evidence that activation of platelet calpain is induced as a consequence of binding of adhesive ligand to integrin, glycoprotein IIb-IIIa. *J Cell Biol* 120:1501-1507.
30. Frelinger III AL, Lam SCT, Plow EF, Smith MA, Loftus JC, Ginsberg MH (1988) Occupancy of an adhesive glycoprotein receptor modulates expression of an antigenic site involved in cell adhesive. *J Biol Chem* 263:12397-12402.
31. Fujimoto T, Furimura K, Kuramoto A (1991) Electrophysiological evidence that glycoprotein IIb-IIIa complex is involved in calcium channel activation on human platelet plasma membrane. *J Biol Chem* 266:16370-16375.
32. Furihata K, Hunter J, Aster RH, KOewing GD, Shulman NR, Kunicki TJ (1988) Human anti- P1^E antibody recognizes epitopes associated with the anpha subunit of platelet glycoprotein Ib. *Br J Haematol* 68:103-110.
33. Furihata K, Nugent DJ, Bissonette A, Aster RH, Kunicki TJ (1987) On the association of the platelet- specific alloantigen, Pen^a, with glycoprotein IIIa. Evidence for heterogeneity of platelet glycoprotein IIIa. *J Clin Invest* 80:1624-30.

34. Gawaz MP, Loftus JC, Batij ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH (1991) Ligand bridging mediates integrin α IIb β 3 (platelet GP IIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest* 88: 1128-1134.
35. Gerge JN, Nurden AT: Inherited disorders of platelet membrane (1987) Glanzmann's thrombasthenia and Bernard-Soulier syndrome. Dans "Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice". Eds: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ & Salzman EW, Lippincott JB, Philadelphie, p726-740.
36. Goldberger A, Kolodziej M, Poncz M, Bennett JS, Newman PJ (1991) Effect of single amino acid substitutions on the formation of the P1^A and Bak alloantigenic epitopes. *Blood* 78:681-687.
37. Greco NJ and Jamieson GA (1991) High and moderate affinity pathway for α -thrombin-induced platelet activation. *P S E B M* 198:792-799.
38. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA (1992) Membrane glycoprotein CD 36: A review of roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 80: 1105-1115.
39. Harrison P (1992) Platelet alpha-granular fibrinogen. *Platelets* 3:1-10.
40. Hemler ME (1990) VLA proteins in the integrin family : Structures, functions, and their role on leucocytes. *Annual Rev Immunol* 6: 329-357.
41. Hemler ME, Crouse C, Takada Y, Sonnenberg A (1988) Multiple very late antigen (VLA) heterodimers on platelets. Evidence for distinct VLA-2, VLA-5 (fibronectin receptor), and VLA-6 structures. *J Biol Chem* 263:7660-7665.
42. Honda S, Honda Y, Bauer B, Ruan C, Kunicki TJ, (1995) The impact of three-dimensional structure on the expression of P1^A alloantigens on human integrin β ₃. *Blood* 86:234-242.

43. Hourdillé P, Heilmann E, Combrié R, Winckler J, Clemetson KJ, Nurde AT (1990) Thrombin induced a rapid distribution of glycoprotein Ib-IX complexes within the membrane systems of human platelets. *Blood* 76:1503-1513.
44. Hynes OH (1992) Integrins: Versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
45. Ikeda H, Mitani T, Ohnuma M, Haga H, Ohtzuka S, Kato T, Nakase T, Sekiguchi S (1989) A new platelet-specific antigen, Nak^a, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion. *Vox Sang* 57:213-217.
46. Ito K, Yoshida H, Hatoyama H, Matsumoto H, Ban C, Mori T, Sugiyama T, Ishibashi T, Okuma M, Uchino H, Maruya E, Oki A, Saji H, Hosoi T, Tanoue K, Tomiyama Y, Kurata Y (1991) Antibody removal therapy used successfully at delivery of a pregnant patient with Glanzmann's thrombasthenia and multiple anti-platelet antibodies. *Vox Sang* 61:40-46.
47. Jennings LK, Aschman RA, Wang WC, Docker ME (1986) Analysis of human blood platelet glycoproteins IIb-IIIa and Glanzmann's thrombasthenia in whole blood by flow cytometry. *Blood* 68:173-179.
48. Jonhston GI, Hepstinstall S, Robbin RA, Price MR (1984) The expression of glycoproteins on single blood platelets from healthy individuals and from patients with congenital bleeding disorders. *Biochim Biophys Res Commun* 123:1091-1098.
49. Kaplan KL, Broekman MJ, Chernoff A, Lesznik GR, Drillings M (1979) platelet α -granule protein : studies on release and subcellular localisation. *Blood* 53:604-618.
50. Kehrel B, Kronenberg A, Schwippert B, Nieising-Bresch D, Niehuse U, Tschöpe D, van de Loo J, Clemetson K (1991) Thrombospondin binds normally to glycoprotein IIIb deficient platelets. *Biochem Biophys Res Comm* 179:985-991.

51. Kekomaki R, Jouhikainen T, Ollikainen J, Westman P, Laes M (1993) A new platelet alloantigen, Tu^a, on glycoprotein IIIa associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia in two families. *Br J Haematol* 83:306-310.
52. Kiefel V, Santoso S, Katzmann B, Mueller- Eckhardt (1989) The Br^b/Br^a alloantigen system on human platelets. *Blood* 73:2219-2223.
53. Kieffer N, Boizard B, Didry D, Wautier J-L, Nurden AT (1984) Immunochemical characterization of the platelet – specific alloantigen Lek^a: A comparative study with the P1^{A1} alloantigen. *Blood* 64:1212-1219.18
54. Kieffer N, Phillips (1990) Platelet membrane glycoproteins : Function in cellular interactions. *Annuc Rev Cell Bio* 6:329-357
55. Kirchofer D, Languino LR, Ruoslahti E, Pierschbacher MD (1990) $\alpha_2\beta_1$ Integrins from different cell types show different binding specificities. *J Bio Chem* 265:615-618.
56. Kuijpers RWAM, Faber NM, Cuypers HThM, Ouwehand WH, von dem Borne AEGKr (1992b) NH2- terminal globular domain of human platelet glycoprotein Ib α has a methionine ¹⁴⁵/ threonine ¹⁴⁵ amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2 (Ko) alloantigens. *J Clin Invest* 89:381-384.
57. Kuijpers RWAM, Ouwehand WH, Bleeker PMM, Christie D, von dem Borne AEGKr (1992a) Localisation of the platelet-specific HPA-2 (Ko) alloantigens on the N-terminal globular fragment of platelet glycoprotein Ib α . *blood* 79:283-288.
58. Kunicki TJ, Aster RH (1978) Absence of the platelet receptor for drug dependent antibodies in Bernard-Soulier syndrome. *J Clin Invest* 62:716-719.
59. Kunicki TJ, Furihata K, Nugent DJ (1987) The immunogenicity of platelet membrane glycoproteins. *Trans Med rev* 1:21-23.

60. Legrand C, Pidard D, Beiso P, Tenza D, Edelman L (1991) Interaction of a monoclonal antibody to glycoprotein IV (CD 36) with human platelets and its effect on platelet function. *Platelets* 2:99-105.
61. Levy-Toledano S, Tobelem G, Legrand C, Bredoux R, Degos L, Nurden A T, Caen J P (1978) Acquired IgG antibody occurring in a thrombocasthenic patient : its effect on platelet aggregation. *Blood* 51:1065-1071.
62. Lopez JA (1994) The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood coagulation and fibrinolysis* 5:97-119.
63. Lopez JA, Chung DW, Fujikawa K, Hagen FS, Davie EW, Roth GJ (1988) The α and β chains of human platelet glycoprotein Ib are both transmembrane proteins containing a leucine-rich amino acid sequence. *Proc Nat Acad Sci USA* 85:2135-2139.
64. Lopez JA, Chung DW, Fujikawa K, Hagen FS, Papayanopoulou T, Roth GJ (1987) Cloning of the α chain of human glycoprotein Ib: a transmembrane protein with homology to leucine rich α 2-glycoprotein. *Proc Nat Acad Sci USA* 84:5615-5619.
65. Lopez JA, Ludwig EW, McCarthy BJ (1992a) Polymorphism of human glycoprotein Iba from a variable number of repeats of a 13-amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptide region. Structure/Function implications. *J Biol Chem* 267:10055-10061.
66. Lyman S, Aster RH, Visentin GP, Newman PJ (1990) Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Bak^a/Bak^b alloantigen system. *Blood* 75:2343-2348.
67. McEver RP, Baenziger JU, Majerus PW (1982) Isolation and structural characterization of the polypeptides subunits of membrane glycoprotein IIb-IIIa from human platelets. *Blood* 59:80-85.

