

## PHÂN TÍCH NHIỄM SẮC THỂ Ở BỆNH NHÂN VÔ SINH

Nguyễn Thị Huyền Trang<sup>2</sup>, Phan Thu Giang<sup>1</sup>, Nguyễn Hoàng Anh<sup>1</sup>,  
Trần Danh Cường<sup>1,2</sup>, Hoàng Thị Ngọc Lan<sup>1,2</sup>

### TÓM TẮT

Vô sinh là một vấn đề sức khỏe phổ biến và ảnh hưởng nhiều đến chất lượng cuộc sống của các cặp vợ chồng. Vô sinh có thể do nguyên nhân từ vợ hoặc chồng hoặc xuất phát từ cả vợ và chồng. Có nhiều nguyên nhân gây vô sinh trong đó có nguyên nhân về nhiễm sắc thể (NST) đó là một trong số các nguyên nhân vô sinh thường gặp ở các cặp vợ chồng. **Mục tiêu:** 1. Mô tả một số dạng bất thường NST thường gặp ở các cặp vợ chồng vô sinh. 2. Mô tả một số dạng đa hình NST thường gặp ở các cặp vợ chồng vô sinh. **Đối tượng** gồm 420 cặp vợ chồng vô sinh, được xét nghiệm NST từ máu ngoại vi và phân tích theo NST theo tiêu chuẩn ISCN 2016. Phương pháp nghiên cứu là mô tả hồi cứu. Số liệu được phân tích và xử lý trên phần mềm SPSS 20.0. **Kết quả:** Tỷ lệ các loại vô sinh: Vô sinh I là 6% và vô sinh II là 94%. Tỷ lệ bất thường NST 3,1%, đa hình NST 5,1% và bộ NST bình thường là 91,8%. Tỷ lệ các loại bất thường NST: Chuyển đoạn tương hỗ 69%, chuyển đoạn hòa hợp tâm 12% và lệch bội 19%. Tỷ lệ bất thường NST theo nhóm: Theo giới: Nam 3,3% và nữ 2,9%, theo loại vô sinh: Vô sinh I: 6%; vô sinh II: 2,9%. Tỷ lệ các loại đa hình NST: qh+ 67,3%, inv 14%, ps+ 4,7%, pstk+ 7% và một số dạng khác 7%. Tỷ lệ đa hình NST ở các nhóm bệnh nhân: Theo giới: Nam 4,5% và nữ 5,7%, theo loại vô sinh: Vô sinh I là 8% và vô sinh II là

4,9%. **Kết luận:** Tỷ lệ bất thường NST ở nhóm vô sinh cao hơn trong cộng đồng. Không có sự khác biệt về bất thường NST và đa hình NST ở giới nam và nữ.

**Từ khóa:** Nhiễm sắc thể, đa hình, vô sinh.

### SUMMARY

#### CHROMOSOME ANALYSIS IN PATIENTS WITH INFERTILITY

Infertility is a common health problem and greatly affects the quality of life of couples. Infertility can be caused by a spouse or from both spouses. There are many causes of infertility including chromosomal causes, which is one of the most common causes of infertility in couples.

**Objectives:** 1. Describe some types of chromosomal anomalies commonly found in infertile couples. 2. Describe some of the most common chromosome polymorphisms found in infertile couples. **Subjects** consisted of 420 infertile couples, tested for chromosomes from peripheral blood and analyzed according to chromosomes according to ISCN 2016 standards. Data were analyzed and processed on SPSS 20.0 software. **Results:** The rate of infertility: infertility I 6% and infertility II 94%. The rate of aneuploidy was 3.1%, chromosome polymorphism was 5.1% and normal chromosome was 91.8%. The rate of chromosome abnormal types: 69% reciprocal translocations, 12% robertsonian translocations, 19% aneuploidy. The rate of abnormal chromosome in patient groups: by gender: male 3.3% and female 2.9%; by infertility I: 6.0% and infertility II: 2.9%. The rate of polymorphism types: qh + 67.3%, inv 14%, ps + 4.7%, pstk + 7% and some other forms 7%. The rate of chromosome polymorphism in patient groups:

<sup>1</sup>Bệnh viện Phụ sản Trung Ương

<sup>2</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Hoàng Thị Ngọc Lan

Email: hoangthingoclan@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 4.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 19.9.2020

Ngày duyệt bài: 18.11.2020

By gender: male 4.5% and female 5.7%; by infertility: infertility I is 8% and infertility II is 4.9%. **Conclusion:** The rate of chromosomal anomaly in infertility group is higher than in the community. There is no difference in chromosomal anomalies and chromosomal polymorphism in men and women.

**Key words:** Chromosome, polymorphism, infertility.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vô sinh là một vấn đề sức khỏe phổ biến và ảnh hưởng nhiều đến chất lượng cuộc sống của các cặp vợ chồng. Theo tổ chức y tế thế giới (WHO), vô sinh ảnh hưởng đến 5% - 8% các cặp vợ chồng ở các nước đang phát triển và tỷ lệ này có thể lên đến 10% - 20% ở các nước phát triển. Vô sinh có thể là nguyên nhân dẫn đến đổ vỡ trong hôn nhân, gây tổn kém chi phí để điều trị. Chính vì những lí do trên vô sinh được xem là vấn đề rất quan trọng trong chăm sóc sức khỏe sinh sản.

Vô sinh có thể do nguyên nhân từ vợ hoặc chồng hoặc xuất phát từ cả vợ và chồng. Theo nghiên cứu của Osama và cộng sự về nguyên nhân vô sinh ở 800 cặp vợ chồng cho thấy: 35,5% nguyên nhân vô sinh xuất phát từ chồng, 42,8% nguyên nhân vô sinh do vợ, 18,4% do cả vợ và chồng và 3,4% không xác định được nguyên nhân gây vô sinh [2]. Có nhiều nguyên nhân gây vô sinh trong đó có nguyên nhân từ nhiễm sắc thể (NST) là một nguyên nhân thường gặp. Các dạng NST thường gặp nhất ở các cặp vợ chồng vô sinh bao gồm: Đa hình của nhiễm sắc thể (đa hình của NST có thể gặp ở 1,3% - 15% các cặp vợ chồng vô sinh tùy theo từng nghiên cứu)[3], các bất thường về số lượng NST, về cấu trúc NST như chuyển đoạn, đảo đoạn, nhân đoạn... Chuyển đoạn tương hỗ là một trong số các dạng bất thường NST thường gặp nhất ở người.

Xuất phát từ những lí do trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với hai mục tiêu:

1. *Mô tả một số dạng bất thường NST thường gặp ở các cặp vợ chồng vô sinh.*
2. *Mô tả một số dạng đa hình NST thường gặp ở các cặp vợ chồng vô sinh.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu gồm 420 cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh sản được chẩn đoán là vô sinh đến khám và được làm NST đồ tại Trung tâm Chẩn đoán trước sinh - Bệnh viện Phụ Sản Trung Ương năm 2018 – 2019. Số liệu được phân tích và xử lý trên phần mềm SPSS 20.0.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Kết quả chung của nghiên cứu

#### 3.1.1. Tỷ lệ các loại vô sinh

- Trong 420 cặp vợ chồng vô sinh (840 người) chỉ có 25 cặp vô sinh I (50 bệnh nhân) chiếm 6%.

- Bệnh nhân vô sinh II chiếm đa số với 395/420 cặp chiếm tỷ lệ 94%.

#### 3.1.2. Đặc điểm bộ NST của bệnh nhân nghiên cứu

Trong số 840 bệnh nhân trong nghiên cứu có 771 bệnh nhân có bộ NST bình thường chiếm 91,8%.

Có 26/840 người có bất thường NST chiếm tỷ lệ 3,1%. và 43/840 có đa hình NST chiếm tỷ lệ 5,1%.

### 3.2. Các loại bất thường NST ở bệnh nhân nghiên cứu

#### 3.2.1. Tỷ lệ bất thường NST theo giới và theo mức độ vô sinh

26 bệnh nhân có bất thường NST thì có 14 bệnh nhân nam chiếm tỷ lệ 53,8% và 12 bệnh nhân nữ chiếm tỷ lệ 46,2%. Trong đó chỉ có 3 bệnh nhân thuộc nhóm vô sinh I chiếm tỷ lệ 13% còn lại 23 bệnh nhân thuộc

nhóm vô sinh II chiếm tỷ lệ 87%.

### **3.2.2. Tỷ lệ các loại bất thường NST ở bệnh nhân nghiên cứu**

- Chuyển đoạn tương hỗ là dạng bất thường NST thường gặp nhất với tỷ lệ 69% (18/26).

- Có 3 bệnh nhân có chuyển đoạn hòa hợp tâm chiếm tỷ lệ 12% và có 5 bệnh nhân có lệch bội NST chiếm tỷ lệ 19%.

### **3.2.3. Tỷ lệ bất thường NST ở các nhóm bệnh nhân**

- Tỷ lệ bất thường NST ở bệnh nhân nam là 3,3%, trong khi đó tỷ lệ bất thường NST ở nữ là 2,9%.

- Tỷ lệ bất thường NST ở nhóm bệnh nhân vô sinh I là 6%, ở nhóm bệnh nhân vô sinh II là 2,9%.

### **3.2.4. Tỷ lệ các loại bất thường NST theo giới**

- Trong 5 bệnh nhân có lệch bội NST có 4 bệnh nhân nam chiếm tỷ lệ 80% (4/5) và chỉ có 1 bệnh nhân nữ chiếm 20% (1/5).

- Trong 18 bệnh nhân có chuyển đoạn tương hỗ có 8 bệnh nhân nam chiếm 44,4% (8/18) và 10 bệnh nhân nữ chiếm 55,6% (10/18).

- Trong 3 bệnh nhân có chuyển đoạn hòa hợp tâm có 2 bệnh nhân nam chiếm 66,7% (2/3) và 1 bệnh nhân nữ chiếm 33,3% (1/3).

### **3.2.5. Tỷ lệ các loại bất thường NST theo loại vô sinh**

- Trong 5 bệnh nhân có lệch bội NST có 3 bệnh nhân thuộc nhóm vô sinh I chiếm 60% (3/5) và 2 bệnh nhân thuộc nhóm vô sinh II chiếm 40% (2/5).

- Tất cả 18 bệnh nhân có chuyển đoạn NST và 3 bệnh nhân có chuyển đoạn hòa hợp tâm đều thuộc nhóm vô sinh II. Không có bệnh nhân nào thuộc nhóm vô sinh I có 2 loại bất thường NST này.

### **3.2.6. Các loại bất thường NST của**

### **bệnh nhân nghiên cứu**

- Có 5 bệnh nhân lệch bội NST chiếm tỷ lệ 0,6% bệnh nhân (5/840). Nam chiếm 0,48%, nữ 0,12%

- Có 18 bệnh nhân chuyển đoạn tương hỗ chiếm tỷ lệ 2,16% (18/840). Trong đó tỷ lệ này ở nam là 0,96% (8/840), nữ là 1,2% (10/840).

- Có 3 bệnh nhân chuyển đoạn hòa hợp tâm chiếm tỷ lệ 0,36% bệnh nhân nghiên cứu (3/840) (có 2 nam và 1 nữ).

### **3.3. Các loại đa hình NST ở bệnh nhân nghiên cứu**

#### **3.3.1. Tỷ lệ đa hình NST chung theo giới và theo mức độ vô sinh**

- Trong số 43 bệnh nhân có đa hình NST có 19 bệnh nhân nam chiếm tỷ lệ 44,2% và 24 bệnh nhân nữ chiếm tỷ lệ 55,8%.

- Đa số bệnh nhân đa hình NST thuộc nhóm vô sinh II với tỷ lệ 90,7% (39/43) và chỉ có 4 bệnh nhân thuộc nhóm vô sinh I chiếm 9,3%.

#### **3.3.2. Tỷ lệ các loại đa hình NST ở bệnh nhân nghiên cứu**

- Đa số bệnh nhân đa hình NST thuộc loại qh+ với tỷ lệ 67,3% (29/43).

- Có 6 bệnh nhân có đảo đoạn quanh tâm NST (inv) chiếm tỷ lệ 14%.

- Có 2 bệnh nhân có tăng chiều dài vùng vệ tinh (ps+) chiếm tỷ lệ 4,7%.

- Có 3 bệnh nhân có tăng chiều dài vùng cuống (pst+) chiếm tỷ lệ 7%.

