

DOI: 10.59715/pntjimp.2.3.23

## Chỉ dấu chuyển hóa của bệnh đái tháo đường tuýp 2 cho phụ nữ Việt Nam

Huỳnh Như<sup>1</sup>, Trần Thanh Sơn<sup>1</sup>, Mai Duy Linh<sup>1</sup>, Hồ Phạm Thục Lan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Nghiên cứu Y sinh, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, TP Hồ Chí Minh

### Tóm tắt

**Đặt vấn đề:** Metabolomics là một phương pháp tiếp cận mới để xác định một cách có hệ thống các chất chuyển hóa có khối lượng phân tử thấp trong dịch sinh học, tế bào và mô. Các chất chuyển hóa này đại diện cho sự biểu hiện cuối cùng của bộ gen và hồ sơ về nồng độ các chất chuyển hóa, có thể là một công cụ mạnh mẽ để hiểu rõ hơn về sự khác biệt trong bệnh đái tháo đường (ĐTĐ2) giữa các cá nhân.

**Mục tiêu:** Xác định các chất chuyển hóa liên quan với bệnh ĐTĐ2.

**Đối tượng:** 50 phụ nữ sau 50 tuổi mắc ĐTĐ2 và 50 không mắc bệnh

**Phương pháp nghiên cứu:** Thiết kế bệnh chứng (Case - control study). Xác định các metabolites có liên quan đến bệnh với phương pháp định danh không mục tiêu bằng hệ thống LC-MS/MS.

**Kết quả:** Xác định được 573 khối phổ và định danh được 153 chất chuyển hoá trên phụ nữ sau mãn kinh mắc ĐTĐ2. Với ngưỡng giá trị  $p < 0.001$ , kết quả tìm được 3 chất chuyển hóa có sự khác biệt giữa nhóm ĐTĐ2 và nhóm chứng gồm Argininosuccinic acid, 7 - Methylxanthine và Citric acid. Sau khi điều chỉnh cho độ tuổi, BMI, hoạt động thể chất chúng tôi xác định được 2 chất chuyển hóa có tương quan nghịch với HbA1c bao gồm Argininosuccinate và 7 - Methylxanthine.

**Kết luận:** Bước đầu nghiên cứu xác định được một số chỉ dấu chuyển hóa của bệnh ĐTĐ2

**Từ khóa:** Đái tháo đường tuýp 2, metabolomics, chất chuyển hóa, LC-MS/MS.

### Abstract

#### Circulating metabolites and type 2 diabetes in Vietnamese women

**Background:** Metabolomics is a new approach for the systematic identification of low molecular weight metabolites in biological fluids, cells, and tissues. These metabolites represent the ultimate expression of genome and metabolite concentration profiles, which can be a powerful tool for better understanding differences in diabetes mellitus type 2 (T2D) between individuals.

**Objectives:** To identify metabolites associated with T2D disease.

**Subjectives:** 50 women aged  $\geq 50$  years with T2D and 50 women aged  $\geq 50$  years without T2D

**Methods:** Case - control study. Identification of disease - related metabolites with non - targeted identification using the LC-MS/MS system.

**Results:** 573 mass spectrometry results and 153 metabolites were identified in postmenopausal women with T2D. With the threshold  $p < 0.001$ , the results found that three metabolites were different between the diabetes group and the

**Ngày nhận bài:**

20/5/2023

**Ngày phản biện:**

20/6/2023

**Ngày đăng bài:**

20/7/2023

**Tác giả liên hệ:**

Hồ Phạm Thục Lan

**Email:**

thuclanhopham@pnt.edu.vn

**ĐT:** 0908273638

control group, including Argininosuccinic acid, 7 - Methylxanthine, and Citric acid. After adjusting for age, BMI, and physical activity, Argininosuccinate and 7 - Methylxanthine were negatively correlated with HbA1c.

**Conclusion:** Initially, the study identified some metabolic markers of T2D.

**Keywords:** Type 2 diabetes, metabolics, metabolites, LC-MS/MS.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đái tháo đường tít 2 (ĐTĐ2) là một trong những bệnh mạn tính không lây (NCDs - Noncommunicable Diseases) thường gặp. Tổ chức Y tế thế giới (WHO - World Health Organization) ghi nhận 8.5% người dân từ 18 tuổi trở lên mắc bệnh ĐTĐ2 trên toàn thế giới vào năm 2014 và ĐTĐ2 khiến 1.5 triệu người tử vong, chiếm 48% trong tổng số trường hợp tử vong trước 70 tuổi năm 2019 [1]. Dự báo tỷ lệ mắc bệnh ĐTĐ2 gia tăng đến 10.2% vào năm 2030 và tăng đến 10.9% vào năm 2045 trên toàn cầu [2]. Riêng tại Việt Nam, trong 10 năm từ 2002 đến 2012 tỷ lệ bệnh ĐTĐ2 tăng trên 2 lần, trong đó 65% trường hợp bệnh không được phát hiện trong cộng đồng [3].

Các dữ liệu nghiên cứu cũng cho thấy ĐTĐ2 gắn liền với các biến chứng nguy hiểm như tim mạch, thận, mắt, thần kinh, nhiễm trùng và tử vong. Tiên lượng các biến chứng nguy hiểm này cải thiện nếu ĐTĐ2 được chẩn đoán sớm và điều trị thích hợp. Cho tới hiện nay ĐTĐ2 được chẩn đoán dựa vào 2 biomarkers chủ yếu là đường huyết khi đói và HbA1c, tuy nhiên các chỉ số này chưa đáp ứng được nhu cầu dự đoán bệnh sớm trước khi có tình trạng tăng đường huyết, cũng như chưa giúp dự đoán được biến chứng của bệnh. Một số kết quả ban đầu cho thấy đo lường hệ chất chuyển hoá metabolites có thể giúp xác định sớm các đối tượng nguy cơ cao của ĐTĐ2 [4 - 6], đánh giá đáp ứng điều trị cũng như chọn lựa thuốc [7, 8] và tiên lượng biến chứng [9 - 11].