68. McFarland JG, Blanchette V, Collins J, Newman PJ, Wang R, Aster RH (1993) Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to a new platelet-specific alloantibody. *Blood* 81:3318-3323.
69. Meyer M, Schellenberg I (1990) Platelet membrane glycoprotein Ib: genetic polymorphism detected in the intact molecule and in proteolytic fragments. *Thromb Res* 58:233-242.
70. Miller JL, Lyle VA, Cunningham D (1992) Mutation of leucine-57 to phenylalanine in a platelet glycoprotein Ib α leucine tandem repeat occurring in patients with an autosomal dominant variant of Bernard-Soulier disease. *Blood* 79:439-446.
71. Modderman PW, Admiral LG, Sonnenberg A, von dem Borne AEGKr (1992) glycoprotein V and Ib-IX form a non covalent complex in the platelet membrane. *J Biol Chem* 267:364-369.
72. Moroi M, Jung SM, Yoshida N (1984) Genetic polymorphism of glycoprotein Ib. *blood* 64:622-629. parise LV, Criss AB, Nannizzi L, Warder MR (1990) Glycoprotein IIIa is phosphorylated in intact human platelets. *Blood* 75:2363-2368.
73. Murata M, Furihata K, Ishida F, Russel SR, Ware J, Ruggert ZM (1992) Genetic and structural characterization of an amino acid polymorphism in glycoprotein Ib α involved in platelet transfusion refractoriness. *Blood* 79:3086-3090.
74. Newman PJ, Werverbusch-Bottum, Visentin GP, Gidwitz, White II GC (1993) Type II Glanzmann thrombasthenia due to destabilizing amino acid substitution in platelet membrane glycoprotein IIIa. *Thromb Haemost* 69:1017 (resume).
75. Nurden AT (1987) Abnormalities of platelet glycoprotein in inherited disorders of platelet function. Dans: "Platelets in biology and pathology--III". Eds: Gordon JL & MacIntyre, Elsevier, Amsterdam, p37-94.

76. Nurden AT, Pico M, Fournier D, Jallu V, Lacazae D, Hourdille Platelet (1991) Glanzmann's thrombasthenia: a general introduction with comments on specific cases. Dans: "Platelet immunology: fundamental and clinical aspects" Eds: Kaplan-Gouet C, Shlegel N, Salmon Ch, McGregor J, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext ltd. 206:139-151.
77. O'Toole TE, Loftus JC, Plow EF, Glass AA, Harper JR, Ginsberg MH (1989) Efficient surface expression of platelet GP IIb-IIIa requires both subunits. Blood 74:14-18.
78. Oquendo Platelet, Hundt E, Lawler J, Seed B (1989) CD 36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum infected erythrocytes. Cell 58:95-101.
79. Parise LV, Criss AB, Nannizzi L, Wardell MR (1990) Glycoprotein IIIa is phosphorylated in intact human platelets. Blood 75:2363-2368
80. Douste-Blazy L, Caen JP (1983) Abnormal phospholipid organization in Bernard-Soulier platelets. Throm Res 31:529-537
81. Phillips DR, Jennings LLK, Edwards HH (1980) Identification of membrane protein mediating the interaction of human platelets. J Cell Biol 86:77-86
82. Pischel KD, Helmer MD, Huang C, Bluestein HG, Woods VL (1987) use of the monoclonal antibody 12F1 to characterize the differentiation antigen VLA-2. J Immunol 138:226-233β
83. Plow EF, D'Souza SE, Ginberg MH (1992) Ligand binding to GP IIb-IIIa: a status report. Semin Thromb Hemost 18:324-332
84. Rendu F, Dupuy E (1991) hereditary disorders of platelet function. Blood Cell Biochem 2:77-112
85. Roth GJ (1991) Developing relationships: Arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and surface leucine-rich glycoprotein. Blood 77:5-19
86. Ruggeri ZM and Ware J (1993) von Willebrand factor. FASEB J 7:308-316

87. Ryu T, Davis JM, Schwartz KM (1990) Dose-dependant platelet stimulation and inhibition induced by anti-PI^{AI} IgG. *J Lab Clin Med* 116:91-99.
88. Saji H, Maruya E, Fujii H, Maekawa T, Akiyama, Matsuura T, Hosoi T (1989) new platelet antigen, Sib^a, involved in platelet transfusion refractoriness in a japanese man. *Vox Sang* 56:283-287
89. Sakariassen KB, Nievelstein FEM, Collier BS, Sixma JJ (1986) the role of platelet membrane glycoprotein Ib and IIb-IIIa in platelet adheren to human artery subendothelium. *Br J Haematol* 63:681-691
90. Santoso S, Kalb R, Kiefel V, Muller-Eckhardt C, Newman PJ (1993) The human alloantigen Br^a/Br^b is associated with Lys⁵⁰⁵ (AAG)/Glu⁵⁰⁵ (AGA) polymorphism of GP Ia. *Thromb Haemost* 69:1191 (resume).
91. Savage B, Ruggeri ZM (1991) Selective recognition of adhesive sites in surface-bound on human platelets. II. Mechanism of the complement-dependant release reaction. *Blood* 58:578-583.
92. Schreiber ADHESIVE, Cines DB, Zmijewski C, Colman RW (1979) Effect of anti-PI^{AI} antibody on human platelet. II. Mechanisms of the complement-dependant release reaction. *Blood* 58:578-583.
93. Shibata Y, Mori H (1987) A new platelet-specific alloantigen system, Yuk^a/Yuk^b is located on platelet membrane glycoprotein IIIa. *Proc Japan Acad* 63:36-38.
94. Simsek S, Admiraal LG, Modderman PW, van der Schoot, von dem Borne AEGKr (1993a) Identification of a homozygous single base pair deletion in the gene coding for the human platelet glycoprotein Iba causing Bernard-Soulier syndrome. *Thromb Haemost* 69:963 (resume).
95. Simsek S, Blecker PMM, van der Schoot, von dem Borne AEGKr (1994) Association of a variable number of tandem repeats (VNTR) in glycoprotein Iba and HPA-2 alloantigens. *Thromb Haemost* 72:534-538.

96. Smith JW, Kelton JG, Horsewood Platelet, Brown C, Giles A, Meyer R, Woods V, Burrows R (1989) platelet specific alloantigens on the platelet glycoprotein Ia/IIa complex. *Br J Haematol* 72:534-538.
97. Staatz WD, Sanjay MR, Wayner EA, Carter WG, Santoro SA (1989) The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg^{2+} -dependent adhesion of platelet collagen. *J Cell Biol* 108:1917-1924.
98. Takada Y, Helmer ME (1989) The primary structure of the VLA-2/collagen receptor $\alpha 2$ subunit (platelet GP Ia): homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain. *J Cell Biol* 109:397-407.
99. Take H, Tomiyama Y, Shibata Y, Furubayashi T, Honda S, Mizutani H, Nishiura T, Tsubakio T, Kurata Y, Yonezawa T, Tarui S (1990) Demonstration of the heterogeneity of epitopes of the platelet-specific alloantigen, Bak^a. *Br J Haematol* 76:395-400.
100. Tandon NN, Ockenhouse CF, Greco NJ, Jamieson GA (1991) Adhesive functions of platelet lacking GPIV (CD36). *Blood* 78:2809-2813.
101. Tobelem G, Levy-Toledano S, Bredoux R, Michel H, Nurden A, Caen JP, Degos L (1976) New approach to determination of specific functions of platelet membrane sites. *Nature* 263:427-428.
102. Tomiyama Y, Take H, Ikeda H, Mitani T, Furubayashi T, Mizutani H, Yamamoto N, Tandon NN, Sekiguchi S, Jamieson GA, Kurata Y, Yonezawa T, Tarui S (1990) Identification of the platelet-specific alloantigen, Naka, on platelet membrane glycoprotein IV. *Blood* 75:684-687.
103. Valentin N, Visentin GP, Newman PJ (1995) Involvement of the cysteine-rich domain of glycoprotein IIIa in the expression of the human platelet alloantigen, PI^{A1}: evidence for heterogeneity in the humoral response. *Blood* 68:3028-3033.

104. Van der Weerd CM, van de Wiel-Dorfmeijer H, Engelfriet CP, van Loghem JJ (1961) A new platelet antigen. Proceeding of the 8th Congress of the European Society of Haematology. Basel, Switzerland, Karger p379-382.
105. Van Leeuwen EF, van der Ven JThM, Engelfriet CP, von dem Borne AEGKr (1982) Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. Blood 59:23-26.
106. Van Willigen G, Akkerman J-W N (1992) Regulation of glycoprotein IIb/IIIa exposure on platelets stimulated with α -thrombin. Blood 79:82-90.
107. Von dem Borne AEKr, Decary F (1990) Nomenclature of platelet specific antigens. Human Immunol 29:1-2.
108. Von dem Borne AEKr, van der Plas-van Dalen CM (1986) Bak^a and Lek^a are identical antigens. Br J Haematol 62:404-405.
109. Von dem Borne AEKr, von Riesz E, Verheugt F, ten Cate J, Koppe J, Engelfriet C, Nijenhuis L (1980) Baka, a new platelet-specific antigen involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. Vox Sang 39:113-120.
110. Vu T-KH, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR (1991a) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. Cell 64:1057-1068.
111. Wang R, Furuhata K, McFarland JG, Friedman K, Aster RH, Newman PJ (1992a) An amino acid polymorphism within the RGD binding domain of platelet glycoprotein IIIa is responsible for the formation of the Pen^a/Pen^b alloantigen system. J Clin Invest 90:2038-2043.
112. Wang R, McFarland JG, Kekomäki R, Newman PJ (1992b) Amino acid 489 is a mutational "hot-spot" on the β 3 integrin chain: The Ca/Tu (HPA-6) human platelet alloantigen system. Circulation 86:I-681 (resume).