- Còn lại 3 bệnh nhân thuộc một số dạng khác: p- và cenh+, chiếm tỷ lệ 7%.

#### **3.3.3. Tỷ lệ đa hình NST theo các nhóm bệnh nhân**

- Tỷ lệ đa hình NST ở bệnh nhân nam là 4,5%, nữ là 5,7%.

- Tỷ lệ đa hình ở nhóm bệnh nhân vô sinh I là 8%, ở nhóm bệnh nhân vô sinh II là 4,9%.

#### IV. BÀN LUẬN

##### Kết quả chung của nghiên cứu

##### - Tỷ lệ các loại vô sinh

Trong 420 cặp vợ chồng vô sinh trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ có 25 cặp bệnh nhân thuộc loại vô sinh I chiếm tỷ lệ 6% còn lại là 395 cặp bệnh nhân thuộc loại vô sinh II chiếm tỷ lệ 94%. Nghiên cứu của Elhussein gồm 800 cặp bệnh nhân vô sinh có 68,9% các cặp vợ chồng thuộc nhóm vô sinh I trong khi đó chỉ có 31,1% cặp vợ chồng thuộc nhóm vô sinh II [1]. Tỷ lệ vô sinh I của chúng tôi thấp hơn nhưng tỷ lệ vô sinh II của chúng tôi cao hơn của tác giả này.

- Đặc điểm NST của bệnh nhân nghiên cứu.

Trong số 840 bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi có 771 bệnh nhân có bộ NST bình thường chiếm tỷ lệ 91,8% (771/840). 26 bệnh nhân có bất thường số lượng hoặc cấu trúc NST (3,1%) và 43 bệnh nhân có đa hình NST (5,1%). Theo nghiên cứu của các tác giả trước đây, tỷ lệ bất thường NST ở bệnh nhân vô sinh thay đổi từ 1,3% - 15% ở các bệnh nhân vô sinh (các nghiên cứu này bao gồm cả các bệnh nhân có đa hình NST) [3]. Nghiên cứu của Mierla ở 2195 bệnh nhân vô sinh ở Romania từ 2007 đến 2011 cho thấy, tỷ lệ bất thường NST là 2,5% [2]. Tỷ lệ bất thường NST trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn trong nghiên cứu của các tác giả trên tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với giá trị  $p$  lần lượt là 0,269 và 0,167.

43 bệnh nhân có đa hình NST chiếm tỷ lệ 5,1% (43/840). Còn theo nghiên cứu của Dana Mierla gồm 1809 bệnh nhân vô sinh thì tỷ lệ đa hình NST là 6,74% [3]. Tỷ lệ đa hình NST của chúng tôi thấp hơn, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với giá trị  $p = 0,061$ .

##### Các loại bất thường NST ở các bệnh nhân nghiên cứu

##### Tỷ lệ bất thường NST theo giới, theo nhóm vô sinh

Trong nghiên cứu của chúng tôi có 26 bệnh nhân có bất thường NST thì có 14 bệnh nhân vô sinh nam chiếm tỷ lệ 53,8% và 12 bệnh nhân vô sinh nữ chiếm tỷ lệ 46,2%. Theo nghiên cứu của Mierla ở 2195 bệnh nhân vô sinh có 55 bệnh nhân bất thường NST, trong đó có 31 trường hợp là vô sinh nam chiếm tỷ lệ 56,3% và 24 trường hợp còn lại là vô sinh nữ chiếm tỷ lệ 43,7% [2].

Có 3/26 bệnh nhân có bất thường NST thuộc nhóm vô sinh I chiếm tỷ lệ 13% và 23/26 bệnh nhân thuộc nhóm vô sinh II chiếm tỷ lệ 87%. Điều này cũng phù hợp vì hầu hết các bất thường ở nhóm vô sinh II là các chuyển đoạn tương hỗ hay hòa nhập tâm, thường có kiểu hình bình thường nên họ vẫn kết hôn và vẫn có khả năng sinh con bình thường. Còn các bất thường ở nhóm vô sinh I thường thuộc các lệch bội NST, nên khả năng có con là khó hơn. Nhưng nếu tính theo tỷ lệ bất thường NST theo nhóm vô sinh thì chúng tôi thấy ở nhóm vô sinh I tỷ lệ này là 6%, còn ở nhóm vô sinh II, tỷ lệ này chỉ là 2,9%.

##### Tỷ lệ các loại bất thường NST ở bệnh nhân nghiên cứu

Trong số 26 bệnh nhân có bất thường NST của chúng tôi có 18 bệnh nhân có chuyển đoạn tương hỗ chiếm tỷ lệ cao nhất là 69% (18/26), có 3 bệnh nhân có chuyển đoạn hòa hợp tâm, tỷ lệ 12% (3/26) và có 5 bệnh nhân lệch bội NST chiếm tỷ lệ 19% (5/26). Chuyển đoạn NST là loại sắp xếp lại cấu trúc của NST thường gặp nhất ở người với tỷ lệ 1,23/1000 người. Trong số các loại chuyển đoạn NST, chuyển đoạn hòa hợp tâm là loại thường gặp nhất [4]. Trong nghiên cứu,

chúng tôi ghi nhận 18 bệnh nhân chuyển đoạn tương hỗ và 3 bệnh nhân chuyển đoạn hòa hợp tâm chiếm tỷ lệ 2,5% (21/840). Trong số 21 bệnh nhân có chuyển đoạn NST của chúng tôi có 10 bệnh nhân nam và 11 bệnh nhân nữ, với tỷ lệ tương ứng là 2,4% (10/420) và 2,6% (11/420). Trong số 10 chuyển đoạn NST ở nam giới có 8 bệnh nhân chuyển đoạn giữa các NST thường chiếm tỷ lệ 1,9% (8/420), 2 bệnh nhân có chuyển đoạn hòa hợp tâm chiếm tỷ lệ 0,5% (2/420) và không ghi nhận trường hợp nào có chuyển đoạn giữa NST thường và NST giới tính. Các nghiên cứu khác cho thấy, chuyển đoạn NST không những ảnh hưởng đến chất lượng tinh trùng mà còn ảnh hưởng đến kích thước của tinh hoàn cũng như nồng độ của các hormone sinh dục và đây chính là các yếu tố trực tiếp dẫn đến vô sinh ở người nam mang NST chuyển đoạn [4]. Trong nghiên cứu, chúng tôi cũng ghi nhận tỷ lệ chuyển đoạn NST ở nữ vô sinh khá cao, tuy nhiên cần phải tiến hành các nghiên cứu sâu hơn mới có thể khẳng định được chuyển đoạn NST có ảnh hưởng như thế nào đối với vô sinh nữ.

Lệch bội NST là một trong những nguyên nhân thường gặp gây sảy thai tự nhiên, tuy nhiên một số trường hợp mang bộ NST lệch bội vẫn có thể có khả năng sinh sản. Đối với những bệnh nhân mang bộ NST lệch bội thường có các biến đổi về kiểu hình cũng như có ảnh hưởng đến khả năng sinh sản ở cả 2 giới. Trong nghiên cứu này của chúng tôi ghi nhận 5 bệnh nhân có lệch bội NST chiếm tỷ lệ 0,6% bệnh nhân nghiên cứu (5/840) và tất cả các trường hợp này đều liên quan đến NST giới. Trong đó có 3 bệnh nhân mang bộ NST 47,XXY (hội chứng Klinefelter), 1 bệnh nhân mang bộ NST 47,XYY và 1 bệnh nhân mang bộ NST 47,XXX.

- Với 3 bệnh nhân mắc hội chứng Klinefelter, thì cả 3 bệnh nhân này là đều không tìm thấy tinh trùng trong tinh dịch (azoospermia) và đây là nguyên nhân trực tiếp dẫn đến vô sinh. Các nghiên cứu trước đây cho thấy hội chứng này gặp ở 0,1% - 0,2% trẻ nam mới sinh, tỷ lệ này có thể tăng đến 3% - 4% ở bệnh nhân vô sinh và thậm chí 10% - 20% bệnh nhân không có tinh trùng trong tinh dịch (azoospermia) [5]. Các bệnh nhân mắc hội chứng Klinefelter thường suy giảm số lượng tinh trùng (oligospermia và azoospermia), giảm nồng độ hormone sinh dục, giảm kích thước tinh hoàn và giảm ham muốn tình dục [7]. Theo nghiên cứu cho thấy, 40% -50% nam giới mắc hội chứng Klinefelter có thể tìm thấy tinh trùng trong tinh hoàn nhờ phương pháp micro-TESE và một nửa trong số các bệnh nhân này có thể có thai khi được sử dụng các biện pháp hỗ trợ sinh sản [6].

- Bệnh nhân mang bộ NST 47,XYY trong nghiên cứu của chúng tôi là nam 36 tuổi đã có một con trai 8 tuổi và mong muốn có thêm con nhưng vợ vẫn chưa có thai lại. Một số nghiên cứu cho thấy nhiều trường hợp nam giới mang bộ NST bất thường 47,XYY nhưng vẫn có khả năng sinh sản bình thường, do NST Y thừa sẽ bị mất đi trong quá trình giảm phân tạo giao tử. Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác lại cho thấy tinh trùng ở nam giới có bộ NST 47,XYY có tỷ lệ cao mang bộ NST khảm, lệch bội hoặc thậm chí lưỡng bội, nên làm tăng nguy cơ sảy thai tự nhiên, giảm khả năng sinh sản của họ.

- Bệnh nhân có bộ NST 47,XXX trong nghiên cứu của chúng tôi là bệnh nhân nữ 28 tuổi, tiền sử có 2 lần sảy thai sớm tuy nhiên khoảng 2 năm nay không thể mang thai thêm lần nào. Hầu hết phụ nữ mang bộ NST 47,XXX có kiểu hình bình thường tuy nhiên

một số có thể bị ảnh hưởng bởi tình trạng suy buồng trứng sớm hoặc các dị tật của hệ thống tiết niệu - sinh dục và đây có thể là nguyên nhân ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sinh sản.

**Tỷ lệ bất thường NST theo giới và theo phân loại vô sinh.** Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ bất thường NST ở nam giới vô sinh là 3,3%, cao hơn, ở nữ giới vô sinh là 2,9%, nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với giá trị  $p=0,69$ .

Mierla và cộng sự khi nghiên cứu 2195 bệnh nhân vô sinh ở Romania cho thấy, tỷ lệ bất thường NST ở nam giới vô sinh là 2,52% [3]. Kết quả của chúng tôi cao hơn tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê  $p$  lần lượt là 0,288 và 0,499).

Theo Mierla, tỷ lệ nữ vô sinh có bất thường NST là 2,49% [2]. Còn ở nghiên cứu của chúng tôi là 2,9% cao hơn của các tác giả này tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với  $p$  lần lượt là 0,629 và 0,179. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ bất thường NST ở bệnh nhân vô sinh I là 6% (3/50) cao hơn so với tỷ lệ bất thường NST ở các bệnh nhân vô sinh II là 2,9% (23/790). Trong số 3 bệnh nhân có bất thường NST ở bệnh nhân vô sinh I đều thuộc loại bất thường về số lượng NST (47,XXY). Còn ở các bệnh nhân vô sinh II có bất thường NST đa số thuộc loại bất thường về cấu trúc với tỷ lệ 2,7% (21/790) và chỉ có 0,2% thuộc nhóm bất thường số lượng NST (2/790).

**Tỷ lệ các loại bất thường NST theo giới và theo nhóm vô sinh.** Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, trong số 5 bệnh nhân vô sinh có bất thường về số lượng NST có 4 là nam giới chiếm 80% và chỉ có 1 là nữ giới chiếm 20%. Theo nghiên cứu của Mierla trong số 18 bệnh nhân vô sinh có bất thường về số lượng NST có 12 trường hợp là nam

giới chiếm 66,7% và chỉ có 6 trường hợp là nữ chiếm 33,3% [2]. Trong số 18 bệnh nhân có chuyển đoạn tương hỗ trong nghiên cứu của chúng tôi có 8 bệnh nhân là nam chiếm 44,4% và 10 bệnh nhân là nữ chiếm 55,6%. Trong số 3 bệnh nhân có chuyển đoạn hòa hợp tâm có 2 bệnh nhân là nam chiếm 66,7% và chỉ có 1 bệnh nhân là nữ chiếm 33,3%. Nghiên cứu của Mierla cũng cho thấy kết quả tương tự, tỷ lệ chuyển đoạn tương hỗ của bệnh nhân nam vô sinh là 44,4% (8/18) và nữ vô sinh là 55,6% (10/18) còn chuyển đoạn hòa hợp tâm trong nghiên cứu này chỉ gặp ở nam giới vô sinh (5 trường hợp) và không ghi nhận trường hợp nào có chuyển đoạn hòa hợp tâm ở nữ giới vô sinh [2].