Với đặc điểm là hệ bệnh lý đặc trưng bởi sự rối loạn chức năng chuyển hoá và sinh lý, do hậu quả sự tương tác giữa yếu tố di truyền và môi trường, trong đó nổi bật vai trò của sự thay đổi của lối sống và dinh dưỡng; đã khiến cho việc đo lường các chất chuyển hoá - metabolites trong cơ thể đã nổi lên như một công cụ hữu ích và quan trọng giúp ích cho việc kiểm soát bệnh mạn tính bao gồm ĐTĐ2. Khái

niệm metabolomics đã ra đời, với định nghĩa là phương pháp đo lường toàn bộ tập hợp các chất chuyển hoá metabolites của một mẫu vật sinh học tại một thời điểm nhất định và trong điều kiện cụ thể, đã trở thành một công cụ đa năng có giá trị giúp điều tra nguyên nhân và sinh lý bệnh của bệnh mạn tính, đồng thời còn có khả năng giúp tiên lượng, chẩn đoán và theo dõi đáp ứng điều trị (15, 16). Đặc biệt, với sự phát triển vượt bậc của khoa học kỹ thuật, hệ thống phân tích sắc ký kết hợp khối phổ đã giúp xác định hầu hết các phức hợp yếu tố môi trường, từ chuyển đổi vi sinh của chuyển hoá thực phẩm tới dược phẩm, bao gồm hàng ngàn yếu tố chuyển hoá cùng với các hợp chất khác có cấu trúc hóa học chưa biết như các chất chuyển hoá bậc một, lipid và các chất chuyển hoá trung gian của lipid, steroids, neurosteroids, oxylipin. Trong đó nổi bật lên phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (liquid chromatography mass spectrometry LC-MS) [12] có thể xác định và định lượng các chất chuyển hoá metabolites nồng độ thấp với độ chính xác cao, khiến phương pháp metabolomics trở nên công cụ y học tiềm năng giúp sàng lọc, phân tầng bệnh nhân và cá nhân hoá điều trị.

Trong tình hình dân số lão hoá nhanh chóng, tần suất ĐTĐ2 sẽ tăng cao hơn nữa trong cộng đồng, và gánh nặng bệnh tật sẽ gia tăng, đặc biệt trong điều kiện đô thị hoá phát triển như Việt Nam hiện nay. Tuy nhiên, việc phân định mối liên quan giữa các yếu tố môi trường với ĐTĐ2 vẫn chưa được nghiên cứu một cách có hệ thống. Bằng chứng mới nổi lên cho thấy tình trạng trao đổi chất của cơ thể là yếu tố quyết định chính của ĐTĐ2. Việc xác định các chất chuyển hoá có liên quan đến ĐTĐ2 có thể giúp nâng cao năng lực trong việc xác định sớm các bệnh nhân có nguy cơ để có biện pháp can thiệp thích hợp, góp phần cải thiện chăm sóc sức khỏe cho bệnh nhân. Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về metabolomics với ĐTĐ2, nên chúng

tôi tiến hành bước đầu khảo sát hệ chất chuyển hoá ở người Việt Nam và mối liên quan giữa các chất này với ĐTĐ2.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chúng tôi sử dụng một phần dữ liệu đã có của Nghiên cứu Vietnam Osteoporosis Study (VOS) [13]. VOS là một nghiên cứu đoàn hệ tiến cứu được thực hiện trên cộng đồng bao gồm hơn 4000 nam giới và nữ từ 18 tuổi trở lên chủ yếu sống tại Thành phố Hồ Chí Minh. Nghiên cứu được bắt đầu vào năm 2015, dự tính tiến hành trong 10 năm, việc theo dõi được thực hiện 2 năm một lần. Tất cả những người tham gia đều đồng ý ký kết văn bản đồng thuận, đồng ý cho thực hiện lấy mẫu máu lúc đói để thực hiện xét nghiệm sinh hóa và xét nghiệm di truyền, exposome. Quy trình nghiên cứu đã được Ủy ban nghiên cứu và y đức của bệnh viện Nhân Dân 115 thông qua ngày 6/8/2015 (Số ban hành 297/BV-NCKH).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu bệnh chứng

Dữ liệu là một phần thuộc phase 3 của nghiên cứu VOS được thực hiện từ tháng 06/2019 đến tháng 06/2021 với 2200 đối tượng từ 40 đến 89 tuổi. Nghiên cứu này được thực hiện đồng thời và cùng dữ liệu với nghiên cứu “Chỉ dấu chuyển hóa của bệnh loãng xương (LX) cho phụ nữ Việt Nam”. Trong đó các đối tượng sẽ được thu tuyển theo các bước sau:

1. Lập danh sách nữ trên 50 tuổi từ 2200 đối tượng của nghiên cứu VOS

2. Căn cứ vào tiêu chuẩn chẩn đoán đái tháo đường khi giá trị HbA1c của cá nhân  $\geq 6,5\%$  (48 mmol/mol) và FPG  $\geq 7.0$  mmol/L, lọc ra danh sách các bệnh nhân đạt tiêu chuẩn chẩn đoán trên và không mắc bệnh mãn tính khác. Từ danh sách này, chọn ngẫu nhiên 50 bệnh nhân nữ trên 50 tuổi bị đái tháo đường bằng phần mềm R.

3. Từ danh sách nữ trên 50 tuổi, lập danh sách các đối tượng không bị mắc bất cứ bệnh mãn tính nào, đặc biệt không bị ĐTĐ2. Từ danh sách này chọn ngẫu nhiên 50 bệnh nhân nữ trên 50 tuổi không mắc bệnh bằng phần mềm R.