113. Ware J, Russell SR, Vicente V, Scharf RE, Tomer A, McMillan R, Ruggeri ZM (1990) Nonsense mutation in the glycoprotein Iba coding sequence associated with Bernard-Soulier syndrome. *Proc Nat Acad Sci USA*, 87:2026-2030.
114. Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR (1986) Platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelets deficient in glycoproteins IIb-IIIa, Ib and storage granules. *Blood* 67: 322-330.
115. Woods V, Pischel KD, Avery ED, Bluestein HG (1989) Antigenic polymorphism of human very late activation protein-2 (platelet glycoprotein Ia-IIa). *J Clin Invest* 83:978-985.
116. Wright SD, Michaelides K, Johnson DJD, West NC, Tuddebham EGD (1993) Double heterozygosity for mutations in the platelet glycoprotein IX gene in three siblings with Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 81:2339-2347.
117. Yamamoto N, Greco NJ, Barnard MR (1991) Glycoprotein Ib (GP Ib)-dependent and GP Ib-independent pathways of thrombin-induced platelet aggregation. *Blood* 77:1740-1748.
118. Yamamoto Y, Ikeda H, Tandon NN, Herman J, Tomiyama Y, Mitani T, Sekiguchi S, Lipsky R, Kralisz U, Jamieson GA (1990) A platelet membrane glycoprotein deficiency in healthy blood donors Nak^{a-} platelets lack detectable GP IV (CD 36). *Blood* 76:1698-1703.
119. Yurochko AD, Liu DY, Eierman D, Haskill S (1992) Integrin as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proc Nat Acad Sci USA* 89:9034-9038.

PHỤ LỤC

HPA fréquence génique (%) dans les populations témoins

POPULATIONS	HPA-1a	HPA-1b	HPA-2a	HPA-2b	HPA-3a	HPA-3b	HPA-4a	HPA-4b	HPA-5a	HPA-5b	HPA-6a	HPA-6b	HPA-7a	HPA-8a	HPA-9a	HPA-10a	HPA-11a	HPA-13a	HPA-14a	HPA-15a	HPA-15b	Nb	ref	
Danois	83,12	16,88	91,72	8,28	62,58	37,42	100,00	0,00	92,15	7,85	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	557	1180	
Finlandais	86,00	14,00	91,00	9,00	59,00	41,00	*	*	95,00	5,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	200	1181	
Hollandais	84,60	15,40	93,40	6,60	55,50	44,50	100,00	0,00	90,20	9,80	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	200	765	
Gallois (G.B.)	82,53	17,47	90,18	9,82	60,71	39,29	100,00	0,00	99,41	18,88	100,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	339	1485	
Allemand	82,00	18,00	92,00	8,00	63,00	37,00	*	*	90,00	10,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	126	1185	
Autrichien	85,20	14,80	91,80	8,20	61,20	38,80	*	*	89,20	10,80	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	900	1170	
Français	84,80	15,20	92,00	8,00	62,00	38,00	*	*	87,40	12,60	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	800	1191	
UK	83,90	16,10	92,50	7,50	62,70	37,30	100,00	0,00	91,40	8,60	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	*	*	*	*	134	1508	
Slovènes	80,90	19,10	89,10	10,90	59,10	40,70	99,70	0,30	93,40	6,60	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	152	1351	
Polonais	87,40	12,60	89,80	10,20	59,20	40,80	100,00	0,00	93,70	6,30	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	135	1308	
Italiens	86,00	14,00	87,00	13,00	72,00	28,00	*	*	78,50	22,50	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	200	1604	
Espagnols	85,10	1,63	89,40	10,60	73,10	26,90	1,00	0,00	84,20	15,80	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	700	1354	
Algérien	82,68	17,32	*	*	*	*	*	*	83,67	16,33	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	100	1187	
Berber Maroc	74,80	25,20	81,80	18,20	68,20	31,80	100,00	0,00	86,10	13,90	100,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	110	1234		
Tunisien	75,00	25,00	*	*	69,40	30,60	*	*	78,00	22,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	93	1352	
Canadien	84,50	15,50	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	100	1178	
Américain bl.	92,00	8,00	82,00	18,00	63,00	37,00	100,00	0,00	79,00	21,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	100	1178		
Americain	89,00	11,00	92,00	9,00	67,00	33,00	100,00	0,00	89,00	11,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	100	1178		
Indiens (Chili)	99,00	1,00	*	*	67,30	38,70	99,50	0,50	97,50	2,50	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	13	1186	
Amérindien	100,00	0,00	95,70	4,20	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	79	1359	
Bresiliens	91,80	8,20	81,60	13,90	64,00	36,00	100,00	0,00	82,50	17,50	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	100	1475		
Bresiliens cauc	92,50	7,50	85,00	15,00	60,00	40,00	100,00	0,00	92,00	8,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	150	1475		
Bresiliens noirs	90,30	9,70	81,00	19,00	66,60	33,40	100,00	0,00	87,60	12,40	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	70	1475		
Amazon. Parakana	100,00	0,00	82,10	17,90	75,70	24,30	100,00	0,00	100,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	78	1359		
Amazon. Xikrin-Ka	100,00	0,00	96,30	3,70	70,80	2,92	100,00	0,00	96,30	3,70	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	100	1354		
Mapuche Indians	100,00	0,00	*	*	67,32	32,68	99,60	0,40	97,54	2,46	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	100	1354		
Mexicains	95,05	4,95	84,11	15,88	60,36	39,63	98,96	1,04	93,78	6,21	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	100	1364		
Japonnais	99,80	0,20	*	*	*	*	99,00	1,00	*	*	97,30	2,70	100,00	100,00	*	*	*	*	*	*	254	1184		
Japonnais	*	*	89,80	10,20	59,40	40,60	99,00	1,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	200	1183		
Coréen	98,80	1,20	92,30	7,70	55,50	44,50	99,00	1,00	97,80	2,20	98,00	2,00	100,00	100,00	*	*	*	*	*	*	100	1177		
Chinois Hongkong	99,50	0,50	97,50	2,50	52,50	47,50	100,00	0,00	96,50	3,50	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	300	1477		
Thai N.E.	97,16	2,83	93,83	5,83	53,33	46,67	100,00	0,00	96,33	3,67	98,50	1,50	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	137	1606		
Thai	98,50	1,50	93,80	6,20	50,70	49,30	100,00	0,00	96,30	3,70	98,50	1,50	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	52,17	47,82	107	1607
Vietnamiens Kinh	98,60	1,40	95,30	4,70	48,60	51,40	100,00	0,00	97,20	0,28	98,60	1,40	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	50,70	49,29	87,00	1482
Vietnamiens Hue	98,85	1,15	91,38	8,62	55,17	44,83	100,00	0,00	95,98	4,02	98,39	1,61	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	50,70	49,29	87,00	1481
Chinois Han	99,67	0,33	95,00	5,00	60,25	39,75	99,75	0,25	99,25	0,75	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	300	1482		
Chinois Taiwan	100,00	0,00	95,40	4,60	61,10	39,90	99,70	0,30	82,10	17,90	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	567	1481		
Minnan Taiwan	99,80	0,20	95,70	4,30	55,00	45,00	99,50	5,00	99,00	1,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	208	1498		
Hakka Taiwan	100,00	0,00	97,00	3,00	60,20	39,80	99,60	4,00	99,60	0,40	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	118	1498		
Atayal Taiwan	100,00	0,00	93,00	7,00	50,00	50,00	100,00	0,00	100,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	50	1498		
Saisiat Taiwan	100,00	0,00	95,60	4,40	45,60	54,40	100,00	0,00	96,50	3,50	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	57	1498		
Bunun Taiwan	100,00	0,00	98,90	1,10	41,70	58,30	100,00	0,00	100,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	90	1498		
Tsou Taiwan	100,00	0,00	100,00	0,00	24,50	75,50	100,00	0,00	98,00	2,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	51	1498		
Rukai Taiwan	100,00	0,00	97,00	3,00	57,00	43,00	100,00	0,00	100,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	50	1498		
Paiwan Taiwan	100,00	0,00	100,00	0,00	66,70	33,30	100,00	0,00	100,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	51	1498		
Ami Taiwan	100,00	0,00	99,50	5,00	49,50	50,50	100,00	0,00	97,50	2,50	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	9	1498		
Puyuma Taiwan	100,00	0,00	99,00	1,00	56,00	44,00	100,00	0,00	97,00	3,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	50	1498		
Taiwanese	99,83	0,17	96,10	3,90	59,50	40,50	99,83	0,17	98,14	1,86	98,00	2,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	53,80	46,20	295	1606