Trong nghiên cứu này, cả 3 bệnh nhân có bất thường NST ở nhóm vô sinh I đều là bất thường về số lượng chiếm tỷ lệ 60% bệnh nhân bất thường số lượng NST còn vô sinh II chiếm tỷ lệ 40% bệnh nhân có bất thường về số lượng NST. Các bất thường về cấu trúc (chuyển đoạn tương hỗ và chuyển đoạn hòa hợp tâm) chỉ ghi nhận được ở các bệnh nhân thuộc nhóm vô sinh II.

**Các loại đa hình NST ở các bệnh nhân nghiên cứu.** Như chúng ta đã biết, đa hình nhiễm sắc thể là những biến đổi mà không gây ra bất thường ở người mang nhiễm sắc thể đa hình. Vì vậy không thể khẳng định nó là nguyên nhân gây vô sinh, nhưng trong khuôn khổ nghiên cứu này, chúng tôi muốn đưa ra tỷ lệ và các dạng đa hình gặp ở nhóm vô sinh để chúng ta tham khảo.

**Tỷ lệ đa hình NST theo giới, theo nhóm vô sinh.** Theo kết quả nghiên cứu cho thấy, trong số 43 bệnh nhân có đa hình NST trong nghiên cứu của chúng tôi có 19 bệnh nhân nam chiếm tỷ lệ 44,2% và 24 trường hợp là nữ chiếm tỷ lệ 55,8%. Như vậy tỷ lệ đa hình NST ở nhóm bệnh nhân nam thấp hơn so với

bệnh nhân nữ tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với giá trị  $p=0,434$ . Theo Ji Liang và cộng sự thấy ở 614 cặp vợ chồng vô sinh có 40 bệnh nhân đa hình NST trong đó có 22 bệnh nhân nam (55%) và 18 bệnh nhân nữ (45%) [7]. Trong số 43 bệnh nhân có đa hình NST của chúng tôi chỉ có 4 bệnh nhân thuộc nhóm vô sinh I chiếm tỷ lệ 9,3% còn lại 39 bệnh nhân thuộc nhóm vô sinh II chiếm tỷ lệ 90,7%.

**Tỷ lệ các loại đa hình NST ở bệnh nhân nghiên cứu.** Theo kết quả của chúng tôi, trong số 43 bệnh nhân có đa hình NST thì có 29 bệnh nhân thuộc nhóm qh+ chiếm 67,3%, có 6 bệnh nhân đảo đoạn quanh tâm NST số 9 chiếm 14%, 2 bệnh nhân thuộc nhóm ps+ chiếm 4,7%, 3 bệnh nhân thuộc nhóm pstk+ chiếm 7% và 3 bệnh nhân thuộc một số dạng khác như p- và cenh+ chiếm tỷ lệ 7%. Với 29 bệnh nhân thuộc nhóm qh+ chiếm tỷ lệ 3,5% tổng số bệnh nhân (29/840). Theo Mierla và cộng sự khi nghiên cứu NST của 1809 bệnh nhân vô sinh thì tỷ lệ qh+ là 2,63% [5]. Trong số 29 bệnh nhân thuộc nhóm qh+ của chúng tôi, có 13 bệnh nhân nam chiếm tỷ lệ 3,1% bệnh nhân nam vô sinh (13/420). Theo nghiên cứu của Mierla tỷ lệ qh+ ở bệnh nhân vô sinh nam là 2,76% [3].

Đảo đoạn quanh tâm của NST số 9 (inv(9)) cũng được xem là một dạng của đa hình NST, phổ biến nhất ở người bình thường, chiếm một tỷ lệ khá cao: theo nghiên cứu của Mierla ở nhóm chứng gồm 1116 thai (được thụ thai tự nhiên) tỷ lệ inv(9) là 3,76% [3]. Tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi inv(9) là 0,6% (5/840). Trong nghiên cứu của Mierla tỷ lệ inv(9) ở bệnh nhân vô sinh là 2,27% thấp hơn ở mức có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (3,76%) [2]. Như vậy, ảnh hưởng của inv(9) đến vô sinh cũng chưa thực sự được hiểu rõ.

Trong nghiên cứu của chúng tôi có 2 bệnh nhân ps+ chiếm tỷ lệ 0,24% (2/840). Tỷ lệ ps+ theo Mierla là 0,99% và 0,5% [3], thấp hơn ở mức có ý nghĩa thống kê so với nghiên cứu của Mierla với  $p=0,028$  ( $<0,05$ ) nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiên cứu của Hong Y với  $p=0,282$ . Ngoài ra, chúng tôi cũng ghi nhận 3 bệnh nhân pstk+ chiếm 0,36% (3/840). Một bệnh nhân cenh+ chiếm tỷ lệ 0,12%, 1 bệnh nhân 13p- chiếm tỷ lệ 0,12% và 1 bệnh nhân 22p- chiếm tỷ lệ 0,12%.

**Tỷ lệ đa hình NST theo giới và mức độ vô sinh.** Tỷ lệ đa hình NST của bệnh nhân nam của chúng tôi là 4,5% thấp hơn ở bệnh nhân nữ là 5,7%, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với giá trị  $p=0,434$ . Theo nghiên cứu của Li và cộng sự ở 2584 nam giới vô sinh và nhóm chứng gồm 602 nam giới bình thường cho thấy, tỷ lệ đa hình NST ở nhóm bệnh là 3,91% (101/2584) còn ở nhóm chứng là 3,15% (19/602) [8]. Kết quả ở nam của chúng tôi có cao hơn 2 nhóm này tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với giá trị  $p$  lần lượt là 0,516 và 0,107. Nghiên cứu của Ran Cheng và cộng sự (2017) gồm 19950 phụ nữ trong độ tuổi sinh đẻ được chia thành 2 nhóm: nhóm 16285 phụ nữ vô sinh và nhóm chứng gồm 3665 phụ nữ bình thường. Thì tỷ lệ đa hình NST ở nhóm vô sinh nữ là 5,53% (901/16285) còn ở nhóm chứng là 3,74% (137/3665) [9]. Tỷ lệ đa hình NST của bệnh nhân nữ trong nghiên cứu của chúng tôi là 5,7% cao hơn so với nhóm vô sinh của tác giả này với giá trị  $p=0,869$ , nhưng cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng với giá trị  $p=0,033$  ( $<0,05$ ).

Theo nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ đa hình NST ở nhóm vô sinh I là 8% cao hơn ở nhóm vô sinh II là 4,9%, sự khác biệt này

không có ý nghĩa thống kê với giá trị  $p=0,341$ .

## V. KẾT LUẬN

### 1. Đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu

- Tỷ lệ các loại vô sinh: Vô sinh I 6% và vô sinh II 94%.

- Tỷ lệ bất thường NST 3,1%, đa hình NST 5,1% và bộ NST bình thường là 91,8%.

### 2. Các loại bất thường NST trong nghiên cứu

- Tỷ lệ các loại bất thường NST

Chuyển đoạn tương hỗ 69%, chuyển đoạn hòa hợp tâm 12% và lệch bội 19%.

- Tỷ lệ bất thường ở các nhóm bệnh nhân:

Theo giới: Nam 3,3% và nữ 2,9%. Theo loại vô sinh: Vô sinh I 6,0% và vô sinh II 2,9%.

### 3. Các loại đa hình NST ở bệnh nhân nghiên cứu

- qh+ 67,3%, inv 14%, ps+ 4,7%, pstk+ 7% và một số dạng khác 7%.

## VI. KIẾN NGHỊ

- Cần tiến hành các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn để tìm mối liên quan giữa từng loại bất thường NST và từng loại đa hình NST và vô sinh.

- Nên tiến hành thêm các nghiên cứu sâu hơn về ảnh hưởng của bất thường NST và đa hình NST đến kết quả của các phương pháp hỗ trợ sinh sản ở bệnh nhân vô sinh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Osama G.E, Mohamed A.A, Suliman O.S et al (2019). Epidemiology of infertility and characteristics of infertile couples requesting assisted reproduction in a lowresource setting

in Africa, Sudan. Fertility Research and Practice, 5, 7.

2. Mierla D., Malageanu M., Tulin R. et al (2015). Prevalence of chromosomal abnormalities in infertile couples in Romania. BJMG, 18(1), 23-30.

3. Mierla D, Stoian V (2012). Chromosomal polymorphisms involved in reproductive failure in the romanian population. BJMG, 23-28.

4. Anne Mayeur, Naouel Ahdad, Laetitia Hesters et al (2018). Chromosomal translocations and semen quality: A study on 144 male translocation carriers. Elsevier Ltd on behalf of Reproductive Healthcare Ltd.

5. M. Bonomi, V. Rochira, D. Pasquali et al (2017). Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. J Endocrinol Invest, 40:123–134.

6. Alvin M Matsumoto &Bradley D Anawalt (2019). Clinical features, diagnosis, and management of Klinefelter syndrome. UpToDate.

7. Ji Liang, Yongsheng Zhang, Yang Yu et al (2014). Effect of chromosomal polymorphisms of different genders on fertilization rate of fresh IVF–ICSI embryo transfer cycles. Reproductive BioMedicine Online, 29, 436–444.

8. L.L. Li , D. Peng , R.X. Wang (2015). Correlation between chromosomal polymorphisms and male infertility in a Northeast Chinese population. Genetics and Molecular Research, 14 (4): 15435-15443.

9. Ran Cheng, Yaxian Ma, Ying Nie et al (2017). Chromosomal polymorphisms are associated with female infertility and adverse reproductive outcomes after infertility treatment: a 7-year retrospective study. Reproductive biomedicine online, 35(1), 72-80.

## PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GENE AR TRÊN BỆNH NHÂN MẮC HỘI CHỨNG KHÔNG NHẠY CẢM ANDROGEN

Nguyễn Thị Phương Mai<sup>1,2</sup>, Vũ Chí Dũng<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Mai Hương<sup>2</sup>,  
Ngô Mạnh Tiến<sup>2</sup>, Phạm Thu Hương<sup>2</sup>, Ngô Diễm Ngọc<sup>2</sup>,  
Nguyễn Ngọc Khánh<sup>2</sup>, Cấn Thị Bích Ngọc<sup>2</sup>, Bùi Phương Thảo<sup>2</sup>,  
Nguyễn Huy Hoàng<sup>3</sup>, Nguyễn Thị Kim Liên<sup>3</sup>,  
Nguyễn Thị Thanh Ngân<sup>3</sup> Nguyễn Thu Hiền<sup>1,3</sup>

### TÓM TẮT

Giải trình tự gen AR được biết đến là phương pháp chính xác để xác định nguyên nhân gây hội chứng không nhạy cảm androgen (Androgen Insensitivity syndrome-AIS). Trong nghiên cứu này, chúng tôi áp dụng phương pháp giải trình tự Sanger để tìm kiếm đột biến trên gen AR ở 01 bệnh nhân mắc hội chứng này. Kết quả nghiên cứu đã phát hiện 1 đột biến c.1741G>T (p.Val581Phe) trên exon 2 gene AR. Giải trình tự gene cho các thành viên nữ trong gia đình phát hiện 3 chị em gái có kiểu gene dị hợp tử đột biến và cháu gái có ngoại hình nữ hoàn toàn, 46,XY và có mang đột biến này. Kết quả này không những là cơ sở cho tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh sau này, giúp gia đình định hướng giới tính cho con mà còn bổ sung phổ đột biến trên gen AR ở người bệnh không nhạy cảm androgen Việt Nam.

**Từ khóa:** Không nhạy cảm androgen (AIS), gene, AR

### SUMMARY

#### DETECTION OF AR GENE MUTATIONS IN PATIENTS WITH ANDROGEN INSENSITIVITY SYNDROME

AR gene sequencing is known to be the correct method for determining the cause of Androgen Insensitivity syndrome (AIS). In this study, we apply Sanger sequencing technique to screen mutations on AR gene in 01 patient with this syndrome. The results of the study detected 1 mutation c.1741G> T (p.Val581Phe) on exon 2 AR gene. We screening this mutation for all female members in this family and we discovered that 3 sisters had the heterozygous gene mutation and one niece had a completely female appearance, 46XY and had this mutation. This result is not only the basis for genetic counseling and for prenatal diagnosis, helping the family to determine the sex of the child, but also supplementing mutations on the AR gene in patients who are diagnosed AIS in Vietnam.