**2.2.2. Tiêu chuẩn chẩn đoán ĐTĐ2:** theo tiêu chuẩn của ADA 2011 (American Diabetes Association) và WHO 2011 (World Health Organization), chẩn đoán ĐTĐ2 khi có 1 trong 3 tiêu chuẩn:

+ Đường huyết lúc đói  $\geq 7$  mmol/L 126 mg/dl) khi bệnh nhân nhịn đói sau tối thiểu 8 giờ.

+ Đường huyết  $> 11,1$  mmol/l (200mg/dl) sau 2 giờ làm nghiệm pháp dung nạp glucose bằng đường uống.

+ HbA1c  $\geq 6.5\%$  (48 mmol/mol)

Với trường hợp ĐTĐ2 có triệu chứng tăng đường huyết thì đường huyết  $> 11,1$  mmol/l (200mg/dl) ở bất kỳ thời điểm nào kèm theo các triệu chứng sau: khát, đa niệu, sụt cân, mờ mắt.

#### 2.2.3. Chỉ số lâm sàng (dữ liệu có sẵn)

Thông tin cá nhân: tên họ và địa chỉ liên lạc.

Dữ liệu liên quan thành phần kinh tế xã hội như tình trạng gia đình, trình độ học vấn, nghề nghiệp.

Chỉ số xét nghiệm: glucose máu và HbA1c

Chỉ số nhân trắc: độ tuổi, chiều cao (đo bằng một thước gắn vào tường), trọng lượng (đo bằng một cân điện tử). Chiều cao được tính khi đứng không có mang giày dép. Trọng lượng được đo bằng cân chuẩn với trị số cân nhỏ nhất là 0,1 kg và đối tượng được mặc quần áo nhẹ khi đo. Chỉ số khối cơ thể (body mass index hay BMI) được tính bằng cách lấy trọng lượng (kg) chia cho chiều cao (m) bình phương, Chia nhóm BMI theo 2 nhóm: không béo phì và nhóm béo phì, dựa theo khuyến nghị của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) dành riêng cho người châu Á [14].

Hoạt động thể chất: Dựa vào Phương pháp tiếp cận từng bước của WHO để giám sát các yếu tố nguy cơ của bệnh không lây nhiễm (The WHO Stepwise Approach to Surveillance (Steps) of Non - Communicable Disease Risk Factors), bảng câu hỏi đã được điều chỉnh cho phù hợp với người Việt Nam với 15 câu hỏi để thu thập dữ liệu thời gian dành cho công việc, di chuyển, hoạt động giải trí và nghỉ ngơi trong một tuần.

Các thông tin liên quan đến lối sống, thói quen uống rượu bia, chế độ ăn uống và vận động thể dục hàng ngày; thói quen hút thuốc lá: thu thập qua hỏi bệnh sử, đơn vị tính bằng gói năm

Xét nghiệm hóa sinh (dữ liệu có sẵn, được thu thập trong tháng 6/2015 đến tháng 6/2017)

Tất cả đối tượng nghiên cứu sau khi ký cam kết đồng ý tham gia nghiên cứu ở phase 3, đều đã được thu thập 10mL máu vào buổi sáng và nhịn ăn. Trong vòng 24 giờ sau khi lấy máu, đã được tiến hành phân tích các xét nghiệm hóa sinh gồm HbA1c (ARKRAY, Nhật Bản); và đường huyết khi đói (FPG) bằng phương pháp hexokinase (Advia 1800 Autoanalyzer; Bayer Diagnostics, Leverkusen, Germany) cho đái tháo đường. Đái tháo đường sẽ được chẩn đoán nếu giá trị HbA1c của cá nhân  $\geq 6,5\%$  (48 mmol/mol), và FPG  $\geq 7.0$  mmol/L.

#### 2.2.4. Phân tích metabolomics (mẫu huyết tương và huyết thanh đã có sẵn)

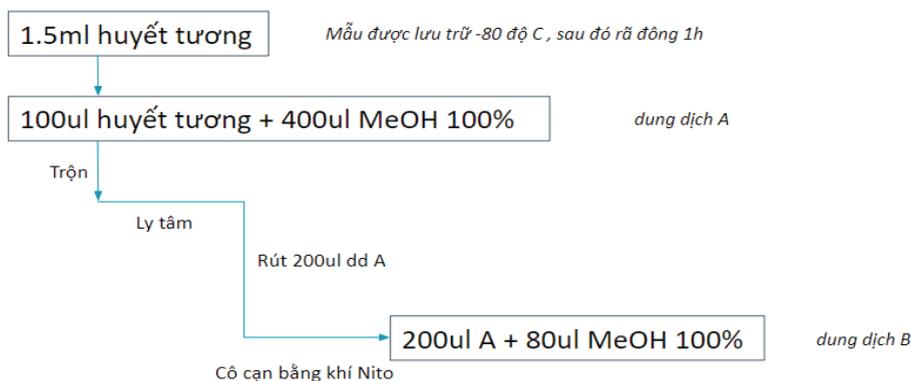
Tất cả đối tượng nghiên cứu đều đã được thu thập 1,5 mL huyết tương và 1,5mL huyết thanh ở phase 1, được lưu trữ trong tủ đông  $-80^{\circ}\text{C}$  ngay sau khi phân tách, và chưa từng được rã đông cho đến nay.