HPA frequency génique (%) dans les populations témoins

Indonésie	99,10	0,90	*	*	46,10	53,90	99,70	0,30	95,40	4,60	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	168	1100	
Indonésie	99,10	0,90	93,90	6,10	50,50	49,50	100,00	0,00	99,50	0,50	96,70	3,30	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	55,00	45,00	107	1604
Filipino	98,00	2,00	97,50	2,50	53,00	47,00	99,05	0,50	96,50	3,50	98,00	2,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	48,00	52,00	107	1603
Polynésien	97,50	2,25	91,30	8,70	59,90	40,10	100,00	0,00	97,50	2,50	93,30	6,80	100,00	*	100,00	100,00	100,00	*	*	46,30	53,70	81	1607
Aborigène	99,20	0,80	*	*	93,70	6,30	*	*	*	15,30	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	190	1182
Australien	83,80	16,20	*	*	64,80	35,20	*	*	93,00	7,00	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	250	1183	

TÂN XUẤT GEN HPA Ở CÁC QUẦN THỂ KHÁC NHAU

L. Halle
H. Bach K
C. Martageix
F. Bianchi
T. Lê T Kim
M.C. Morel-Kopp
J. Soulier
C. Tetaria
C. Kaplan

Eleven human platelet systems studied in the Vietnamese and Ma'ohis Polynesian populations

Key words:

anthropology; genetic diversity; human platelets antigens (HPA); immunization; Kinh Vietnamese; Oceania; polymerase chain reaction single-restriction fragment length polymorphism; polymerase chain reaction single-sequence-specific primers; Polynesian Ma'ohis

Acknowledgments:

We would like to thank Ton That Bach, Phan Thi Phi Phi, and Le Van Phung for their helpful contributions and A. Vernon-James for re-reading this manuscript.

Abstract: The frequencies of human platelet antigens (HPA) are variable among different ethnic groups. Platelet phenotyping and genotyping in different populations are important to the clinical implications of antiplatelet alloimmunization. No report on HPA prevalence has been published concerning the Vietnamese Kinh and Ma'ohis Polynesian populations. Recent anthropological and genetic marker studies suggest that these two groups have a common origin in East Asia, so we have conducted a combined study concerning the frequency of HPA-1 to HPA-11w systems (excluding HPA-8w) and Gov in these two populations. The results demonstrate a similar pattern of prevalence between Ma'ohis and most of the Asian populations. However, it should be noted that the frequency of HPA-2 is closer to northern Caucasian frequencies than to Asian frequencies. The population of Kinh shows an HPA distribution that is closer to the Chinese population than to the northeastern Thais except for HPA-3, closer to the Indonesian population. Given HPA-3 gene frequency distribution fetomaternal incompatibility could occur more frequently with the risk of alloantibody production.

Authors' affiliations:

L. Halle¹,
H. Bach K²,
C. Martageix³,
F. Bianchi⁴,
T. Lê T Kim⁵,
M.C. Morel-Kopp¹,
J. Soulier⁴,
C. Tetaria⁶,
C. Kaplan¹

¹Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS), Laboratoire d'Immunologie Plaquettaire, Paris, France

²Hanoi Medical School, Central Bio-Medical Laboratory, Hanoi, Vietnam

³National Institute of Health and Epidemiology, Hanoi, Vietnam

⁴Centre de transfusion sanguine de Tahiti, Papeete, French Polynésie

⁵Hôpital Saint Louis Service d'hématologie, Paris, France

Correspondence to:

Dr Cécile Kaplan
INTS
Laboratoire d'Immunologie Plaquettaire
6 rue Alexandre Cabanel
75739 Paris Cedex 15,
France
Tel.: +33 01 44 49 30 67
Fax: +33 01 45 67 19 30
e-mail: ckaplan@ints.fr

Specific human platelet alloantigens are involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT), platelet transfusion refractoriness (PTR), and post transfusion purpura (PTP). In Caucasians (1), the human platelet antigen (HPA)-1 system is the most important antigen system involved in alloimmunity to platelets. HPA-2b antibodies (2) have been demonstrated as a cause of PTR in a Japanese population, while anti-HPA-4b antibodies (3) have been described in cases of NAIT. The probability of an individual developing an alloimmune response depends on antigen frequencies, which may vary between different populations.

The aim of this work was to determine the frequency of platelet markers in two populations (Vietnamese Kinh and Ma'ohis Polynesian) that had not previously been studied and to identify a possible risk of alloimmunization. In addition, although the restricted polymorphism of HPA systems conveys less information than HLA

Received 21 March 2003, revised 22 July 2003,
accepted for publication 14 August 2003

Copyright © Blackwell Munksgaard 2004
Tissue Antigens.

Tissue Antigens 2004; 63: 34–40
Printed in Denmark. All rights reserved

systems, the frequencies of their antigens may have an anthropological bearing. Linguistic, botanical, zoological, and anthropological elements suggest East-Asian origins for Polynesians, supported more recently by genetic markers (4–9); this seems to be confirmed by this study. For this reason we have combined these two studies (Vietnamese and Polynesians) in one publication.

Vietnam forms the Eastern edge of the Indochina peninsula. The Viet tribes appeared for the first time during the Bronze Age (the Dong-Son civilization), and hunter people scattered across the north of Vietnam and the south of China (10). In 208 BC, the Nam Viet kingdom became a Chinese province. Chinese domination in all spheres was to last from 111 BC to 938 AD, when the kingdom of Dai Co Viet was established. From then on, successive Chinese invaders were resisted then forced out, while Vietnamese conquests extended southwards into the Champa kingdom. The Vietnamese population is now composed of 54 ethnic groups: 87% of the population is Kinh, and the other 13% comprises 53 minorities. In the case of Polynesia, though many details remain obscure concerning its settlement, the thesis of successive waves of migration is now generally accepted. In the second millennium BC, a race of sea-faring people, the Austronesians, migrated over a period of about one or two thousand years, from Taiwan and coastal Southeast China going as far as Tonga, Samoa, and Fiji. At the beginning of the modern era, a second wave of migration seems to have gone towards the Marquesas Islands, leading to settlement of Eastern Polynesia (11). Our study was carried out on the Ma'ohis, the native population of the Tuamotu Archipelago and more specifically of the atoll of Reao, the most easterly of the group. The discovery of numerous elements confirms human habitation from 1200 AD, ± 50 years.

Materials and methods

Population samples

Vietnamese population

Samples from 120 healthy, volunteer, blood donors were used in this study. Subjects from the Kinh ethnic group were identified through interview, and from their files, they were apparently unrelated for at least two generations. Out of the 120 samples taken, 13 were rejected because of an insufficient concentration of DNA.

Ma'ohis population

Samples were collected from 81 unrelated, volunteer donors aged from 18 to 20 (80% males and 20% females), during the military

drafting process in the Tuamotu Archipelago. No samples were rejected.

HPA genotyping

The salting-out method described by Miller et al. (12) was used to isolate genomic DNA from buffy coats. HPA genotyping was determined by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and/or polymerase chain reaction sequence-specific primers (PCR-SSP). PCR was performed in Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Foster City, CA).

RFLP

PCR products were digested by restricted endonuclease: Hpa II for the mutation associated with HPA-1b (13), Fok I for HPA-3 (14) and BstNI for HPA-6w (15), HPA-9w (16), Gov (17), and the deletion associated with HPA-3b (18); MnlI for HPA-5 (14); BspI286 I for HPA-7w (19); Ava I for HPA-10w (20); and Mae III for HPA-11w (21).

SSP

HPA-1, -2, -3, and -5 have been investigated by PCR-SSP (22) and HPA-4 with slight modification (primer sequences 5' to 3': HPA-4a GCT GGC CAC CCA GAT GCG; HPA-4b GCT GGC CAC CCA GAT GCA; HPA-4 common CAG GGG TTT TCG AGG GCC T), according to this publication.

Statistical analysis

Statistical analyses were made using software package HLAStat2000 (Busson M. Programme HLAStat INSERM U 396 Immunogénétique Humaine 1996. Hôpital Saint Louis, France). Allele frequencies were calculated using the gene-counting method of maximum likelihood. The χ^2 test was used to test Hardy-Weinberg equilibrium. Comparisons of allele frequencies between the two populations were assessed by χ^2 test with an automatic correction of the *P* value by the Bonferroni-method (pc value).

Results and discussion

Tables 1 and 2 show the HPA genotypes and gene frequencies observed in the Kinh and Ma'ohis populations. Concerning the Ma'ohis population, no discrepancies were observed between the results obtained with the PCR method in this study, and 110 platelet suspensions typed by the monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA) assay (HPA-1, -2, -3, -5) in a prior study

Genotype frequencies (%) in Kinh Vietnamese and Ma'ohis Polynesian populations.

	Kinh (n = 107)	Ma'ohis (n = 81)
HPA-1		
a+b-	97.2	95.0
a+b+	2.8	5.0
a-b+	0.0	0.0
HPA-2		
a+b-	90.6	83.75
a+b+	9.4	16.25
a-b+	0.0	0.0
HPA-3		
a+b-	21.5	43.75
a+b+	54.2	37.5
a-b+	24.3	18.75
HPA-4		
a+b-	100	100
HPA-5		
a+b-	94.4	95.0
a+b+	5.6	5.0
a-b+	0.0	0.0
HPA-6w		
a+b-	97.2	82.9
a+b+	2.8	17.1
a-b+	0.0	0.0
HPA-7w		
a+b-	100	100
HPA-9w		
a+b-	100	100
HPA-10w		
a+b-	100	100
HPA-11w		
a+b-	100	100
Gov		
a+b-	24.3	28.04
a+b+	57.0	52.43
a-b+	18.7	19.51

Table 1

(23). There is no significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium in any of the systems studied in these two populations. We noted the absence, in both populations, of HPA-4b, -7bw, -9bw, -10bw, and -11bw alleles (Table 1). In these populations, we observed the nine base-pair deletion located in intron 21 of the GPIIb gene associated with HPA-3b determinant (18). However, the occurrence of the second polymorphism associated with HPA-1b (T → G codon 40

Gene frequencies (±SE) in Kinh Vietnamese and Ma'ohis Polynesian populations.