**Key words:** Androgen insensitivity syndrome (AIS), gene, AR

<sup>1</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Bệnh viện Nhi Trung ương

<sup>3</sup>Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Phương Mai  
Email: nguyennphuongmai@nch.org.vn

Ngày nhận bài: 4.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 27.9.2020

Ngày duyệt bài: 20.11.2020

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng không nhạy cảm androgen (Androgen insensitivity syndrome - AIS) hay còn gọi là hội chứng kháng androgen, là một tập hợp các rối loạn di truyền liên quan với X [1]. Đây là một trong những rối loạn phổ biến nhất trong các bệnh rối loạn phát triển

giới tính ở các cá nhân có bộ nhiễm sắc thể (NST) là 46, XY [2]. Mức độ của bệnh tùy thuộc vào sự bất thường về cấu trúc và độ nhạy cảm của thụ thể androgen [3], biểu hiện dưới 3 kiểu hình: Kháng androgen hoàn toàn (complete androgen insensitivity syndrome – CAIS); kháng androgen một phần (partially androgen insensitivity syndrome – PAIS), thể kháng nhẹ (Mild androgen insensitivity syndrome – MAIS). AIS có liên quan đến các đột biến trên gen AR – gen mã hóa thụ thể androgen. Đột biến trên gen AR dẫn đến mất hoàn toàn hoặc một phần thụ thể androgen, hậu quả là androgen được sản xuất ra nhưng không đủ thụ thể để tiếp nhận, từ đó tác động của androgen lên cơ thể bị thiếu hoặc không phát huy. Không có tác động của androgen, cơ thể sẽ phát triển theo hướng nữ giới, dưới tác động của estrogen. Kết quả là dù tinh hoàn vẫn phát triển bình thường, sản xuất androgen bình thường nhưng hình dáng bên ngoài của bệnh nhân vẫn biểu hiện theo hướng nữ giới [3].

Gen AR nằm trên cánh dài của NST X, tại vị trí Xq11-12, có độ dài 10kb, bao gồm 8 exon và mã hóa 919 acid amin. AR là một yếu tố phiên mã phụ thuộc phối tử, được cấu tạo bởi ba miền chức năng như các thụ thể hạt nhân khác: miền N-terminal (NTD) (chiều dài 1-555 nucleotide), miền liên kết DNA (DBD) (chiều dài 556-623 nucleotide), miền bản lề (chiều dài 624-665 nucleotide) và miền liên kết phối tử C-terminal (LBD) (chiều dài 666-919 nucleotide) (Schweizer and Yu 2015). Cho đến nay, hơn 800 đột biến gen AR khác nhau đã được báo cáo và hầu hết trong số đó là đột biến thay thế, tần số phát hiện trên miền liên kết phối tử

(LBD) cao hơn hẳn [1]. Theo thống kê, hầu hết các đột biến xảy ra ở vùng DBD và LBD sẽ làm cho cấu trúc tinh thể thay đổi và khiến protein AR mất chức năng hoàn toàn [4]. Phần lớn các đột biến là được di truyền, tuy nhiên vẫn có 30% các trường hợp là đột biến de novo [5].

Hội chứng không nhạy cảm androgen đã được ghi nhận ở các bệnh nhân Việt Nam. Tuy nhiên con số cụ thể vẫn chưa được thống kê. Hiện tại, các nghiên cứu trong nước về vấn đề này còn hạn chế. Gần đây nhất, năm 2012, bác sĩ Vũ Chí Dũng (Bệnh viện Nhi Trung Ương) đã báo cáo kết quả nghiên cứu của mình trên 12 bệnh nhân mắc AIS. Bằng phương pháp giải trình tự gen AR, nhóm nghiên cứu đã phát hiện được 5 đột biến trên gen AR. Bao gồm 3 đột biến mới (p.L701F (c.2103G>T); p.L705F (c.2113C>T); p. W752S (c. 2256 G>T)), và hai đột biến đã biết (p.V747M; p.V867M (c.2599 G>A)) (Vu Chi Dung, Maki Fukami et al. 2013) [6].

Mục tiêu: áp dụng kỹ thuật giải trình tự Sanger để phân tích trình tự gen AR, sàng lọc đột biến từ exon 2 đến exon 8 và vùng ranh giới exon/intron của gen AR trên 1 bệnh nhân mắc hội chứng không nhạy cảm androgen từ đó phân tích gene AR trên các thành viên nữ trong gia đình để phát hiện người mang gen đột biến.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân có ngoại hình là trẻ trai, sinh năm 2015, đến khám tại bệnh viện Nhi trung ương lúc 3 tuổi với chẩn đoán thoát vị bẹn. Bệnh nhân có triệu chứng dị dạng bộ phận

sinh dục ngoài, lỗ đái lệch thấp. Nhóm nghiên cứu cũng tiến hành giải trình tự gen AR trên 8 thành viên nữ trong gia đình bệnh nhân.

Các nghiên cứu trên đối tượng bệnh nhân được tuân thủ đúng theo y đức và được thông qua hội đồng y đức trong nghiên cứu y sinh.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

DNA tổng số được tách chiết từ máu ngoại vi bằng cột lọc chuyên dụng sử dụng kit tách chiết DNA QiaAmp DNA blood mini kit (Qiagen- Đức). Phản ứng PCR khuếch đại gen AR gồm các thành phần: 5 µl 10X buffer (Invitrogen), 2 µl MgCl<sub>2</sub> 50mM (Invitrogen), 2 µl dNTPs 10 mM (Invitrogen), 0.3 µl 10U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 2 µl Mỗi 10uM (Invitrogen), 35.5 µl dH<sub>2</sub>O (Invitrogen), 3 µl DNA. Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt [94°C, 1 phút; 60°C, 50 giây; 72°C, 1 phút] x 35 chu kỳ. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng cột lọc QIAamp PCR purification kit (Qiagen- Đức).

### Giải trình tự gen

Phản ứng PCR mỗi đơn được thực hiện theo chu trình nhiệt [95°C, 30 giây; 50°C, 10 giây; 60°C, 4 phút] x 30 chu kỳ. Giải trình tự vùng exon và ranh giới exon- intron của gen AR được tiến hành trên máy Genetic Analyser 3500 (ABI). Trình tự gen được phân tích bằng phần mềm Chromas Pro, sau đó được đưa lên ngân hàng gen thế giới (GeneBank) để so sánh với trình tự chuẩn (M35844.1-M35851.1).

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Kết quả xét nghiệm lâm sàng

Bệnh nhân là con thứ hai trong gia đình gồm 2 chị em. Siêu âm tinh hoàn phát hiện

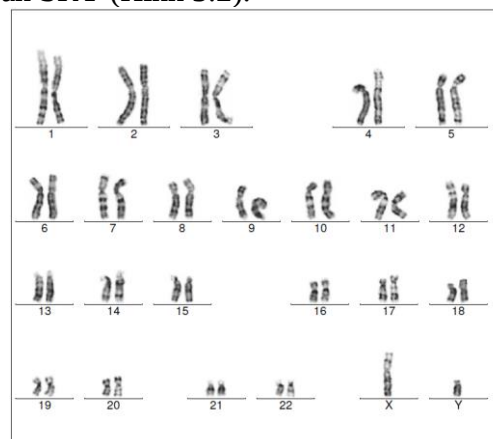
tinh hoàn phải ở vị trí ống bẹn phải, tinh hoàn trái ở bìu trái (hình 3.1).



**Hình 3.1: Bệnh nhân III.6**

- 1, Bệnh nhân có ngoại hình nam.
- 2, Bộ phận sinh dục ngoài giống trẻ gái, lỗ đái thấp.

Xét nghiệm sinh hóa như sau: FSH (máu) 2,45 IU/L; LH <0,1 IU/L; Testosterone 0,21 nmol/L; Androstenedione <1,05 nmol/L; 17-OHP 0,2 nmol/L. Xét nghiệm Karyotype từ máu ngoại vi 46,XY và có gene biệt hóa tinh hoàn SRY (Hình 3.2).

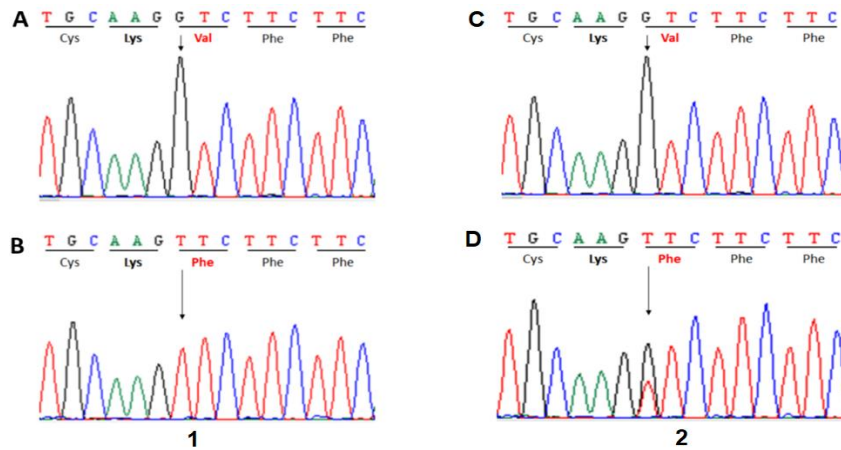


**Hình 3.2. Kết quả xét nghiệm công thức Nhiễm sắc thể từ máu ngoại vi (Karyotype) Bệnh nhân có kết quả 46,XY**

**3.2. Kết quả giải trình tự phát hiện đột biến.** Bằng phương pháp giải trình tự gene, nhóm nghiên cứu đã phát hiện bệnh nhân có mang đột biến trên gene AR. Đây là đột biến thay thế acid amin ở vị trí 1741 trên cDNA (c.1741G>T), nucleotide Guanin bị biến đổi

thành nucleotide Thymin. Đột biến dẫn đến sự thay thế acid amin Valine ở vị trí 581 trên protein thành acid amin Phenylalanine

(p.Val581Phe) (hình 3.3). Đột biến này được đánh giá là gây bệnh theo chỉ số Polyphen và SIFT.



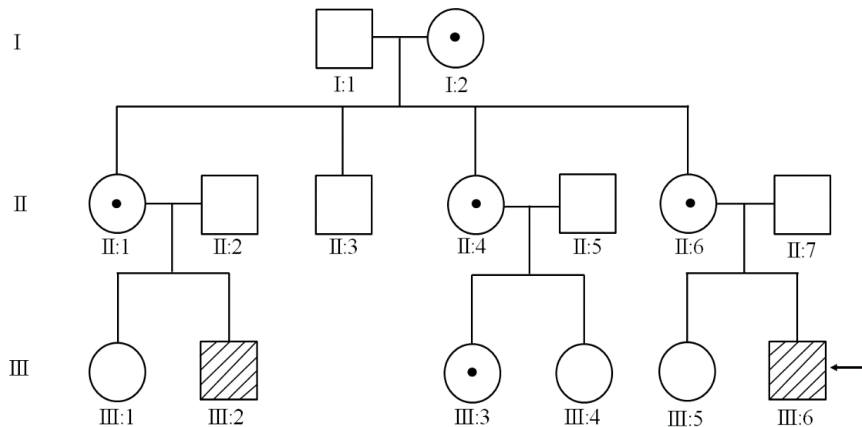
**Hình 3.3. Đột biến c.1741G>T (p.Val581Phe) trên gene AR**

(1) Đột biến ở vị trí nucleotide 1741 Guanine thay thế bằng Thymine (c.1741G>T) trên exon 2 của gene AR, làm thay đổi axit amin ở vị trí số 581, Valine thay thế thành Phenylalanine (p.Val581Phe). A. Mẫu đối chứng không mang đột biến (III:2). B. Bệnh nhân 46,XY mang đột biến (III:6).