Chúng tôi sẽ định lượng hóa phối nhiễm môi trường bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (Liquid chromatography mass spectrometry LC-MS/MS). Phương pháp này được thực hiện trên mẫu cả mẫu huyết tương

và huyết thanh, có thể xác định hầu hết các phức hợp yếu tố môi trường, từ chuyển đổi vi sinh của chuyển hóa thực phẩm tới được phẩm, bao gồm khoảng 1000 yếu tố chuyển hóa như các chất chuyển hóa bậc một, lipid và các chất chuyển hóa trung gian của lipid, steroids, neurosteroids, oxylipin và vitamin D. Tất cả các chất chuyển hóa được báo cáo bằng chỉ số tích trữ, khối lượng định lượng, nhận diện cơ sở dữ liệu hóa sinh và phổ khối đầy đủ. Phân tích sẽ được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu Y sinh, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch bằng hệ thống máy NanoLC & TripleTOF 6600+ nhằm định danh các chất chuyển hóa, peptides.

#### Bước 1: Chuẩn bị mẫu

Mẫu huyết tương của mỗi người được lưu trữ ở tủ đông nhiệt độ  $-80^{\circ}\text{C}$  và chưa từng được rã đông cho đến nay. Để mẫu được phân tích bằng hệ thống LC-MS thì mẫu cần được xử lý qua thứ tự các bước sau: rã đông, trộn 100ul mẫu với 400ul MeOH 100% (tạo ra dung dịch A) và ly tâm 15000 rpm ở nhiệt độ  $4^{\circ}\text{C}$ , rút 200ul dung dịch A rồi cô cạn bằng khí nito, sau đó trộn với 80ul MeOH 100% tạo ra dung dịch B - thành phẩm được phân tích (Hình 1).



**Hình 1.** Quy trình xử lý mẫu huyết tương

**Bước 2:** Phân tích mẫu, tất cả mẫu sẽ được phân tích 2 chế độ ion dương và ion âm

- Liquid chromatography: thực hiện bằng hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng ExionLC AD cho Triple Quad 5500 QTRAP (& ExionLC AD) và hệ thống NanoLC cho NanoLC & TripleTOF 6600+; gồm pha động chứa dung môi, có nhiệm vụ đưa hợp chất lỏng qua cột của pha tĩnh nhờ kỹ thuật ion hóa ESI (electro Spray Ionization) và APCI

(Atmospheric Pressure Chemical Ionization). Tại pha tĩnh, các hợp chất khác nhau trong hỗn hợp sẽ được tách rời nhờ các hạt silica chứa trong cột ở nhiệt độ hằng định. Tuy thuộc vào sự phân vùng giữa pha động và pha tĩnh, các thành phần của hỗn hợp sẽ được tách và ra khỏi ống ở những thời điểm khác nhau.

Những chất ít ái lực với pha tĩnh sẽ được tách trước, trong khi những chất có ái lực cao sẽ được tách sau. Có sự tương tác giữa pha động

và pha tĩnh, các hợp chất có ái lực với pha động lớn sẽ ít ái lực với pha tĩnh và di chuyển nhanh qua cột.

• Mass spectrometry: có một loạt các bộ lọc tứ cực truyền các ion theo tỷ lệ khối lượng trên điện tích ( $m/z$ ) của chúng. Sau khi được tách ra từ cột LC, các hạt mang điện được dẫn tới bộ phân tích khối phổ tứ cực. Các hạt tích điện này sau đó di chuyển trong chân không cao thông qua một loạt các máy phân tích khối lượng (tứ cực) bằng cách áp dụng các trường điện từ. Một ion tiền thân có khối lượng / điện tích cụ thể (hoặc ion mẹ) được nhắm mục tiêu để đi qua tứ cực đầu tiên, loại trừ tất cả các hạt tỷ lệ khối lượng / điện tích khác. Trong buồng va chạm, các ion khối lượng / điện tích đã chọn sau đó bị phân mảnh thành các ion sản phẩm (hoặc các ion con) do va chạm với khí trơ. Tứ cực thứ ba được sử dụng để nhắm mục tiêu các mảnh ion sản phẩm cụ thể. Đây là bước quan trọng, được thực hiện bằng phương pháp bẫy ion thăng (Linear ion trap) cho hệ thống Triple Quad 5500 QTRAP và bộ phân tích hiệu suất cao AcceleratorTOF (Time of flying) cho hệ thống NanoLC & TripleTOF 6600+. Các ion sản phẩm cô lập thu được sau đó qua đầu dò. Trong đầu dò, các ion tạo ra dòng điện được chuyển thành xung điện áp. Các xung điện áp rời khỏi đầu dò tỷ lệ thuận với số lượng các ion đi vào đầu dò. Hệ thống giám sát các xung điện áp này và sau đó chuyển thông tin thành tín hiệu.

### **Bước 3:** Đọc kết quả

Tín hiệu biểu thị cường độ ion cho một giá trị  $m/z$  cụ thể và hệ thống hiển thị thông tin này dưới dạng phổ khối. Chiều cao đỉnh khối phổ của từng hợp chất sẽ được kiểm định và ghi nhận riêng biệt cho mỗi mẫu.

Với hệ thống NanoLC & TripleTOF 6600+, thư viện phổ phân giải các chất chuyển hóa (Accurate mass metabolites spectral library) giúp tìm kiếm và so sánh với các phổ phân giải cao thực nghiệm thu được từ hệ tứ cực TOF, giúp định danh các metabolites có trong mẫu.

Các chất metabolites được thu thập theo phương pháp IDA (Information - dependent

Acquisition) và được định danh với Library score > 70.