	Kinh (n = 107)	Ma'ohis (n = 81)
HPA-1a	0.986 ± 0.008	0.975 ± 0.012
HPA-1b	0.014 ± 0.008	0.025 ± 0.012
HPA-2a	0.953 ± 0.014	0.913 ± 0.021
HPA-2b	0.047 ± 0.014	0.087 ± 0.021
HPA-3a	0.486 ± 0.034	0.599 ± 0.04
HPA-3b	0.514 ± 0.034	0.401 ± 0.004
HPA-4a	1.000	1.000
HPA-5a	0.972 ± 0.011	0.975 ± 0.012
HPA-5b	0.028 ± 0.011	0.025 ± 0.012
HPA-6wa	0.986 ± 0.008	0.932 ± 0.020
HPA-6wb	0.014 ± 0.008	0.068 ± 0.020
HPA-7wa	1.000	1.000
HPA-9wa	1.000	1.000
HPA-10wa	1.000	1.000
HPA-11wa	1.000	1.000
Gov-a	0.523 ± 0.035	0.537 ± 0.039
Gov-b	0.477 ± 0.035	0.463 ± 0.039

Table 2

in GPIIIa), as described by Perichon et al. (13), was not observed in these panels of individuals.

Immunization

The number of subjects studied in each population enabled us to establish a clear picture of the populations as a whole. To our knowledge, no data has been published concerning the clinical implication of platelet alloimmunization in those populations. If we consider the genotype frequencies (Table 1) in the five platelet systems now accepted as dominant in clinical implications (NAIT, PTP, and PTR), the absence of homozygous individuals HPA-1b, HPA-2b, HPA-5b is significant in both populations.

Because of its low frequency HPA-1b seems to have a low alloimmunization effect in Asian populations, possibly explaining the absence of cases of NAIT linked to HPA-1, as reported for the moment. However, although our studies did not identify any HPA-1b-homozygous individuals, the gene frequency of HPA-1b among Ma'ohis 2.5% as well as Vietnamese 1.4% (Table 2) is, with the Thai 2.8% (24) and the Koreans 1.2% (25), perceptibly higher than in other Asian populations (Table 3). Although HPA-2 heterozygous (a+b+ individuals show a frequency of 9.4% in Kinh and 16.25% in the Ma'ohis, the absence of HPA-2b homozygote does not at present rule out the possibility of finding HPA-2b homozygous subjects in :

Gene frequencies in different populations.

Populations	HPA-1a	HPA-1b	HPA-2a	HPA-2b	HPA-3a	HPA-3b	HPA-5a	HPA-5b	HPA-6a	HPA-6bw
Danish (42)	0.831	0.169	0.917	0.083	0.626	0.374	0.921	0.078		
Finnish (29)	0.860	0.140	0.910	0.090	0.590	0.410	0.950	0.050		
Polish (44)	0.874	0.126	0.898	0.102	0.592	0.408	0.937	0.063		
Dutch (47)	0.846	0.154	0.934	0.066	0.555	0.445	0.902	0.098		
German (48)	0.820	0.180	0.920	0.080	0.635	0.365	0.900	0.100		
Austrian (43)	0.852	0.148	0.918	0.082	0.612	0.388	0.892	0.108		
French (49)	0.848	0.152	0.920	0.080	0.620	0.380	0.874	0.126		
Spanish (50)	0.851	0.149	0.894	0.106	0.731	0.269	0.842	0.158		
Welsh (52)	0.825	0.175	0.902	0.098	0.607	0.393	0.903	0.097	1.000	0.000
Berber (46)	0.748	0.252	0.818	0.182	0.682	0.318	0.861	0.139	1.000	0.000
Tunisian (53)	0.750	0.250			0.694	0.306	0.780	0.220		
American black (54)	0.920	0.080	0.820	0.180	0.630	0.370	0.790	0.030		
Brazilian black (45)	0.903	0.097	0.810	0.190	0.666	0.334	0.876	0.124		
American white (54)	0.890	0.110	0.920	0.090	0.670	0.330	0.890	0.110		
Amazon Indians (55)	1.000	0.000	0.963	0.037	0.708	0.292	0.963	0.037		
Brazil Caucasians (45)	0.925	0.075	0.850	0.150	0.600	0.400	0.920	0.080		
Japanese (56, 57)	0.998	0.002							0.973	0.027
	0.991	0.009	0.900	0.100	0.718	0.282	0.973	0.027		
Korean (25)	0.988	0.012	0.923	0.077	0.555	0.445	0.978	0.022	0.980	0.020
Northeastern Thais (24)	0.972	0.028	0.938	0.058	0.533	0.467	0.963	0.037	0.985	0.015
Thai (32)	0.985	0.015	0.938	0.062	0.507	0.493	0.963	0.037	0.985	0.015
Hong Kong Chinese (33)	0.995	0.005	0.975	0.025	0.525	0.475	0.965	0.035		
Chinese Han (34)	0.997	0.003	0.950	0.050	0.602	0.397	0.992	0.007		
Chinese Taiwan (35)	0.999	0.001	0.954	0.046	0.611	0.389	0.821	0.179		
Saisiat Taiwan (37)	1.000	0.000	0.956	0.044	0.456	0.544	0.965	0.035		
Bunun Taiwan (37)	1.000	0.000	0.989	0.011	0.417	0.583	1.000	0.000		
Tsou Taiwan (37)	1.000	0.000	1.000	0.000	0.245	0.755	0.980	0.020		
Puyuma Taiwan (37)	1.000	0.000	0.990	0.010	0.560	0.440	0.970	0.030		
Indonesia (32)	0.991	0.009	0.939	0.061	0.505	0.495	0.995	0.005	0.967	0.033
Indonesia (36)	0.991	0.009			0.461	0.539	0.954	0.046		
Australian Aboriginal (51)	0.992	0.008			0.937	0.063	0.847	0.153		

Table 3

larger sample, particularly as cases of alloimmunization have already been described in the Japanese population (2). HPA-3 is associated with serious cases of NAIT (26). Observed in both populations, its gene distribution (HPA-3a Kinh 48.6% and Ma'ohis 59.9%) should encourage research into its involvement in cases of NAIT or PTR. HPA-4, associated with the first cases of NAIT as described in Japanese, indicates a homogenous population. Finally, HPA-5 (HPA-5a Kinh 97.2% and Ma'ohis 97.5%) should also be taken into account, particularly as this system is increasingly thought to be involved in cases of moderate thrombocytopenia in Caucasians and Asians. As concerns the rare antigens such as HPA-6w, three cases of

NAIT have been published: two in Finns (27) and another in a Filipino family living in Canada (28). The study published by Tanaka et al. (15) on a Japanese panel shows that 15 individuals (comprising one homozygous) out of 314 are HPA-6wb *vs* 1/150 in the Finnish population as reported by Kekomaki et al. (29). Our study shows that seven out of 81 Ma'ohis and three out of 107 Kinh subjects are HPA-6wb but without homozygous bb. Concerning the Gov system (17), there is limited information on the incidence of alloantibodies in PTP and NAIT. According to Bordin et al. (30) who published three cases of NAIT due to Gov alloimmunization, this system seems less implicated for NAIT than one would expect from the frequency of its

alleles (31), either due to a weak expression or a low immunogenicity of the polymorphic forms of the CD109, or possibly to technical difficulties leading to underdetection of Gov alloantibodies. We believe that it will be useful to study this marker in these populations.

Gene frequencies

Concerning the Kinh population, the gene frequency of HPA-1a (98.6%) displays no significant difference compared to frequencies observed in other Asian populations (24, 25, 32–34) (Tables 2 and 3). For HPA-2a (95.3%), Kinh frequency is close to Chinese Han (34) and Taiwanese of Chinese origin (35). For HPA-3, more individuals are found to be HPA-3b (51.4%) than HPA-3a (48.6%), an inversion that has already been described in Indonesians (36) and in some Taiwanese indigenous (37) populations. In 1972, Bezarcier suggested that Indonesian populations influenced North Vietnam, basing his argument on archaeological and anthropological factors. Skulls found on Mesolithic and Neolithic sites were of mainly Melanesian or Indonesian type (10). This particular characteristic reinforces the anthropological hypothesis. HPA-5a (97.2%) displays a frequency closer to Koreans (25) than to northeastern Thais (96.3%) (24) and Hong Kong Chinese (96.5%) (33) and further from Han Chinese (99.2%). Unfortunately, we do not have any comparison for HPA-6w with Chinese populations, but the frequency of HPA-6wa found in the Kinh (98.6%) corresponds to the frequencies found in East-Asian populations. Studies carried out on the Kinh population by Vu-Trieu et al. (38) concerning HLA markers on the one hand, and by Ivanova et al. (39) on Mitochondrial DNA on the other hand, describe a Kinh population whose HLA allele frequencies are present alternatively but not simultaneously in the Chinese and the Thais. Through the study of the HPA frequencies, we observe frequencies closer to those found in Chinese populations than in northeastern Thais. In 1998, another HLA study carried out by Romphruk et al. (40) concerning the distribution of alleles HLA-DRB1 in Thai populations revealed differences in the distribution amongst Thai ethnic groups. We draw attention to the fact that our comparison of platelet typing was carried out on northeastern Thai populations.