(2) Dị hợp tử đột biến ở vị trí nucleotide 1741 Guanine thay thế bằng Thymine (c.1741G>T) trên exon 2 của gene AR, làm thay đổi axit amin ở vị trí số 581, Valine

thay thế thành Phenylalanine (p.Val581Phe). C. Mẫu đối chứng không mang đột biến. D. Kiểu gen dị hợp tử đột biến c.1741G>T (p.Val581Phe)

Nhóm nghiên cứu tiếp tục tiến hành phân tích đột biến c.1741G>T cho các thành viên nữ trong gia đình (II:1; II:4; II:6; III:1; III:2; III:3; III:4; III:5) (hình 2.3). Kết quả phát hiện các thành viên số II:1; II:4; II:6 và III:3 có kiểu gene dị hợp tử đột biến c.1741G>T (bảng 3.1).



**Hình 3.4. Sơ đồ phả hệ các thành viên trong gia đình**

Thành viên số III: 2 sinh năm 2013 là trẻ gái (hình 3.5), ngoại hình nữ. trẻ khám lúc 19 tháng tuổi với chẩn đoán thoát vị bẹn. Siêu âm không thấy tử cung, buồng trứng. Xét nghiệm Nhiễm sắc thể 46,XY và có gene biệt hóa tinh hoàn. Bộ phận sinh dục ngoài giống như trẻ gái và có phát hiện đột biến c.1741G>T. Như vậy, có thể kết luận thành viên số III:2 trong gia đình mắc hội chứng không nhạy cảm androgen.



**Hình 3.5: Bệnh nhân III.2**

- 1, Bệnh nhân có ngoại hình nữ hoàn toàn.
- 2, Bộ phận sinh dục giống trẻ gái

**Bảng 3.1. Kết quả sàng lọc đột biến c.1741G>T các thành viên nữ trong gia đình**

| Thành viên   | Kết quả                                |
|--------------|----------------------------------------|
| II:1         | Dị hợp tử đột biến c.1741G>T           |
| II:4         | Dị hợp tử đột biến c.1741G>T           |
| II:6         | Dị hợp tử đột biến c.1741G>T           |
| III:1        | Không phát hiện đột biến c.1741G>T     |
| <b>III:2</b> | <b>Phát hiện đột biến c.1741G&gt;T</b> |
| III:3        | Dị hợp tử đột biến c.1741G>T           |
| III:4        | Không phát hiện đột biến c.1741G>T     |
| III:5        | Không phát hiện đột biến c.1741G>T     |

#### IV. BÀN LUẬN

Hội chứng không nhạy cảm androgen là một hội chứng hiếm gặp, do đột biến trên gene AR- gene quy định thụ thể androgen nằm trên NST X gây ra và có tính di truyền. Sự chồng chéo về mặt biểu hiện lâm sàng giữa AIS và một số bệnh rối loạn phát triển giới tính khác như thiếu hụt 5- $\alpha$  reductase, hay thiếu hụt 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type III hoặc thực tế là bệnh nhân bị khiếm khuyết sinh tổng hợp T có thể gây nên những khó khăn trong chẩn đoán lâm sàng. Ngoài ra, phân tích nồng độ nội tiết ở trẻ nhỏ thường khó khăn hơn và không dễ tóm gọn theo một quy luật nhất định. Thêm vào đó, ở một số trường hợp ranh giới, sự khác biệt về nồng độ các hormone là không rõ rệt. Chính vì thế, việc xác định nguyên nhân gây bệnh cần sự kết hợp với các phương pháp chẩn đoán về lâm sàng, hóa sinh, và phương pháp phân tử. Giải trình tự gene là phương pháp sinh học phân tử tiên tiến, được áp dụng để chẩn đoán bệnh AIS ở các bệnh nhân 46,XY và có biểu hiện rối loạn phát triển giới tính hoặc ở các gia đình có tiền sử bệnh. Vì thế, kết quả xác định nguyên nhân gây bệnh sẽ chính xác và đầy đủ thông tin.

Trong nghiên cứu này, bằng phương pháp giải trình gene AR, chúng tôi đã phát hiện một đột biến đã biết (c.1741G>T (p.Val581Phe)) ở exon 2 của 1 bệnh nhân được chẩn đoán rối loạn phát triển giới tính. Xét nghiệm toàn bộ các thành viên trong gia đình này, chúng tôi phát hiện thêm một bệnh nhân nữa cũng mang đột biến tương tự.

Đột biến (c.1741G>T (p.Val581Phe)) nằm ở vùng DBD của protein AR. Vùng DBD có độ dài từ acid amin 556 đến 623, được mã hóa bởi exon 2 và exon 3 của gene AR. Trong những năm qua, nhiều nghiên



Trong thụ thể glucocorticoid, vị trí Gly458, Ser459 và Val462 (được bảo tồn trong thụ thể androgen ở các vị trí tương ứng lần lượt là 577, 578 và 581) là một phần của chuỗi xoắn nằm ở rãnh chính DNA và nằm gần nhau ở giữa các cặp AT của phần nửa đầu ở vùng đáp ứng glucocorticoid. Tác giả Zilliacus và cộng sự [8] đã sử dụng phương pháp gây đột biến trực tiếp để xác nhận tầm quan trọng của vùng này đối với sự gắn kết của thụ thể glucocorticoid với yếu tố đáp ứng glucocorticoid. Trong những điều kiện này, vị trí cấu trúc ngón tay kẽm thứ nhất có vai trò quan trọng để gắn kết thụ thể androgen với các yếu tố đáp ứng, vì vậy sự biến đổi của vị trí này đã được chứng minh là nguyên nhân gây nên hội chứng không nhạy cảm androgen hoàn toàn. Đột biến c.1741G>T (p.Val581Phe) được phát hiện lần đầu tiên ở ba bệnh nhân người Pháp mắc hội chứng không nhạy cảm androgen. Ba bệnh nhân này đều có kiểu hình nữ hóa hoàn toàn [7].

Nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện trường hợp đầu tiên tại Việt Nam chẩn đoán mắc hội chứng không nhạy cảm androgen do đột biến p.V581F gây nên. Đột biến này được di truyền trong ít nhất 3 thế hệ của gia đình. Theo phả hệ, bà ngoại (I:2) là người dị hợp tử đột biến p.Val581Phe, sinh 4 người con, trong đó cả 3 người con gái (II:1; II:4; II:6) đều là người dị hợp tử với đột biến p.Val581Phe. Thế hệ thứ 3 của gia đình có 1 người nữ (III:3) là người dị hợp tử với đột biến p.Val581Phe, và có 2 thành viên (III:2) và (III:6) phát hiện là trẻ trai, có đột biến p.Val581Phe. Tuy nhiên, kiểu hình của hai thành viên này lại khác nhau. Bệnh nhân số III:2 có kiểu hình nữ hoàn toàn, được chẩn

đoán mắc hội chứng không nhạy cảm androgen hoàn toàn và bệnh nhân III:6 có kiểu hình nam, với chẩn đoán ban đầu là tình hoàn lạc chỗ, được chẩn đoán mắc hội chứng không nhạy cảm androgen một phần. Sự khác biệt về kiểu hình này hiện nay vẫn chưa được nghiên cứu rộng rãi do kiểu đột biến trên gene AR rất đa dạng. Với sự phát triển của khoa học, y học, các cơ chế bệnh sinh của AIS dần được sáng tỏ. Các nhà nghiên cứu chỉ ra rằng, các kiểu hình khác nhau ở bệnh nhân là do mức độ ảnh hưởng của đột biến trên gene mã hóa thụ thể Androgen Receptor (AR). Tuy nhiên, sự biểu hiện kiểu hình của từng đột biến cũng có sự khác biệt ở từng bệnh nhân. Điều này vẫn đang còn là những vấn đề cần được nghiên cứu sâu hơn.

## V. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp giải trình tự gen, 1 đột biến c.1741G>T (p.Val581Phe) trên exon 2 gene AR đã được phát hiện ở bệnh nhân không nhạy cảm androgen. Đây chính là nguyên nhân gây biểu hiện rối loạn phát triển giới tính ở người bệnh. Kết quả này đã góp phần bổ sung phổ đột biến trên gene AR ở người mắc bệnh không nhạy cảm androgen tại Việt Nam. Đặc biệt, đây là cơ sở cho tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh sau này.

## LỜI CẢM ƠN

Công trình nghiên cứu này được thực hiện bằng sự hỗ trợ kinh phí của tài trợ “Nghiên cứu biến đổi di truyền ở một số bệnh nhân Việt Nam mắc hội chứng không nhạy cảm androgen bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới”, mã số GUST.STS.ĐT2020-SH01, TS. Nguyễn Thu Hiền làm chủ nhiệm,

thuộc Chương trình sau tiến sỹ đào tạo nguồn lực khoa học công nghệ cho Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Aiman J, Griffin JE, Gazak JM et al (1979)** Androgen Insensitivity as a Cause of Infertility in Otherwise Normal Men. *N Engl J Med* 300:223–227. <https://doi.org/10.1056/NEJM197902013000503>.
2. **Gulía C, Baldassarra S, Zangari A et al (2018)** Androgen insensitivity syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22:3873–3887. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201806\\_15272](https://doi.org/10.26355/eurrev_201806_15272).
3. **Hughes IA, Davies JD, Bunch TI et al (2012)** Androgen insensitivity syndrome. *Lancet*.
4. **Lubs HA, Vilar O, Bergenstal DM (1959)** Familial male pseudohermaphroditism with labial testes and partial feminization: endocrine studies and genetic aspects. *J Clin Endocrinol Metab* 19:1110–1120. <https://doi.org/10.1210/jcem-19-9-1110>.
5. **Lumbroso S, Lobaccaro JM, Belon C et al (1993)** A new mutation within the deoxyribonucleic acid-binding domain of the androgen receptor gene in a family with complete androgen insensitivity syndrome. *Fertil Steril* 60:814–819. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)56281-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)56281-5).
6. **Vu Chi Dung, Maki Fukami, Can Thi Bich Ngoc, Bui Phuong Thao et al (2013)** Genotype and phenotype of Vietnamese patients with androgen insensitivity syndrome. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, p 194
7. **New MI (1970)** Male pseudohermaphroditism due to 17 alpha-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 49:1930–1941. <https://doi.org/10.1172/JCI106412>.
8. **Zilliacus J, Dahlman-Wright K, Wright A et al (1991)** DNA binding specificity of mutant glucocorticoid receptor DNA-binding domains. *J Biol Chem* 266:3101–3106.

## GIÁ TRỊ CỦA MCV VÀ MCH TRONG SÀNG LỌC ĐỘT BIẾN GEN THALASSEMIA

Hoàng Thị Ngọc Lan<sup>1,2</sup>, Phạm Tuấn Dương<sup>2</sup>,  
Nguyễn Văn Anh<sup>1</sup>, Vũ Hương Ly<sup>1</sup>, Bùi Đức Thắng<sup>1</sup>,  
Trần Danh Cường<sup>1,2</sup>, Lê Phương Thảo<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** 1. Xác định tỷ lệ các dạng đột biến thường gặp ở các cặp vợ chồng mang gen bệnh thalassemia. 2. Xác định giá trị MCV và MCH ở những cặp vợ và/hoặc chồng mang gen bệnh thalassemia. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 100 cặp vợ chồng (200 mẫu) có kết quả MCV, MCH của hồng cầu có nguy cơ mang gen bệnh thalassemia được làm xét nghiệm phân tử để phát hiện đột biến gen HBA và/hoặc HBB. Nghiên cứu mô tả cắt ngang hồi cứu. sử dụng kỹ thuật lai phân tử ngược để xác định đột biến gen. Xử lý và phân tích số liệu bằng phần mềm STATA 13.0 và các thuật toán Test  $\chi^2$ , Ttest, Ranksum test. **Kết quả:** 175/200 có đột biến gen bệnh tan máu. 197 đột biến đã được phát hiện trong 175 mẫu. Trong đó đột biến gen  $\alpha$ -thalassemia là 78,18% ( $--^{SEA}$  chiếm 73,1%,  $-\alpha^{3,7}$ : 2,54%, HbCs: 1,53%,  $\alpha^{4,2}$ : 1,02%);  $\beta$ -thalassemia là 10,66% (CD41/42 là 5,58%, CD17: 4,06%, IVSI-1M: 0,51%, CD71/72: 0,51%); HbE là 11,16%. MCV và MCH ở người mang đột biến thalassemia thấp hơn giá trị bình thường: MCV là  $67,56 \pm 5,16$  fl và MCH là  $21,56 \pm 1,85$  pg. MCV và MCH ở người mang đột biến  $\alpha$ -thalassemia: MCV  $67,7 \pm 4,51$  fl và MCH  $21,49 \pm 1,56$  pg. MCV và MCH ở người mang đột biến  $\beta$ -thalassemia: MCV  $63,31 \pm 3,29$  fl và MCH là

$20,01 \pm 0,56$  pg. MCV và MCH của những mẫu chỉ mang một đột biến  $\beta$ -thalassemia thấp hơn so với những mẫu chỉ mang một đột biến  $\alpha$ -thalassemia. **Kết luận:** Đột biến  $\alpha$ -thalassemia thường gặp hơn  $\beta$ -thalassemia. Đột biến  $--^{SEA}$  là đột biến thường gặp nhất trong bệnh  $\alpha$ -thalassemia. Đột biến CD41/42 là đột biến thường gặp nhất trong  $\beta$ -thalassemia. Ở ngưỡng MCV  $< 80$  fl và MCH  $< 28$  pg thì có 98,85% mẫu đột biến được phát hiện.