### **2.3. Phân tích dữ liệu: bằng phần mềm R studio**

Sau khi xây dựng hệ thống các chất chuyển hoá cho từng đối tượng nghiên cứu từ kết quả phân tích với hệ thống LC-MS/MS, mô hình hồi quy logistic đa biến được sử dụng để xác định các chất chuyển hoá có liên quan với ĐTĐ2. Các mô hình trên sẽ được điều chỉnh cho tác động của các yếu tố như tuổi, giới, nhân trắc, chỉ số lâm sàng. Do sử dụng hơn 1000 biến độc lập, chúng tôi sẽ đặc biệt quan tâm 2 vấn đề chính là xác định biến thực sự tương quan và loại trừ dương tính giả. Chúng tôi sẽ sử dụng phương pháp Benjamini - Hochberg (40) được dùng để kiểm soát khả năng phát hiện dương tính giả. Chúng tôi sẽ tính toán xác suất dương tính giả so với số lượng phát hiện thực tế cho mỗi mức ý nghĩa thống kê. Chúng tôi sẽ dùng phương pháp BMA (Bayesian Model Averaging) [15] và random forrest [16] (Machine learning - phương pháp học máy) để xác định mức độ quan trọng của mỗi biến phơi nhiễm môi trường và từ đó chọn ra các yếu tố tương quan thật sự.

## **3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

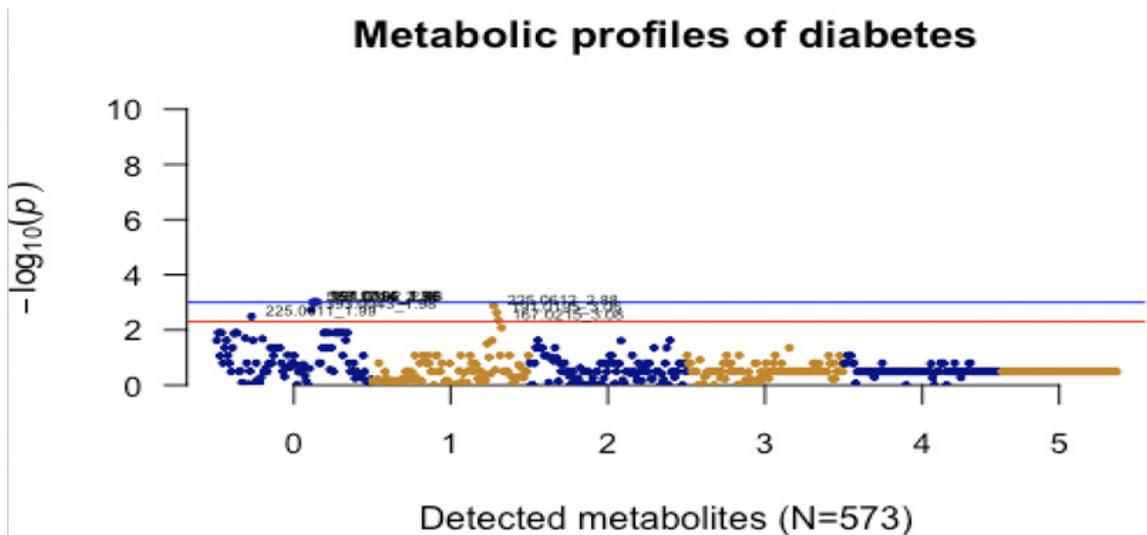
Đặc điểm nhân trắc, lâm sàng của 50 nữ đái tháo đường (ĐTĐ) và 50 nữ bình thường được trình bày trong Bảng 1. Tuổi trung bình của nhóm bệnh cao hơn nhóm chứng (60,1 so với 58,9) mặc dù sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Cân nặng của nhóm bệnh cao hơn nhóm chứng, nhưng chiều cao và BMI tương đương giữa hai nhóm. Tỷ lệ uống rượu bia thường xuyên ở cả 2 nhóm đều thấp nhưng nhóm chứng uống nhiều hơn nhóm ĐTĐ, và hoạt động thể chất của nhóm bệnh thấp hơn so với nhóm chứng. Như dự đoán, đường huyết nhóm ĐTĐ cao gần gấp hai lần so với nhóm chứng, và HbA1c cao hơn 50% so với nhóm chứng. Cholesterol, triglyceride và LDL-c ở hai nhóm đều có giá trị trên ngưỡng chẩn đoán rối loạn lipid máu (RLLM); trong đó triglyceride của nhóm ĐTĐ cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng.

**Bảng 1.** Đặc điểm nhân trắc, lâm sàng của 100 nữ (nhóm chứng và nhóm đái tháo đường) sau mãn kinh

Đặc điểm	Nhóm chứng	ĐTĐ	Giá trị p
Tuổi	58,9 (7,41)	60.1 (7.94)	0,19
Cân nặng (kg)	57,6 (7,63)	55.5 (9.32)	< 0,001
Chiều cao (cm)	153 (5,43)	152 (5,32)	0,118
BMI	24,6 (2,59)	24,0 (2,32)	0,20
Uống rượu, bia (%)	3 (6)	1 (2)	0,025
Hoạt động thể chất (MET*lần/tuần)	39,0 (27,1)	29,6 (23,8)	0,03
Glucose	5,18 (0.43)	10,2 (5.25)	< 0,001
HbA1C	5,51 (0.30)	8,64 (1.99)	< 0,001
Cholesterol	5,58 (1.08)	5,48 (1.57)	0,30
Triglyceride	1,76 (1.04)	2,54 (2.35)	0,001
LDL-C	3,52 (0,80)	3,41 (1,12)	0,24

Chú thích: Số liệu cho mỗi nhóm bao gồm số trung bình và độ lệch chuẩn (trong ngoặc).

Sau khi phân tích huyết tương bằng hệ thống LC-MS, chúng tôi xác định được 573 khối phổ (trong đó bao gồm những chất được định danh cùng tên) mang giá trị riêng biệt từng thông số như tỷ số khối lượng trên điện tích (M/Z - mass to charge ratio) và thời gian lưu (RT - Retention time). Tín hiệu (Intensity) cho thấy sự hiện diện của chất (Hình 2). Đồng thời chúng tôi cũng định danh được 153 chất chuyển hóa trên phụ nữ sau mãn kinh mắc ĐTĐ



**Hình 2.** Biểu đồ các chất chuyển hóa tìm thấy ở phụ nữ đái tháo đường

Chú thích:

- Đường xanh: với giá trị p = 0.001
- Đường đỏ: với giá trị p = 0.05
- Trục tung thể hiện log10 của giá trị p
- Trục hoành thể hiện sự phân bố của các chất chuyển hóa

Với ngưỡng giá trị p < 0.001, kết quả tìm được 3 chất chuyển hóa có sự khác biệt giữa nhóm ĐTĐ và nhóm chứng gồm Argininosuccinic acid, 7 - Methylxanthine và Citric acid (Bảng 2).