References

1. Kroll H, Kiefel V, Santoso S. Clinical aspects and typing of platelet alloantigens. *Vox Sang* 1998; 74: 345–54.
2. Saji H, Maruya E, Fujii H et al. New platelet antigens, Sib^a, involved in platelet transfusion refractoriness in a Japanese man. *Vox Sang* 1989; 56: 283–7.
3. Shibata Y, Matsuda I, Miyaji T et al. Yuk^a, a new platelet antigen involved in two cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang* 1986; 50: 177–80.

Concerning the Ma'ohis population, in 1998 Hurles et al. (41) showed in a study of the Polynesian Y chromosome that some markers display a recent European origin. In a different field, the presence of certain plants in Polynesia suggests that expeditions reached South America. Taking these elements into account, it seems relevant to compare HPA frequencies in the Ma'ohis with those of European and South American populations. Gene frequency of HPA-1a 97.5% (Table 2), is closer to Asian populations with an average of 99% and particularly the northeastern Thais (97.2%) than any other populations studied. Concerning HPA-2a (91.4%), the results are less clear-cut. However, it may be noted that frequencies close to those of certain Northern European populations can be observed (table 3): Finnish (29), Danes (42), and Austrians (43). The frequency of HPA-3a in Ma'ohis (59.9%) is difficult to compare. It is at once close to certain European populations (Finns, Polish (44)), Caucasian Brazilians (45), and to certain Asian populations (Taiwanese (32) and Han Chinese (34)) but significantly distinct from Vietnamese ($P_c = 0.014$), Indonesian and Taiwanese indigenous (37) populations. Finally, HPA-5 in the Polynesian population is close to the frequencies described in Asian populations (Vietnamese, northeastern Thais, and Hong Kong Chinese) studied so far and to a lesser degree ($P_c = 0.011$) HPA-6w (but it would be useful in the future to confirm this frequency in a broader sample).

In conclusion, this study is the first dedicated to HPA systems in the Vietnamese Kinh and Ma'ohis Polynesian populations. These two populations share linguistic, anthropological, and genetic markers allowing a combinatory analysis. The results demonstrate a similar pattern of prevalence between Ma'ohis and most of the Asian populations (HPA-3, -5, -6w) but also to certain north European populations (HPA-2). The Kinh population shows an HPA distribution closer to the Chinese population than northeastern Thais except for HPA-3, closer to the Indonesian distribution. Unfortunately, the precise origin of the Thai population cited in the article of Liu et al. (32) was not communicated. Our findings are in favor of an increased risk of alloimmunization mostly implicating the HPA-3 system. Besides HPA-3, HPA-5 should also be taken into account as it has been reported to be the second system linked with neonatal thrombocytopenia in Japan. The role of Gov in antiplatelet alloimmunization is not yet defined in Caucasians, and we can not say if the difference we observed in genotype frequencies in our study could be of clinical importance.

4. O'Shaughnessy DF, Hill AVS, Bowden DK et al. Globin genes in Micronesia: origins and affinities of Pacific Island peoples. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 144-55.
5. Melton T, Peterson R, Redd AJ et al. Polynesian genetic affinities with southeast Asian populations as identified by mt DNA analysis. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 403-14.
6. Richards M, Oppenheimer S, Sykes B. mtDNA suggests Polynesian origins in Eastern Indonesia. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1234-6.
7. Zimdahl H, Schiefenhövel W, Kayser M et al. Towards understanding the origin and dispersal of Austronesians in the Solomon Sea: HLA class II polymorphism in eight distinct populations of Asia-Oceania. *Eur J Immunogenet* 1999; 26: 405-16.
8. Mack SJ, Bugawan TL, Moonsamy PV et al. Evolution of Pacific/Asian populations inferred from HLA class II allele frequency distributions. *Tissue Antigens* 2000; 55: 383-400.
9. Imanishi T, Akaza T, Kimura A et al. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: *HLA 1991*. Oxford: Oxford University Press, 1991: 1065-220.
10. Luguern J. Tous Vietnamiens? In: *Le Viêt-Nam*. Paris: Karthala 1997: 33-60.
11. Campbell IC, Latouche JP. La colonisation austronésienne. In: *Les Insulaires Du Pacifique. Histoire et situation politique*. Paris: Presses Universitaires de France, 29-45.
12. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
13. Perichon B, Clemenceau S, Romand A et al. An additional HpaII polymorphism in exon 2 of the human platelet membrane glycoprotein IIIa gene. *Hum Genet* 1994; 93: 353-4.
14. Unkelbach K, Kalb R, Santos S et al. Genomic RFLP typing of human platelet alloantigens Zw (PI^A), Ko, Bak and Br (HPA-1, 2, 3, 5). *Br J Haematol* 1995; 89: 169-76.
15. Tanaka S, Taniue A, Nagao N et al. Genotype frequencies of the human platelet antigen, Ca/Tu, in Japanese, determined by a PCR-RFLP method. *Vox Sang* 1996; 70: 40-4.
16. Noris P, Simsek S, de Bruijine-Admiraal LG et al. Max^a, a new low-frequency platelet-specific antigen localized on glycoprotein IIb, is associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 1995; 86: 1019-26.
17. Schuh AC, Watkins NA, Nguyen Q et al. A tyrosine703serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood* 2002; 99: 1692-8.
18. Peyruchaud O, Nurden A, Bourre F. Bilateral linkage between a new deletion polymorphism in intron 21 of the GP IIb gene and the HPA-3b (Bak^b) determinant. *Br J Haematol* 1995; 91: 747-51.
19. Kuijpers RWAM, Simsek S, Faber NM et al. Single point mutation in human glycoprotein IIIa is associated with a new platelet-specific alloantigen (Mo) involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 1993; 81: 70-6.
20. Peyruchaud O, Bourre F, Morel-Kopp MC et al. HPA-10w^b (La^a): Genetic determination of a new platelet-specific alloantigen on glycoprotein IIIa and its expression in cos-7 cells. *Blood* 1997; 89: 2422-8.
21. Simsek S, Folman C, van der Schoot CE et al. The Arg633His substitution responsible for the private platelet antigen Gro^a unravelled by SSCP analysis and direct sequencing. *Br J Haematol* 1997; 97: 330-5.
22. Klüter H, Fehlau K, Panzer S et al. Rapid typing for human platelet antigen systems -1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence specific primers. *Vox Sang* 1996; 71: 121-5.
23. Martageix C, Hallé L, Proulle V et al. Gene frequencies of HPA-1, -2, -3, -5, -6, -7 and -10 in the polynesian population. 26th Congress of the International Society of Blood Transfusion, Vienne, Autriche, 9-14 Juillet 2000.
24. Romphruk AV, Srivanichrak P, Romphruk A et al. Genotyping of human platelet antigens in ethnic Northeastern Thais by the polymerase chain reaction-sequence specific primer technique. *J Med Assoc Thai* 2000; 83: 1333-9.
25. Seo DH, Park SS, Kim DW et al. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfus Med* 1998; 8: 129-32.
26. Glade-Bender J, McFarland JG, Kaplan C et al. Anti-HPA-3a induces severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *J Pediatr* 2001; 138: 862-7.
27. Kekomäki R, Jouhikainen T, Ollikainen J et al. A new platelet alloantigen, Tu^a, on glycoprotein IIIa associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia in two families. *Br J Haematol* 1993; 83: 306-10.
28. McFarland JG, Blanchette V, Collins J et al. Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to a new platelet-specific alloantibody. *Blood* 1993; 81: 3318-23.
29. Kekomäki S, Partanen J, Kekomäki R. Platelet alloantigens HPA-1, -2, -3, -5 and -6b in Finns. *Transfus Med* 1995; 5: 193-8.
30. Bordin JO, Kelton JG, Warner MN et al. Maternal immunization to Gov system alloantigens on human platelets. *Transfusion* 1997; 37: 823-8.
31. Berry JE, Murphy CM, Smith GA et al. Detection of Gov system antibodies by MAIPA reveals an immunogenicity similar to the HPA-5 alloantigens. *Br J Haematol* 2000; 110: 735-42.
32. Liu TC, Shih MC, Lin CL et al. Gene frequencies of the HPA-1 to HPA-8w platelet antigen alleles in Taiwanese, Indonesian, and Thai. *Ann Hematol* 2002; 81: 244-8.
33. Chang YW, Mytilineos J, Opelz G et al. Distribution of human platelet antigens in a Chinese population. *Tissue Antigens* 1998; 51: 391-3.
34. Dazhuang L, Zhenyu L, Yuqin B et al. Genotyping of human platelet antigens (HPA) and investigation of their gene frequencies. *Chin J Blood Transfus* 2001; 14: 177.
35. Tsao KC, Sun CF, Lai NC. The phenotype and gene frequencies of human platelet specific antigens among Chinese in Taiwan. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* 1992; 25: 48-55.
36. Santoso S, Santoso S, Kiefel V et al. Frequency of platelet-specific antigens among Indonesians. *Transfusion* 1993; 33: 739-41.
37. Chu CC, Lee H, Chu TW et al. The use of genotyping to predict the phenotypes of human platelet antigens 1 through 5 and of neutrophil antigens in Taiwan. *Transfusion* 2001; 41: 1553-8.
38. Vu-Trieu A, Djoulah S, Tran-Thi C et al. HLA-DR and -DQB1 DNA polymorphisms in a Vietnamese kinh population from Hanoi. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 345-56.
39. Ivanova R, Astrinidis A, Lepage V et al. Mitochondrial DNA polymorphism in the Vietnamese population. *Eur J Immunogenet* 1999; 26: 417-22.
40. Romphruk AV, Puapairoj C, Romphruk A et al. Distributions of HLA-DRB1/DQB1 alleles and haplotypes in the North-eastern Thai population: indicative of a distinct Thai population with Chinese admixtures in the Central Thais. *Eur J Immunogenet* 1999; 26: 129-33.
41. Hurles ME, Irvén C, Nicholson J et al. European Y-chromosomal lineages in Polynesians: a contrast to the population structure revealed by mtDNA. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1793-806.
42. Steffensen R, Kaczan E, Varming K et al. Frequency of platelet-specific alloantigens in a Danish population. *Tissue Antigens* 1996; 48: 93-6.