**Từ khóa:** MCV, MCH, thalassemia.

### SUMMARY

#### THE VALUE OF MCH, MCV IN THE SCREENING OF THALASSEMIA CARRIERS

**Objectives:** 1. Describe types of mutation in couples with thalassemia gene mutations. 2. Assessing of MCV and MCH values in the screening of thalassemia carriers. **Methods:** from Jan/2017 to Nov/2018, total of 200 subjects were thalassemia screened MCV, MCH and tested thalassemia mutations in Center for Prenatal Diagnosis of National Hospital of Obstetrics and Gynecology. Thalassemia mutations were tested by Reverse-hybridization Strip Assay and HybriBio thalassemia gene diagnostic kit. **Results:** Among total 200 samples 175 samples were detected gene mutations. 197 gene mutations in 175 samples were detected, including  $\alpha$ -thalassemia: 78,18% ( $--^{SEA}$  73,1%,  $-\alpha^{3,7}$ : 2,54%, HbCs: 1,53%,  $\alpha^{4,2}$ : 1,02%);  $\beta$ -thalassemia: 10,66% (CD41/42: 5,58%, CD17: 4,06%, IVSI-1M: 0,51%, CD71/72: 0,51%); HbE: 11,16%. The value of MCV, MCH for

<sup>1</sup>Bệnh viện Phụ sản Trung Ương

<sup>2</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Hoàng Thị Ngọc Lan  
Email: hoangthingoclan@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 4.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 25.9.2020

Ngày duyệt bài: 19.11.2020

screening  $\alpha$  - thalassemia: MCV  $67,7 \pm 4,51$ fl, MCH  $21,49 \pm 1,56$ pg. The value of MCV, MCH for screening  $\beta$  - thalassemia MCV  $63,31 \pm 3,29$  fl, MCH  $20,01 \pm 0,56$ pg. MCV and MCH of samples only one  $\beta$ -thalassemia mutation were lower than those with only one  $\alpha$ -thalassemia mutation. **Conclusions:**  $\alpha$  -thalassemia mutations are more common than  $\beta$ -thalassemia. --<sup>SEA</sup> mutation is the most common mutation in  $\alpha$ -thalassemia. CD41/42 mutation is the most common mutation in  $\beta$ -thalassemia. At MCV < 80fl and MCH < 28pg there are 98,85% mutations detected.

**Key words:** MCV, MCH, thalassemia.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thalassemia là bệnh tan máu bẩm sinh thường gặp nhất, do đột biến gen quy định sản xuất chuỗi globin trong cấu tạo hemoglobin của hồng cầu. Bệnh có hai thể thường gặp là  $\alpha$ -thalassemia và  $\beta$ -thalassemia với tỷ lệ khác nhau phụ thuộc vào vùng địa lý. Theo thống kê của Viện Huyết học truyền máu Trung ương năm 2017 thì tỷ lệ người Việt nam mang gen bệnh thalassemia là 13,8%. Hiện nay đã có nhiều xét nghiệm cận lâm sàng được áp dụng trong sàng lọc và chẩn đoán bệnh thalassemia, gồm xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu ngoại vi (như số lượng hồng cầu, thể tích trung bình hồng cầu (Mean corpuscular volume – MCV), lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu (Mean corpuscular hemoglobin - MCH), điện di huyết sắc tố, đặc biệt là xét nghiệm phân tử tìm đột biến gen thalassemia. Bệnh tan máu thalassemia gây giảm chất lượng sống, hiện tại chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu. Vì vậy việc hạn chế sự ra đời của trẻ bị bệnh tan máu thalassemia là cần thiết. Để tăng hiệu quả chẩn đoán bệnh thalassemia cho thai thì trước tiên cần xác định bố mẹ là người mang

gen bệnh. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài này với 2 mục tiêu sau: 1. Tỷ lệ các dạng đột biến thường gặp ở các cặp vợ chồng mang gen bệnh thalassemia. 2. Xác định giá trị MCV và MCH ở những cặp vợ và/hoặc chồng mang gen bệnh thalassemia

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- 100 cặp vợ chồng (200 mẫu nghiên cứu) có kết quả MCV, MCH từ tế bào máu ngoại vi, có nguy cơ cao mang gen bệnh thalassemia được xét nghiệm phân tử để phát hiện đột biến gen HBA và/hoặc HBB tại Trung tâm Chẩn đoán trước sinh, bệnh viện Phụ sản Trung ương từ tháng 1/2017-11/2018. Nghiên cứu mô tả cắt ngang hồi cứu.

Các kỹ thuật được sử dụng để xác định đột biến gen gây bệnh thalassemia:

+ Kỹ thuật lai phân tử ngược trên StripAssay: sử dụng kit  $\alpha$  – Globin StripAssay hoặc  $\beta$  – Globin StripAssay phát hiện 21 đột biến trên gen  $\alpha$  và 22 đột biến trên gen  $\beta$ .

+ Lai phân tử ngược: sử dụng màng lai Hybriio bằng bộ kit Thalassemia Gene Diagnostic Kit (Code: HBGA-THAL a5-b16) xuất xứ Hồng Kông và có chứng chỉ CE/IVD phát hiện 5 đột biến trên gen HbA và 16 đột biến trên gen HbB. Xử lý và phân tích số liệu bằng phần mềm STATA 13.0 và các thuật toán Test  $\chi^2$ , Ttest, Ranksum test, Prtest.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Các dạng đột biến gen HBA, HBB

Trong 200 mẫu nghiên cứu, 175 mẫu phát hiện có đột biến thalassemia. Trong đó 131 mẫu chỉ phát hiện một đột biến  $\alpha$ -thalassemia (chiếm 65,5%); 14 mẫu chỉ phát hiện một đột biến  $\beta$ -thalassemia; 9 mẫu chỉ

mang đột biến HbE và 20 mẫu có sự kết biến giữa 2 đột biến khác nhau và 1 mẫu có sự kết hợp 3 đột biến khác nhau. Có 25 mẫu không phát hiện đột biến bệnh thalassemia (chỉ chiếm 12,5%).

**Bảng 3.1. Tỷ lệ các dạng đột biến trên gen HBA, HBB**

| Các thể đột biến      |                 | n                    |     | %     |       |
|-----------------------|-----------------|----------------------|-----|-------|-------|
| $\alpha$ -thalassemia | --SEA           | 144                  | 154 | 73,10 | 78,18 |
|                       | $-\alpha^{3.7}$ | 5                    |     | 2,54  |       |
|                       | $-\alpha^{4.2}$ | 2                    |     | 1,02  |       |
|                       | HbCs            | 3                    |     | 1,52  |       |
| $\beta$ -thalassemia  | CD41/42         | 11                   | 21  | 5,58  | 10,66 |
|                       | CD17            | 8                    |     | 4,06  |       |
|                       | IVSI-1M         | 1                    |     | 0,51  |       |
|                       | CD71/72         | 1                    |     | 0,51  |       |
| HbE                   | CD26            | 22                   |     | 11,16 |       |
| Tổng đột biến         |                 | 197 đột biến/175 mẫu |     | 100   |       |

### 3.2. Giá trị MCV và MCH ở đối tượng nghiên cứu

**Bảng 3.2. Giá trị MCV và MCH trong bệnh thalassemia**

| Giá trị             | Chẩn đoán gen thalassemia |                                 | p       |
|---------------------|---------------------------|---------------------------------|---------|
|                     | Mang gen                  | Không mang gen bệnh thalassemia |         |
| MCV(Mean $\pm$ SD)  | 67,56 $\pm$ 5,16          | 85,24 $\pm$ 5,34                | 0,000*  |
| MCH (Mean $\pm$ SD) | 21,56 $\pm$ 1,85          | 28,47 $\pm$ 2,61                | 0,000** |

\* Tính theo ttest      \*\* Tính theo ranksum test.

#### 3.2.1. Giá trị MCV và MCH ở các dạng đột biến gen HBA, HBB

##### 3.2.1.1. Giá trị MCV và MCH ở các dạng đột biến $\alpha$ -thalassemia (131 mẫu)

**Bảng 3.3. Giá trị MCV ở các dạng đột biến  $\alpha$ -thalassemia**

| MCV           |          | --SEA            |       | $-\alpha^{3.7}$  |      | HbCs             |      | Tổng            |       |
|---------------|----------|------------------|-------|------------------|------|------------------|------|-----------------|-------|
|               |          | n                | %     | n                | %    | n                | %    | n               | %     |
| Cao           | > 95     | 0                | 0     | 0                | 0    | 0                | 0    | 0               | 0     |
| Trung bình    | 85-95    | 0                | 0     | 1                | 0,76 | 0                | 0    | 1               | 0,76  |
| Thấp          | 80 - <85 | 0                | 0     | 0                | 0    | 0                | 0    | 0               | 0     |
|               | 75 - <80 | 4                | 3,05  | 2                | 1,53 | 2                | 1,53 | 8               | 6,11  |
|               | 70 - <75 | 21               | 16,03 | 0                | 0    | 0                | 0    | 21              | 16,03 |
|               | 65 - <70 | 65               | 49,62 | 0                | 0    | 0                | 0    | 65              | 49,62 |
|               | 60 - <65 | 33               | 25,19 | 0                | 0    | 0                | 0    | 33              | 25,19 |
|               | <60      | 3                | 2,29  | 0                | 0    | 0                | 0    | 3               | 2,29  |
| Tổng số       |          | 126              | 96,18 | 3                | 2,29 | 2                | 1,53 | 131             | 100   |
| Mean $\pm$ SD |          | 67,22 $\pm$ 3,83 |       | 80,93 $\pm$ 4,96 |      | 77,85 $\pm$ 2,05 |      | 67,7 $\pm$ 4,51 |       |

**Bảng 3.4. Giá trị MCH ở các dạng đột biến  $\alpha$ -thalassemia**

| MCH (pg)       |          | --SEA                              |              | $-\alpha^{3.7}$ |             | HbCs            |             | Tổng                               |            |
|----------------|----------|------------------------------------|--------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|------------------------------------|------------|
|                |          | n                                  | %            | n               | %           | n               | %           | n                                  | %          |
| Cao            | >32      | 0                                  | 0            | 0               | 0           | 0               | 0           | 0                                  | 0          |
| Trung bình     | 28 - <32 | 0                                  | 0            | 0               | 0           | 1               | 0,76        | 1                                  | 0,76       |
| Thấp           | 26 - <28 | 0                                  | 0            | 2               | 1,53        | 1               | 0,76        | 3                                  | 2,29       |
|                | 24 - <26 | 2                                  | 1,53         | 0               | 0           | 0               | 0           | 2                                  | 1,53       |
|                | 22 - <24 | 28                                 | 21,37        | 1               | 0,76        | 0               | 0           | 29                                 | 22,14      |
|                | 20 - <22 | 80                                 | 61,07        | 0               | 0           | 0               | 0           | 80                                 | 61,07      |
|                | <20      | 16                                 | 12,21        | 0               | 0           | 0               | 0           | 16                                 | 12,21      |
| <b>Tổng số</b> |          | <b>126</b>                         | <b>96,18</b> | <b>3</b>        | <b>2,29</b> | <b>2</b>        | <b>1,53</b> | <b>131</b>                         | <b>100</b> |
| Mean $\pm$ SD  |          | <b>21,29 <math>\pm</math> 1,19</b> |              | 25,9 $\pm$ 2,03 |             | 27,6 $\pm$ 0,99 |             | <b>21,49 <math>\pm</math> 1,56</b> |            |