**Bảng 2.** Các chất chuyển hóa có sự khác biệt giữa nhóm ĐTĐ2 và nhóm chứng

Library Hit	M/z_Retention time	P value
Argininosuccinic acid	583.1744_2.31	0,00097812
7 - Methylxanthine	167.0214_1.96	0,00097633
Citric acid	191.0196_1.86	0,00097281

Phân loại các chất chuyển hóa của mỗi đối tượng tham gia nghiên cứu là có/không, sử dụng mô hình hồi quy logistic đa biến phân tích mối tương quan của các chất chuyển hóa với các thông số của bệnh ĐTĐ là đường huyết khi đói và HbA1c, được điều chỉnh cho độ tuổi, BMI, hoạt động thể chất chúng tôi xác định được 2 chất chuyển hóa có tương quan nghịch với HbA1c bao gồm Argininosuccinate và 7 - Methylxanthine (Bảng 3).

**Bảng 3.** Các chất chuyển hóa có liên quan đến ĐTĐ2

Chất chuyển hóa	OR [95% KTC]	Giá trị p
Argininosuccinic acid	0,79 (0,49 - 0,93)	0,0015
7 - Methylxanthine	0,84 (0,52 - 0,97)	0,0032

#### 4. BÀN LUẬN

Qua phân tích LC-MS/MS, chúng tôi xác định được 153 chất chuyển hoá cho profile của bệnh ĐTĐ ở nữ sau mãn kinh; đồng thời chúng tôi cũng tìm được 2 chất chuyển hóa có tương quan nghịch với HbA1c là Argininosuccinic acid và 7 - Methylxanthine. Ngoài ra, mặc dù không tìm thấy mối tương quan giữa Citric acid và ĐTĐ nhưng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của chất này giữa nhóm ĐTĐ và nhóm chứng.

Nghiên cứu tổng quan về các chất chuyển hoá liên quan đến ĐTĐ của tác giả Zhangchi Ning và cộng sự đã báo cáo trong số các amino acid, mặc dù phổ biến nhất là các acid amine chuỗi nhánh (Branched - chain amino acid BCAA bao gồm valine, leucine và isoleucine) và các acid amine thơm (Aromatic amino acid AAA bao gồm tyrosine, phenylalanine, và tryptophan) nhưng vẫn ghi nhận có vai trò của arginine [17]. Kết quả này tương đồng với kết quả của chúng tôi tìm thấy Argininosuccinic acid có mối tương quan nghịch với HbA1c, nồng độ Argininosuccinic acid cao trong máu có tác dụng bảo vệ giúp giảm nguy cơ ĐTĐ. Tuy tần suất phát hiện arginine không cao trong các nghiên cứu phối khổ nhằm xác định các chất chuyển hóa có liên quan đến ĐTĐ, nhưng bằng chứng lâm sàng ngày càng tăng chỉ ra rằng bổ sung L-arginine trong chế độ ăn uống có thể làm giảm béo phì, giảm huyết áp động mạch, chống lại quá trình oxy hóa và bình thường

hóa rối loạn chức năng nội mô để mang lại sự thuyên giảm bệnh [18]. Trong nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng PREDIMED trên 892 người tham gia [19], arginine đã được đo bằng kỹ thuật LC-MS/MS 2 lần trong 1 năm; kết quả ghi nhận nhóm có arginine gia tăng giúp giảm nguy cơ mắc mới của ĐTĐ; điều này cho thấy arginine đóng vai trò quan trọng trong bệnh sinh của ĐTĐ. Một cơ chế giả định cho vai trò của arginine là sự hình thành oxit nitric (NO) từ L-arginine bởi NO synthase trong tế bào β tuyến tụy [20]. Arginine cần thiết để sản xuất NO thông qua xúc tác thành citrulline bởi nitric oxide synthase (NOS) [21], và giả thuyết phổ biến là khả dụng sinh học của arginine lớn hơn có thể kích thích sản xuất NO và tăng độ nhạy insulin [22]. Do đó, những rối loạn trong con đường arginine-NO có thể là cơ sở cho cơ chế bệnh sinh ĐTĐ thông qua các cơ chế tương tự như viêm mãn tính, rối loạn chức năng ty lạp thể và stress oxy hóa [23]. Một nghiên cứu mới đây đã củng cố thêm cho vai trò quan trọng của arginine trong bệnh ĐTĐ, sử dụng các phân tích chuyển hóa, sinh hóa và chức năng, nhóm tác giả đã điều tra các tác dụng bảo vệ của glucose khi có các cytokine tiền viêm; khi có tác dụng bảo vệ, quá trình chuyển hóa glucose làm tăng cường nhanh đầu vào chu trình TCA thông qua hoạt động của pyruvate carboxylase (PC), dẫn đến tăng mức aspartate [24]. Cơ chế trao đổi chất này hỗ trợ shunt argininosuccine, cung cấp

nhiên liệu cho quá trình tạo urê từ arginine và ngược lại làm giảm việc sử dụng arginine để sản xuất oxit nitric (NO), chất trung gian chính gây độc tế bào viêm [25]. Kích hoạt trục chu trình PC-urê là đủ để ngăn chặn quá trình tổng hợp NO và bảo vệ các tế bào khỏi bị chết trong bối cảnh viêm nhiễm. Nhìn chung, những nghiên cứu này đã phát hiện ra mối liên hệ trước đây không được đánh giá cao giữa quá trình chuyển hóa glucose và con đường sử dụng arginine thông qua quá trình tạo urê do PC điều khiển như một cơ chế bảo vệ giúp khôi phục độ nhạy insulin trong cơ thể và giảm nguy cơ ĐTĐ.