43. Hohensteiner A, Walchshofer S, Adler A et al. Human platelet antigen gene frequencies in the Austrian population. *Haemostasis* 1995; 25: 133-6.
44. Drzewek K, Brojer E, Zupanska B. The frequency of human platelet antigen (HPA) genotypes in the Polish population. *Transfus Med* 1998; 8: 339-42.
45. Castro V, Origa AF, Annichino-Bizzacchi JM et al. Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1-5 in three distinct ethnic groups in Brazil. *Eur J Immunogenet* 1999; 26: 355-60.
46. Ferrer G, Muniz-Diaz E, Aluja MP et al. Analysis of human platelet antigen systems in a Moroccan Berber population. *Transfus Med* 2002; 12: 49-54.
47. Simsek S, Faber NM, Bleeker PM et al. Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. *Blood* 1993; 81: 835-40.
48. Chen DF, Pastucha LT, Chen HY et al. Simultaneous genotyping of human platelet antigens by hot start sequence specific polymerase chain reaction with DNA polymerase ampli Taq gold. *Vox Sang* 1997; 72: 192-6.
49. Merieux Y, Debost M, Bernaud J et al. Human platelet antigen frequencies of platelet donors in the French population determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Pathol Biol* 1997; 45: 697-700.
50. Nogués N, Subirana L, Garcia Manzano A et al. Human platelet alloantigens in a Mexican population: a comparative gene frequency study. *Vox Sang* 2000; 78: P060.
51. Chen Z, Lester S, Boettcher B et al. Platelet antigen allele frequencies in Australian aboriginal and Caucasian populations. *Pathology* 1997; 29: 392-8.
52. Sellers J, Thompson J, Guttridge MG et al. Human platelet antigens: typing by PCR using sequence-specific primers and their distribution in blood donors resident in Wales. *Eur J Immunogenet* 1999; 26: 393-7.
53. Mojaat N, Hallé L, Proulle V et al. Gene frequencies of human platelet antigens in the Tunisian population. *Tissue Antigens* 1999; 54: 201-4.
54. Kim HO, Jin Y, Kickler TS et al. Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American, white, and Korean populations. *Transfusion* 1995; 35: 863-7.
55. Chiba AK, Bordin JO, Kuwano ST et al. Platelet alloantigen frequencies in Amazon Indians and Brazilian blood donors. *Transfus Med* 2000; 10: 207-12.
56. Tanaka S, Ohnoki S, Shibata H et al. Gene frequencies of human platelet antigens on glycoprotein IIIa in Japanese. *Transfusion* 1996; 36: 813-7.
57. Legler TJ, Köhler M, Mayr WR et al. Genotyping of the human platelet antigen systems 1 through 5 by multiplex polymerase chain reaction and ligation-based typing. *Transfusion* 1996; 36: 426-31.

ĐỊNH NHÓM KHÁNG NGUYÊN TIỂU CẦU Ở QUẦN THỂ NGƯỜI KINH, MIỀN TRUNG VIỆT NAM

Bach Khánh Hoà¹, Trần Thị Sinh¹,
Lê Thị Kim Tuyến²

¹Trường Đại học Y Hà Nội,

²Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, Hà Nội

Trên bề mặt màng tiểu cầu người có các kháng nguyên đặc hiệu tiểu cầu (HPA-Human-Platelet-Antigen) liên quan đến một số hội chứng suy giảm tiểu cầu mắc phải. Tần số gen HPA có sự sai khác giữa các quần thể. Trong nghiên cứu này, bằng phương pháp PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction- Specific Sequence Primer), chúng tôi bước đầu xác định tần số HPA của quần thể người Kinh sống ở miền Trung Việt Nam. Tần số kiểu gen quan sát được như sau: 0.977 HPA-1a/a, 0.023 HPA-1a/b, 0.000 HPA-1b/b; 0.827 HPA-2a/a, 0.161 HPA-2a/b, 0.011 HPA-2b/b; 0.276 HPA-3a/a, 0.552 HPA-3a/b, 0.173 HPA-3b/b; 0.920 HPA-5a/a, 0.080 HPA-5a/b, 0.000 HPA-5b/b, còn với HPA-4 toàn bộ 87 mẫu biểu hiện kiểu gen HPA-4a/a.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong các nhóm glycoprotein trên màng tiểu cầu người GPIIb/IIIa, GPIa, GPIb α và GPIb β có các hệ thống kháng nguyên đặc hiệu tiểu cầu (HPA) được ký hiệu từ HPA-1 đến HPA-13. Gen mã hoá cho mỗi hệ thống HPA có hai alen khác nhau ở 1 cặp nucleotid dẫn đến sự thay thế 1 axit amin tương ứng. Tần số các gen này khác nhau giữa các quần thể, ví dụ ở châu Á tần số của HPA-1a, HPA-2a, HPA-3a & HPA-5a cao hơn tần số của HPA-1b, HPA-2b và HPA-5b. Trước đây, để xác định kháng nguyên tiểu cầu, người ta đã sử dụng các kỹ thuật huyết thanh học, tuy nhiên kỹ thuật này có một số hạn chế như không có sẵn các kháng huyết thanh đặc hiệu, thời gian thực hiện phản ứng dài và hay có phản ứng chéo với nhau. Gần đây sự xuất hiện của các kỹ thuật dựa trên việc xác định gen mã hoá cho HPA đã giải quyết

các hạn chế trên. Ban đầu, người ta sử dụng kỹ thuật PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) nhưng kỹ thuật này cần có quá trình cắt bằng enzym giới hạn nên rất tốn kém, phức tạp và mất nhiều thời gian không phù hợp cho việc xác định nhanh HPA. Hiện nay, kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu (PCR-SSP) đã được chứng minh là một phương pháp đơn giản, tiết kiệm, nhanh, có độ chính xác cao có thể xác định đồng thời tất cả các hệ thống gen HPA [1, 3]. Chính vì thế, chúng tôi đã chọn kỹ thuật này để xác định tần số gen HPA của quần thể người Kinh ở miền Trung Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chúng tôi đã thu thập 87 mẫu máu từ những người không có quan hệ huyết thông ở quần thể người Kinh miền Trung Việt Nam. Quá trình tách chiết ADN từ máu ngoại vi chống đông bằng EDTA được thực

hiện theo kỹ thuật perchlorat sodium của S.A.Miller, D.D.Kykes, H.F.Polesky (1988) [7]. Các mẫu cho phản ứng PCR được sử dụng theo tác giả Jau-Yi Lyou và cộng sự [3]. Việc xác định kiểu gen HPA được tiến hành trong 2 phản ứng PCR riêng biệt sử dụng 3 mẫu trong đó có 1 mẫu chung và 2 mẫu đặc hiệu alen. Đồng thời, chúng tôi sử dụng thêm cặp mẫu HGH để khuếch đại gen mã hoá cho hormone sinh trưởng người trong tất cả các phản ứng làm chứng dương. Phản ứng PCR được thực hiện trong eppendorf 0.2ml với tổng thể tích phản ứng là 10 μ l gồm: 1Xbuffer (10X), 2.5mM dNTPs, 0.5nM mỗi HPA, 0.05nM mỗi HGH, 0.5 đơn vị enzyme *Taq* polymerase cùng với 10-15 ng ADN mẫu. Chương trình chạy như sau: 95°C: 10 giây, 13 chu kỳ (95°C: 10 giây, 63°C: 30 giây, 72°C: 30 giây), 22 chu kỳ (95°C: 10 giây, 58°C: 30 giây, 72°C: 30 giây), 72°C: 5 phút, 4°C.