**3.2.1.2. Giá trị MCV và MCH ở các dạng đột biến  $\beta$ -thalassemia (14 mẫu) và HbE (9 mẫu)**

**Bảng 3.5. Giá trị MCV ở các mẫu có đột biến  $\beta$ -thalassemia, HbE**

| MCV            |          | CD41/42          |              | CD17             |              | IVSI-1M  |             | CD26             |              | Tổng            |            |
|----------------|----------|------------------|--------------|------------------|--------------|----------|-------------|------------------|--------------|-----------------|------------|
|                |          | n                | %            | n                | %            | n        | %           | n                | %            | n               | %          |
| Cao            | > 95     | 0                | 0            | 0                | 0            | 0        | 0           | 0                | 0            | 0               | 0          |
| T.bình         | 85-95    | 0                | 0            | 0                | 0            | 0        | 0           | 0                | 0            | 0               | 0          |
| Thấp           | 80 - <85 | 0                | 0            | 0                | 0            | 0        | 0           | 0                | 0            | 0               | 0          |
|                | 75 - <80 | 0                | 0            | 0                | 0            | 0        | 0           | 5                | 21,74        | 5               | 21,74      |
|                | 70 - <75 | 0                | 0            | 0                | 0            | 0        | 0           | 3                | 13,04        | 3               | 13,04      |
|                | 65 - <70 | 3                | 13,04        | 1                | 4,35         | 1        | 4,35        | 0                | 0            | 5               | 21,74      |
|                | 60 - <65 | 4                | 17,39        | 4                | 17,39        | 0        | 0           | 1                | 4,35         | 9               | 39,13      |
|                | <60      | 0                | 0            | 1                | 4,35         | 0        | 0           | 0                | 0            | 1               | 4,35       |
| <b>Tổng số</b> |          | <b>7</b>         | <b>30,43</b> | <b>6</b>         | <b>26,09</b> | <b>1</b> | <b>4,35</b> | <b>9</b>         | <b>39,13</b> | <b>23</b>       | <b>100</b> |
| Mean $\pm$ SD  |          | 64,41 $\pm$ 2,78 |              | 61,72 $\pm$ 3,68 |              | 65,2     |             | 74,78 $\pm$ 5,08 |              | 67,8 $\pm$ 6,97 |            |

**Bảng 3.6. Giá trị MCH ở các mẫu có đột biến  $\beta$ -thalassemia, HbE**

| MCH            |          | CD41/42          |              | CD17             |              | IVSI-1M  |             | CD26             |              | Tổng             |            |
|----------------|----------|------------------|--------------|------------------|--------------|----------|-------------|------------------|--------------|------------------|------------|
|                |          | n                | %            | n                | %            | n        | %           | n                | %            | n                | %          |
| Cao            | >32      | 0                | 0            | 0                | 0            | 0        | 0           | 0                | 0            | 0                | 0          |
| T bình         | 28 - <32 | 0                | 0            | 0                | 0            | 0        | 0           | 0                | 0            | 0                | 0          |
| Thấp           | 26 - <28 | 0                | 0            | 0                | 0            | 0        | 0           | 2                | 8,70         | 2                | 8,70       |
|                | 24 - <26 | 0                | 0            | 0                | 0            | 0        | 0           | 7                | 30,43        | 7                | 30,43      |
|                | 22 - <24 | 0                | 0            | 0                | 0            | 0        | 0           | 0                | 0            | 0                | 0          |
|                | 20 - <22 | 5                | 21,74        | 3                | 13,04        | 1        | 4,35        | 0                | 0            | 9                | 39,13      |
|                | <20      | 2                | 8,70         | 3                | 13,04        | 0        | 0           | 0                | 0            | 5                | 21,74      |
| <b>Tổng số</b> |          | <b>7</b>         | <b>30,43</b> | <b>6</b>         | <b>26,09</b> | <b>1</b> | <b>4,35</b> | <b>9</b>         | <b>39,13</b> | <b>23</b>        | <b>100</b> |
| Mean $\pm$ SD  |          | 20,09 $\pm$ 0,39 |              | 19,87 $\pm$ 0,74 |              | 20,4     |             | 25,33 $\pm$ 0,67 |              | 22,09 $\pm$ 2,71 |            |

### 3.2.1.3. Giá trị MCV, MCH ở các mẫu có kết hợp các đột biến trên gen HBA, HBB (21 mẫu)

**Bảng 3.7. Giá trị MCV ở các mẫu có kết hợp các đột biến trên gen HBA, HBB**

| MCV                              |   | > 95 | 85-95 | 80-<85 | 75-<80 | 70-<75 | 65-<70 | 60-<65 | <60   | Tổng số | Trung bình (Mean ± SD) |
|----------------------------------|---|------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|---------|------------------------|
| Các dạng đột biến                | n | 0    | 0     | 0      | 1      | 0      | 0      | 0      | 0     | 1       | 77,2                   |
|                                  | % | 0    | 0     | 0      | 4,76   | 0      | 0      | 0      | 0     | 4,76    |                        |
| --SEA + CD41/42                  | n | 0    | 0     | 0      | 0      | 2      | 1      | 0      | 1     | 4       | 67,58 ± 6,5            |
|                                  | % | 0    | 0     | 0      | 0      | 9,52   | 4,76   | 0      | 4,76  | 19,05   |                        |
| --SEA + CD17                     | n | 0    | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      | 1      | 1     | 2       | 61,3 ± 4,1             |
|                                  | % | 0    | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      | 4,76   | 4,76  | 9,52    |                        |
| --SEA + CD26                     | n | 0    | 0     | 0      | 0      | 1      | 5      | 4      | 0     | 10      | 65,26 ± 3,58           |
|                                  | % | 0    | 0     | 0      | 0      | 4,76   | 23,81  | 19,05  | 0     | 47,62   |                        |
| -α <sup>3.7</sup> + CD26         | n | 0    | 0     | 0      | 2      | 0      | 0      | 0      | 0     | 2       | 77,5 ± 0,42            |
|                                  | % | 0    | 0     | 0      | 9,52   | 0      | 0      | 0      | 0     | 9,52    |                        |
| -α <sup>4.2</sup> + CD71/72      | n | 0    | 0     | 0      | 0      | 0      | 1      | 0      | 0     | 1       | 65,9                   |
|                                  | % | 0    | 0     | 0      | 0      | 0      | 4,76   | 0      | 0     | 4,76    |                        |
| --SEA + -α <sup>4.2</sup> + CD26 | n | 0    | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 1     | 1       | 52,1                   |
|                                  | % | 0    | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 4,76  | 4,76    |                        |
| Tổng số                          | n | 0    | 0     | 0      | 3      | 3      | 7      | 5      | 3     | 21      | 64,46 ± 6,7            |
|                                  | % | 0    | 0     | 0      | 14,29  | 14,29  | 33,33  | 23,81  | 14,29 | 100     |                        |

**Bảng 3.8. Giá trị MCH ở các mẫu có kết hợp các đột biến trên gen HBA, HBB**

| MCH             |   | >32 | 28-<32 | 26-<28 | 24-<26 | 22-<24 | 20-<22 | <20  | Tổng số | Trung bình (Mean ± SD) |
|-----------------|---|-----|--------|--------|--------|--------|--------|------|---------|------------------------|
| --SEA + HbCs    | n | 0   | 0      | 0      | 0      | 0      | 1      | 0    | 1       | 21,3                   |
|                 | % | 0   | 0      | 0      | 0      | 0      | 4,76   | 0    | 4,76    |                        |
| --SEA + CD41/42 | n | 0   | 0      | 0      | 1      | 2      | 0      | 1    | 4       | 22,1 ± 1,91            |
|                 | % | 0   | 0      | 0      | 4,76   | 9,52   | 0      | 4,76 | 19,05   |                        |
| --SEA +         | n | 0   | 0      | 0      | 0      | 0      | 1      | 1    | 2       | 19,95 ± 1,77           |

**CHUYÊN ĐỀ SÀNG LỌC VÀ CHẨN ĐOÁN BỆNH DI TRUYỀN**

|                                    |   |   |   |      |      |           |           |           |           |              |
|------------------------------------|---|---|---|------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| CD17                               | % | 0 | 0 | 0    | 0    | 0         | 4,76      | 4,7<br>6  | 9,5<br>2  |              |
| --SEA +<br>CD26                    | n | 0 | 0 | 0    | 0    | 1         | 6         | 3         | 10        | 20,74 ± 1,01 |
|                                    | % | 0 | 0 | 0    | 0    | 4,76      | 28,5<br>7 | 14,<br>29 | 47,<br>62 |              |
| -α <sup>3.7</sup> + CD26           | n | 0 | 0 | 1    | 1    | 0         | 0         | 0         | 2         | 26,3 ± 0,71  |
|                                    | % | 0 | 0 | 4,76 | 4,76 | 0         | 0         | 0         | 9,5<br>2  |              |
| -α <sup>4.2</sup> +<br>CD71/72     | n | 0 | 0 | 0    | 0    | 0         | 1         | 0         | 1         | 21,,8        |
|                                    | % | 0 | 0 | 0    | 0    | 0         | 4,76      | 0         | 4,7<br>6  |              |
| --SEA + -α <sup>4.2</sup><br>+CD26 | n | 0 | 0 | 0    | 0    | 0         | 0         | 1         | 1         | 17,2         |
|                                    | % | 0 | 0 | 0    | 0    | 0         | 0         | 4,7<br>6  | 4,7<br>6  |              |
| Tổng số                            | n | 0 | 0 | 1    | 2    | 3         | 9         | 6         | 21        | 21,36 ± 2,24 |
|                                    | % | 0 | 0 | 4,76 | 9,52 | 14,2<br>9 | 42,8<br>6 | 28,<br>57 | 100       |              |

### 3.2.2. Giá trị MCV và MCH ở 2 thể bệnh thalassemia

**Bảng 3.9. Giá trị MCV, MCH trong các thể bệnh thalassemia**

| Thể bệnh      | MCV (Mean ± SD) |           | MCH (Mean ± SD) |          |
|---------------|-----------------|-----------|-----------------|----------|
| α-thalassemia | 67,7 ± 4,51     | p= 0,004* | 21,49 ± 1,56    | p=0,000* |
| β-thalassemia | 63,31 ± 3,29    |           | 20,01 ± 0,56    |          |

\* Tính theo Ranksum test

**Nhận xét:** MCV và MCH trung bình của những mẫu chỉ mang một đột biến α-thalassemia có sự khác biệt (cao hơn) MCV và MCH trung bình của những mẫu chỉ mang một đột biến β-thalassemia, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p lần lượt là 0,004 và 0,000 (<0,05)

## IV. BÀN LUẬN

### Tỷ lệ phát hiện đột biến gen bệnh thalassemia

Trong 200 mẫu nghiên cứu, phát hiện 175 mẫu có đột biến chiếm tỉ lệ 87,5% và 25 mẫu không phát hiện đột biến (12,5%). Tỷ lệ này cao hơn nghiên cứu của Viện Huyết học truyền máu Trung ương xét nghiệm ở cộng đồng là 17,9% [1], và nghiên cứu của Jing He năm 2017 là 49,5% [2], vì đối tượng nghiên cứu có nguy cơ cao mang gen bệnh

thalassemia (có tiền sử phù thai, hoặc đã sinh con bị bệnh tan máu hoặc có vợ hoặc chồng có kết quả MCV, MCH thuộc nhóm nguy cơ cao mang gen bệnh thalassemia).

Bảng 3.1 cho thấy tỷ lệ đột biến α-thalassemia lớn hơn β-thalassemia trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như nghiên cứu của Trần Thị Thúy Minh [3], Xiaoli Long [4]. Tuy nhiên tỉ lệ mắc bệnh có sự khác biệt giữa các nghiên cứu:

**Bảng 4.1. Tỷ lệ đột biến  $\alpha$ -thalassemia và  $\beta$ -thalassemia**

|                        |         | $\alpha$ -thalassemia | $\beta$ -thalassemia |
|------------------------|---------|-----------------------|----------------------|
| Trần Thị Thúy Minh     | Ê đê    | 31,6%                 | 0,3%                 |
|                        | M' nông | 17,5%                 | 0,2%                 |
| Xiaoli Long và cộng sự |         | 6,6% (324/4920)       | 2,97% (146/4920)     |
| Chúng tôi              |         | 78,18%                | 10,66%               |

Các dạng đột biến  $\alpha$ -thalassemia. Bảng 3.1 cho thấy đột biến --<sup>SEA</sup> chiếm 73,1%, cao nhất trong tổng số dạng đột biến (144/197) và chiếm 96,18% (126/131) trong đột biến chỉ dạng  $\alpha$ -thalassemia. Ketong Lai (đột biến --<sup>SEA</sup> là đột biến thường gặp nhất, chiếm 2,54% dân số) [7]. Ngoài ra, có 3 đột biến khác được phát hiện là:  $-\alpha^{3.7}$  với 5 mẫu (2,54%); 3 mẫu đột biến HbCs (1,52%), 2 mẫu đột biến  $-\alpha^{4.2}$  (1,02%).