Chúng tôi tìm thấy 7 Methylxanthine không chỉ có tác dụng bảo vệ trong bệnh loãng xương mà còn cả trong bệnh ĐTĐ. Kết quả này của chúng tôi phù hợp với báo cáo của nhóm tác giả Dong Hang, đã thực hiện một nghiên cứu cohort trên 1.595 phụ nữ nhằm xác định vai trò của sử dụng coffee kéo dài và nguy cơ ĐTĐ [26]. Sử dụng kỹ thuật LC-MS, tác giả đã phân tích được 461 chất chuyển hoá, trong đó có 34 chất tương quan với lượng coffee tiêu thụ; bao gồm 13 chất tương quan thuận (trong đó có 7 Methylxanthine) và 21 chất tương quan nghịch. Phân tích mối tương quan với ĐTĐ, tác giả tìm thấy các chất chuyển hoá có tương quan thuận với lượng coffee tiêu thụ sẽ có tương quan nghịch với nguy cơ ĐTĐ. Một loạt các nghiên cứu trước đây cũng tìm thấy mối liên quan chặt chẽ giữa lượng caffein tiêu thụ và chất chuyển hoá 7 methylxanthine [27] cũng như uống coffee giúp giảm nguy cơ ĐTĐ [28]. Về cơ chế bảo vệ của methylxanthine trong ĐTĐ, một nghiên cứu mới đây từ Women's Health Initiative [29] tìm thấy các chất chuyển hoá liên quan với coffee/caffein bao gồm 7 methylxanthine giúp giảm khả năng gây viêm của chế độ ăn. Kết quả này tương đồng với một nghiên cứu lớn trước đây trên 15.538 phụ nữ và 7393 nam giới, tác giả đã phát hiện thói quen uống cà phê (4 cốc/ngày) có liên quan đến nồng độ thấp của các dấu ấn sinh học gây viêm như CRP, IL6, thụ thể TNF alpha 2 [30]. Nhìn chung, các kết quả trên cho thấy vai trò tiềm năng của methylxanthine trong cơ chế kháng viêm, giúp tăng độ nhạy với insulin và giảm nguy cơ ĐTĐ, tuy nhiên cần thêm các nghiên cứu mở rộng để hiểu rõ hơn vai trò của methylxanthine trong cơ chế bệnh sinh của ĐTĐ.

Tương tự với các nghiên cứu khác ở châu Á cũng như cộng đồng da trắng, chúng tôi không tìm thấy mối tương quan giữa Citric acid và ĐTĐ, nhưng chúng tôi ghi nhận có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của chất này giữa nhóm ĐTĐ và nhóm chứng. Điều này có thể do cả citric acid và argininosuccinic acid đều là chất trung gian trong chu trình tricarboxylic acid (TCA) còn được gọi là citric acid cycle, là một loạt các phản ứng sinh hóa đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa năng lượng trong tế bào. Citric acid tham gia vào quá trình chuyển hóa oxy hóa của carbohydrate, chất béo và protein, đồng thời là nguồn sản xuất ATP quan trọng trong tế bào [31].

Mặc dù nghiên cứu này có ưu điểm là đã sử dụng kỹ thuật tiên tiến, chính xác trong lĩnh vực phân tích khối phổ là dùng hệ thống LC-MS Triple TOF 6600+ với cơ chế LC bằng máy ExionLC và cơ chế ion hóa APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), đồng thời chẩn đoán xác định ĐTĐ dựa trên cả đường huyết khi đói lẫn HbA1c được đo bằng kỹ thuật chuẩn. Tuy nhiên, một số nhược điểm của nghiên cứu của chúng tôi cũng cần được ghi nhận ở đây. Đầu tiên, chúng tôi thực hiện trên cỡ mẫu nhỏ với mỗi nhóm (N = 50), với cỡ mẫu này chúng tôi không thể phân tích subgroup cho các biến quan trọng như phân loại béo phì, phân tầng HbA1c nhằm hạn chế sai sót dương tính giả trong phân tích các mối liên quan. Thứ hai, trong nghiên cứu này chúng tôi không đủ kinh phí để định danh và định lượng các chất chuyển hoá bằng chất chuẩn, được xem là cách tối ưu để đánh giá chính xác chất chuyển hoá hiện nay, thay vào đó chất chuyển hoá được thu thập theo phương pháp IDA (Information-dependent Acquisition) và được định danh với thư viện khối phổ SCIEX-OS (Library score > 70) - một phương pháp chọn lọc phân tích phổ những chất mang tín hiệu cao nhất, bằng phương pháp định tính này chúng tôi có thể bỏ sót các chất mang tín hiệu thấp nhưng lại mang sự khác biệt đặc hiệu có hoặc không giữa hai nhóm bệnh và không bệnh.

## 5. KẾT LUẬN

Lần đầu tiên tại Việt Nam, kết quả nghiên cứu tìm ra 2 chất argininosuccinic acid và 7-methylxanthine có liên quan đến bệnh ĐTĐ2. Tuy nhiên cần có nghiên cứu mở rộng với cỡ mẫu lớn hơn và định lượng được các chất chuyển hóa.

**DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT**

LC-MS	Liquid Chromatography / Mass Spectrometry (sắc ký lỏng khối phổ)
NCDs	Noncommunicable diseases (bệnh không lây nhiễm)
BMI	Body mass index (chỉ số khối cơ thể)
KTC	Khoảng tin cậy
OR	Odd ratio (tỷ số chênh)
T2D	Type 2 Diabetes
VOS	Vietnam Osteoporosis Study (Nghiên cứu loãng xương Việt Nam)
BV	Bệnh viện
FPG	Fasting plasma glucose (đường huyết khi đói)
BMA	Bayesian Model Averaging
MET	Metabolic equivalent of task (chỉ số đo cường độ hoạt động thể chất)
M/z	Mass - to - charge ratio (khối lượng trên điện tích của chất)
RT	Retention time (thời gian lưu)
RLLM	Rối loạn lipid máu
ĐTĐ2	Đái tháo đường
GS/MS	Gas Chromatography / Mass Spectrometry
GPC	Glycerophosphocholine
PC	Phosphatidylcholine
DHA	Docosahexaenoic
TCA	Chu trình tricarboxylic acid
IDA	Information - dependent Acquisition
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
PC	Pyruvate carboxylase

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. WHO Diabetes, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
2. Saeedi, P., et al., Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019. 157: p. 107843.
3. Bộ Y tế, Chiến lược quốc gia phòng chống bệnh không lây nhiễm giai đoạn 2015- 2025.
4. Ahola - Olli, A.V., et al., Circulating metabolites and the risk of type 2 diabetes: a prospective study of 11,896 young adults from four Finnish cohorts. *Diabetologia*, 2019. 62(12): p. 2298-2309.
5. Guasch - Ferre, M., et al., Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care*, 2016. 39(5): p. 833-46.
6. Long, J., et al., Metabolite biomarkers of type 2 diabetes mellitus and pre - diabetes: a systematic review and meta - analysis. *BMC Endocr Disord*, 2020. 20(1): p. 174.
7. Bletsas, E., et al., Effect of Dapagliflozin on Urine Metabolome in Patients with Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021. 106(5): p. 1269-1283.

8. den Ouden, H., et al., Metabolomic biomarkers for personalised glucose lowering drugs treatment in type 2 diabetes. *Metabolomics*, 2016. 12: p. 27.
9. Niewczas, M.A., et al., Uremic solutes and risk of end - stage renal disease in type 2 diabetes: metabolomic study. *Kidney Int*, 2014. 85(5): p. 1214-24.
10. Sharma, K., et al., Metabolomics reveals signature of mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 2013. 24(11): p. 1901-12.
11. Wu, T., et al., Serum metabolite signatures of type 2 diabetes mellitus complications. *J Proteome Res*, 2015. 14(1): p. 447-56.
12. Xiao, J.F., B. Zhou, and H.W. Ransom, Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *Trends Analyt Chem*, 2012. 32: p. 1-14.
13. Ho - Pham, L.T. and T.V. Nguyen, The Vietnam Osteoporosis Study: Rationale and design. *Osteoporos Sarcopenia*, 2017. 3(2): p. 90-97.
14. Consultation, W.H.O.E., Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet*, 2004. 363(9403): p. 157-63.
15. Hoeting J. Bayesian model averaging: a tutorial. *Stat Sci*. 1999;14:382-417.
16. Breiman L. Random Forests. *Machine Learning*. 2001;45(1):5-32.
17. Ning, Z., et al., How Perturbated Metabolites in Diabetes Mellitus Affect the Pathogenesis of Hypertension? *Front Physiol*, 2021. 12: p. 705588.
18. Hu, S., et al., L-Arginine Modulates Glucose and Lipid Metabolism in Obesity and Diabetes. *Curr Protein Pept Sci*, 2017. 18(6): p. 599-608.
19. Yu, E., et al., Changes in arginine are inversely associated with type 2 diabetes: A case-cohort study in the PREDIMED trial. *Diabetes Obes Metab*, 2019. 21(2): p. 397-401.
20. Schaefer, A., et al., L-arginine: an ultradian - regulated substrate coupled with insulin oscillations in healthy volunteers. *Diabetes Care*, 2003. 26(1): p. 168-71.
21. Moncada, S. and A. Higgs, The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 1993. 329(27): p. 2002-12.
22. Monti, L.D., et al., Effect of a long - term oral l-arginine supplementation on glucose metabolism: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Obes Metab*, 2012. 14(10): p. 893-900.
23. Pitocco, D., et al., Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud*, 2010. 7(1): p. 15-25.
24. Fu, A., et al., Glucose - dependent partitioning of arginine to the urea cycle protects beta - cells from inflammation. *Nat Metab*, 2020. 2(5): p. 432-446.
25. Cappel, D.A., et al., Pyruvate - Carboxylase - Mediated Anaplerosis Promotes Antioxidant Capacity by Sustaining TCA Cycle and Redox Metabolism in Liver. *Cell Metab*, 2019. 29(6): p. 1291-1305 e8.
26. Hang, D., et al., Metabolomic Signatures of Long - term Coffee Consumption and Risk of Type 2 Diabetes in Women. *Diabetes Care*, 2020. 43(10): p. 2588-2596.
27. Cornelis, M.C., et al., Metabolomic response to coffee consumption: application to a three-stage clinical trial. *J Intern Med*, 2018. 283(6): p. 544-557.
28. Ding, M., et al., Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review and a dose - response meta - analysis. *Diabetes Care*, 2014. 37(2): p. 569-86.
29. Tabung, F.K., et al., Identifying metabolomic profiles of inflammatory diets in postmenopausal women. *Clin Nutr*, 2020. 39(5): p. 1478-1490.
30. Brun, L.R., et al., Effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) on Histomorphometry, Biomechanics, and Densitometry on Bones in the Rat. *Calcif Tissue Int*, 2015. 97(5): p. 527-34.
31. Martinez - Reyes, I. and N.S. Chandel, Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun*, 2020. 11(1): p. 102.