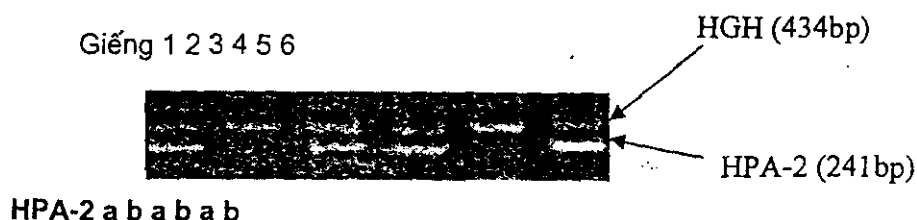
Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agrose 2%, nhuộm bằng Ethidium Bromide và quan sát dưới tia tử ngoại. Sự phân bố của kiểu gen, và tần số gen được

xác định dựa vào phương trình HaeDI-Vanbec.

III. KẾT QUẢ

Tất cả 5 cặp mẫu đều cho sản phẩm khuếch đại đặc hiệu (ảnh 1). Thời gian từ lúc bắt đầu tách chiết ADN cho đến khi hoàn thành điện di kiểm tra sản phẩm là 4 giờ. Sản phẩm PCR của 5 cặp mẫu khi điện di đều cho băng ADN chứng dương của gen HGH (438 cặp bazơ), và băng ADN của alen HPA có kích thước từ 196-252 cặp bazơ. Tần số kiểu gen HPA của 87 người cho máu được trình bày ở bảng 1. Trong số 5 HPA, thì HPA-3 có biểu hiện kiểu gen dị hợp tử cao nhất 0.276 HPA-3a/a, 0.552 HPA-3a/b, 0.172 HPA-3b/b. Với HPA-1, HPA-2, HPA-5 hầu hết đồng hợp tử a/a. Riêng HPA-4, toàn bộ có kiểu gen HPA-4a/a.

Tần số gen quan sát được như sau: 0.989 HPA-1a / 0.011 HPA-1b; 0.908 HPA-2a / 0.092 HPA2b; 0.552 HPA-3a / 0.0448 HPA-3b; 0.960 HPA-5a / 0.040 HPA-5b. Tất cả các mẫu nghiên cứu đều có kiểu gen HPA-4a (Bảng 2).



Ảnh 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR-SSP đại diện.

Mẫu1 (giếng1-2): HPA2a/a; Mẫu2 (giếng3-4): HPA2a/b; Mẫu3 (giếng5-6): HPA2b/b

Bảng 1: Tần số kiểu gen HPA

Kiểu gen HPA	Tần số
1a/1a	0.977
1a/1b	0.023
1b/1b	0.000
2a/2a	0.827
2a/2b	0.161
2b/2b	0.011
3a/3a	0.276
3a/3b	0.552
3b/3b	0.172
4a/4a	1.000
4a/4b	0.000
4b/4b	0.000
5a/5a	0.920
5a/5b	0.080
5b/5b	0.000

Bảng 2: Tần số alen HPA

Alen HPA	Tần số
HPA-1a	0.989
HPA-1b	0.011
HPA-2a	0.908
HPA-2b	0.092
HPA-3a	0.552
HPA-3b	0.448
HPA-4a	1.000
HPA-4b	0.000
HPA-5a	0.960
HPA-5b	0.040

IV. BÀN LUẬN

Kết quả thu được cho thấy, tần số gen của HPA-1a là 0.989 tương tự với tần số gen này ở quần thể người Kinh ở miền Bắc Việt Nam (0.986), quần thể người Hàn Quốc (0.988), quần thể người Thái Lan (0.985) và không có trường hợp nào được tìm thấy là có kiểu gen HPA-1b/b. Sự hiếm gặp của alen HPA-1b trong nghiên cứu này phù hợp với kết quả đã được công bố ở quần thể người châu Á. Trong nghiên cứu này chúng tôi tìm thấy tần số gen HPA-3 có sự sai khác giữa quần thể người Kinh sống ở miền Trung (0.552 HPA-3a; 0.448 HPA-3b) và miền Bắc (0.486 HPA-3a; 0.514 HPA-3b), tuy nhiên tần số này lại tương tự với quần thể người Hàn Quốc (0.555 HPA-3a; 0.445 HPA-3b) và quần thể người Thái Lan (0.533 HPA-3a; 0.467 HPA-3b). Hiện tại, chúng tôi chưa phát hiện thấy alen HPA-4b, toàn bộ mẫu nghiên cứu đều có kiểu gen HPA-4a/a. Điều này cũng bất gặp ở quần thể người Kinh ở miền Bắc và quần thể người châu Á nói chung. Còn đối với HPA-2 và HPA-5, tần số alen HPA-2a (0.908) và HPA-5a (0.950) thấp hơn kết quả đã được công bố ở quần thể người Kinh ở miền Bắc Việt Nam nhưng tương tự với quần thể người Thái Lan (Bảng 3).

Bảng 3: Tần số gen HPA ở một số quần thể châu Á

Quần thể	HPA-1		HPA-2		HPA-3		HPA-4		HPA-5	
	a	b	a	b	a	b	A	b	a	b
Kinh (Trung Việt Nam)	0.989	0.011	0.908	0.092	0.552	0.448	1.000	0.000	0.960	0.040
Kinh (Bắc Việt Nam) [2]	0.986	0.014	0.953	0.047	0.486	0.514	1.000	0.000	0.972	0.028
Hàn Quốc [8]	0.988	0.012	0.923	0.077	0.555	0.445	0.990	0.010	0.978	0.022
Thái Lan [5]	0.985	0.015	0.938	0.062	0.507	0.493	1.000	0.000	0.963	0.037
Nhật Bản [4]	0.991	0.009	0.900	0.100	0.718	0.282	1.000	0.000	0.973	0.027

V. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp PCR-SSP chúng tôi đã xác định tần số gen HPA1-5 của quần thể người Kinh sống ở miền Trung. Kết quả thu được trong nghiên cứu này sẽ giúp cho việc đánh giá sự phân bố gen HPA của người Kinh sống ở các khu vực khác nhau ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Harald Kluter, Kirstin Fehlau, Simon Panzer, Holger Kirchner, Gregor Bein. Rapid Typing for Human Platelet Antigen Systems -1, -2, -3 and -5 by PCR Amplification with Sequence Specific Primer. Vox Sang 1996;71: 121-125.
2. Halle L, Bach Khan H, Bianchi F, Le T Kim T, Kaplan C. étude de risques d'allo-immunisation plaquettaire (HPA-1 à HPA-7w, -9w à 11w et Gov) dans une population Vietnamienne. Transfusion 2003;10: 22-23.
3. Jau-Yi Lyou, Ying-Ju Chen, Hui-Yu Hu, Jeong-Shi Lin, and Cheng-Hwai Tzeng. PCR with sequence-specific primer-based simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to -13w. Transfusion 2002;42: 1089-1095.
4. Shigenori Tanaka, Atsuko Taniue, Nobuo Nagao, Shiro Ohnoki, Hirotschi Shibata, Yasuto Okubo and Hideo Yamaguchi. Simultaneous DNA typing of human platelet antigens 2, 3 and 4 by an allele-specific PCR method. Vox Sang 1995;68: 225-230.
5. Liu TC, Shih MC, Lin CL, Lin SF. Gene frequencies of the HPA-1 to HPA-8w platelet antigen alleles in Taiwanese, Indonesian, and Thai. Ann Hematol 2002;81: 244-248.
6. Legler TJ, Khohler M, Mayr WR, Panzer S, Ohto H, Fischer GH. Genotyping of the human platelet antigen systems 1 through 5 by multiplex polymerase chain reaction and ligation-based typing. Transfusion 1996;36: 426-431.
7. S.A. Miller, D.D. Dykes and H.F. Polesky. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic acids research 1988;16: 1215-1218.
8. Seo DH, Park SS, Kim DW, Furihata K, Ueno I, Han KS. Gene frequencies of eight human platelet-

specific antigens in Koreans. *Transfus Medicine* 1998;8: 129-32.

Summary

PHENOTYPING HUMAN PLATELET ANTIGENS OF THE KINH POPULATION IN THE CENTRE, VIETNAM

Located on the platelet membrane surface, human platelet specific antigens (HPAs) are related to alloimmune thrombocytopenic syndromes. The frequencies of HPA genes vary between different populations.

In this study, we initially identified HPA gene frequencies of Kinh population which are living in the Centre of Vietnam by polymerase chain reaction with specific sequence primers (PCR-SSP). The frequencies observed are following: 0.977, 0.023, 0.000 for HPA-1a/a, HPA-1a/b, HPA-1b/b; 0.827, 0.161, 0.011 for HPA-2a/a, HPA-2a/b, HPA-2b/b; 0.276, 0.552, 0.173 for HPA-3a/a, HPA-3a/b, HPA-3b/b; 0.920, 0.080, 0.000 for HPA-5a/a, HPA-5a/b, HPA-5b/b, respectively. For HPA-4, all 87 donor samples presented HPA-4a/a.