Các thể đột biến  $\beta$ -thalassemia. Bảng 3.1 cũng cho thấy đột biến CD41/42 phổ biến nhất trong đột biến  $\beta$ -thalassemia với 11/21 mẫu. Tương tự với kết quả nghiên cứu Ketong Lai (đột biến CD41/42 cao nhất trong đột biến  $\beta$ -thalassemia) [8] nhưng khác với nghiên cứu của của Vũ Hải Toàn, đột biến thường gặp nhất trong  $\beta$ -thalassemia là đột biến CD17) [1]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, đột biến CD17 chỉ đứng thứ 2 sau đột biến CD41/42, với 8/21 mẫu. Ngoài ra, phát hiện 1 mẫu đột biến IVSI-1M và 1 mẫu CD71/72.

Giá trị MCV và MCH của đối tượng nghiên cứu. Bảng 3.2 cho thấy MCV và MCH những mẫu có đột biến thalassemia thấp hơn so với những mẫu không mang đột biến thalassemia. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,000$ .

Giá trị MCV và MCH ở bệnh  $\alpha$ -thalassemia. Bảng 3.3 và bảng 3.4 cho thấy ở các mẫu có đột biến  $\alpha$ -thalassemia, thì giá trị MCV và MCH trung bình thấp tương ứng là

$67,7 \pm 4,51\text{fl}$  và  $21,49 \pm 1,56\text{pg}$ . Kết quả của chúng tôi thấp hơn kết quả nghiên cứu của Lương Trung Hiếu [5] ( $74 \pm 5,13\text{fl}$ ;  $21,9 \pm 2,42\text{pg}$ ) và Xiaoli Long [4] ( $69,13 \pm 6,39\text{fl}$ ;  $22,37 \pm 2,31\text{pg}$ ).

Trong 126 mẫu chỉ phát hiện đột biến --<sup>SEA</sup>, thì MCV trung bình là  $67,22 \pm 3,83\text{fl}$ . MCH trung bình là  $21,29 \pm 1,19\text{pg}$ . Kết quả của chúng tôi khá tương đồng với kết quả của Velasco [8] ( $67,06 \pm 4,56\text{fl}$ ;  $20,95 \pm 1,34\text{pg}$ ). Nghiên cứu của Đào Phan Thu Hường (phần lớn các mẫu có đột biến --<sup>SEA</sup> có MCV thấp hơn 70fl và tất cả các mẫu có MCH thấp hơn 23pg [6].

Trong nghiên cứu của chúng tôi có 1 mẫu đột biến  $-\alpha^{3.7}$  có MCV là 86,6fl và MCH 27,9 pg. Kết quả này có giá trị trong tư vấn trước sinh sàng lọc bệnh thalassemia, khi vợ hoặc chồng đã mang gen bệnh  $\alpha$ -thalassemia (dạng đột biến 2 gen như --<sup>SEA</sup> thì người còn lại dù có kết quả MCV và MCH bình thường cũng nên làm xét nghiệm phân tử để xác định tình trạng mang gen bệnh  $\alpha$ -thalassemia (như đột biến  $-\alpha^{3.7}$ ). Từ đó tư vấn sàng lọc trước sinh để hạn chế sự kết hợp các đột biến của cả bố và mẹ gây bệnh nặng cho con.

Giá trị MCV và MCH ở bệnh nhân có đột biến gen bệnh  $\beta$ -thalassemia, HbE

- Bảng 3.5 và 3.6 cho thấy phát hiện được 23 mẫu có một đột biến  $\beta$ -thalassemia hoặc HbE. Trong đó, tất cả các mẫu đều có MCV và MCH nhỏ hơn giá trị bình thường. Trung bình MCV là  $67,8 \pm 6,97\text{fl}$ . MCH

trung bình là  $22,09 \pm 2,71$ pg. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn kết quả nghiên cứu của Lương Trung Hiếu với MCV và MCH tương ứng là  $75 \pm 5,77$ fl và  $22,3 \pm 1,35$ pg [5].

- 9 mẫu chỉ phát hiện đột biến CD26 (HbE) có MCV trung bình là:  $74,78 \pm 5,08$ fl. MCH trung bình là:  $25,33 \pm 0,67$ p. Tương đồng với nghiên cứu của Jie Zhang và cộng sự với MCV là  $76,99 \pm 4,52$ fl và MCH là  $26,06 \pm 1,55$ pg [9].

- 7 mẫu chỉ phát hiện đột biến CD41/42 đều có MCV từ 60-70fl, MCH dưới 22pg. MCV và MCH trung bình lần lượt là  $64,41 \pm 2,78$ fl và  $20,09 \pm 0,39$ pg, tương đồng với nghiên cứu của Jie Zhang và cộng sự (2016) với MCV và MCH tương ứng là:  $65,84 \pm 5,29$ fl và  $21,68 \pm 2,56$ pg [9].

- 6 mẫu chỉ phát hiện đột biến CD17 đều có MCV thấp hơn 70fl và MCH thấp hơn 22pg. MCV và MCH trung bình lần lượt là  $61,72 \pm 3,68$ fl và  $19,87 \pm 0,74$ pg. MCV thường gặp nhất từ 60 - <65fl với 4 mẫu; MCH từ 20 - <22fl và <20fl đều có 3 mẫu. Còn kết quả của Jie Zhang và cộng sự thì MCV:  $64,78 \pm 6,96$ fl và MCH là  $21,52 \pm 2,67$ [9].

- 1 mẫu chỉ phát hiện đột biến IVSI-1M với MCV là 65,2fl và MCH là 20,4pg.

Giá trị MCV và MCH ở các mẫu có kết hợp các đột biến gen HBA, HBB

Bảng 3.7 và 3.8 cho thấy có 21 mẫu có sự kết hợp các đột biến: 20 mẫu có 2 đột biến và 1 mẫu có 3 đột biến. MCV và MCH trung bình của 21 đột biến là  $64,46 \pm 6,7$ fl và  $21,36 \pm 2,24$ pg.

- 10 mẫu có sự kết hợp của 2 đột biến là --<sup>SEA</sup> và CD26. MCV trung bình là  $65,26 \pm 3,58$ fl. MCH trung bình:  $20,74 \pm 1,01$ pg. Kết quả MCV và MCH trung bình thấp hơn một chút so với MCV và MCH của đột biến --<sup>SEA</sup>

riêng lẻ (MCV là  $67,22 \pm 3,83$ fl và MCH là  $21,29 \pm 1,19$ pg), nhưng thấp hơn rõ rệt so với mẫu chỉ có đột biến CD26 (MCV là  $74,78 \pm 5,08$ fl và MCH là  $25,33 \pm 0,67$ pg).

- 4 mẫu có kết hợp 2 đột biến --<sup>SEA</sup> và CD41/42. MCV và MCH các mẫu thay đổi nhiều: 2 mẫu có giá trị MCV từ 70 - <75fl và MCH từ 22 - <24 pg (chiếm 9,52%), 1 mẫu có giá trị MCV từ 65 - <70fl và MCH từ 24 - <26 pg (chiếm 4,76%); 1 mẫu có MCV <60fl và MCH <20 pg (chiếm 4,76%). MCV trung bình của 4 mẫu:  $67,58 \pm 6,5$ fl. MCH trung bình là  $22,1 \pm 1,91$ pg, khá tương đồng với MCV và MCH của đột biến --<sup>SEA</sup> (MCV:  $67,22 \pm 3,83$ fl và MCH:  $21,29 \pm 1,19$ pg) và cao hơn khá nhiều so với MCV và MCH trung bình của đột biến CD41/42 (MCV trung bình:  $64,41 \pm 2,78$ fl và MCH trung bình:  $20,09 \pm 0,39$ pg).

Ngoài ra, có sự kết hợp giữa các thể đột biến khác nhưng với tỷ lệ không cao: --<sup>SEA</sup> và CD17 (2 mẫu), --<sup>SEA</sup> và CD26 (2 mẫu), --<sup>SEA</sup> và HbCs, --<sup>SEA</sup> và CD71/72 (1 mẫu). Đặc biệt, có một mẫu có sự kết hợp của 3 đột biến: --<sup>SEA</sup> và --<sup>SEA</sup> và CD26, MCV là 52,1fl và MCH là 17,2pg, đều là những giá trị thấp nhất trong 200 mẫu nghiên cứu.

Sự khác biệt MCV và MCH này cho thấy, tùy thuộc vào sự kết hợp giữa những thể đột biến mà người bệnh có thể có biểu hiện bệnh ở mức độ khác nhau và cũng thay đổi so với trường hợp chỉ mang một đột biến thành phần. Tuy nhiên, không phải bất kì sự kết hợp nào cũng làm nặng mức độ biểu hiện bệnh cho bệnh nhân (ví dụ: trong thể kết hợp của --<sup>SEA</sup> và CD41/42 có MCV và MCH cao hơn khá nhiều so với MCV và MCH của mẫu chỉ phát hiện đột biến CD41/42).

Sự khác biệt giá trị MCV và MCH ở đột biến  $\alpha$ -thalassemia và  $\beta$ -thalassemia

- Bảng 3.9 cho thấy những mẫu chỉ

mang một đột biến  $\alpha$ -thalassemia hoặc chỉ mang một đột biến  $\beta$ -thalassemia có sự khác biệt về trung bình MCV và MCH ( $\alpha$ -thalassemia có MCV và MCH cao hơn  $\beta$ -thalassemia), sự khác biệt có giá trị thống kê. Điều này cũng có thể cho chúng ta hướng tới thể bệnh thalassemia gì khi dựa vào kết quả giá trị MCV, MCH của hồng cầu.

## V. KẾT LUẬN

### 5.1. Các dạng đột biến gen thalassemia

- Đột biến  $\alpha$ -thalassemia là 78,18% (154/197);  $\beta$ -thalassemia là 10,66% (21/197); CD 26 là 11,16% (22/197)

- Đột biến --<sup>SEA</sup> là đột biến phổ biến nhất trong bệnh  $\alpha$  thalassemia chiếm 96,18% (126/131). Ngoài ra,  $\alpha$ -thalassemia còn gặp một số đột biến khác như  $-\alpha^{3,7}$ , HbCs và  $-\alpha^{4,2}$ .

- Đột biến CD41/42 là đột biến thường gặp nhất trong  $\beta$ -thalassemia chiếm 52,38% (11/21). Ngoài ra, phát hiện đột biến CD17; IVSI-1M và CD71/72.

**5.2. Giá trị MCV và MCH ở bệnh nhân thalassemia.** MCV là  $67,56 \pm 5,16$  fl và MCH là  $21,56 \pm 1,85$ pg.

- Với  $\alpha$ -thalassemia thì: MCV  $67,7 \pm 4,51$ fl và MCH  $21,49 \pm 1,56$ pg.

- Với  $\beta$ -thalassemia thì MCV  $63,31 \pm 3,29$  fl và MCH là  $20,01 \pm 0,56$ pg.

- Với MCV  $< 80$ fl và MCH  $< 28$ pg thì có 98,85 đột biến gen HBA, HBB được phát hiện.

- Đột biến  $\alpha$ -thalassemia đơn độc có MCV, MCH cao hơn đột biến  $\beta$ -thalassemia đơn độc.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Hải Toàn, Nguyễn Thị Thu Hà, Bạch Quốc Khánh và cộng sự. (2018). Bước đầu phân tích một số chỉ số trong sàng lọc thalassemia cộng đồng, Tạp chí y học Việt Nam, 467, 435-443.

2. He J., Song W., Yang J., et al. (2017). Next-generation sequencing improves thalassemia carrier screening among premarital adults in a high prevalence population: the Dai nationality, China, Genetics In Medicine, 19, 1022.

3. Trần Thị Thúy Minh. (2015), Tỷ lệ mắc và kiểu hình gen bệnh alpha và beta thalassemia ở trẻ em dân tộc Ê Đê và M'Nông tỉnh Đắk Lắk, Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh, thành phố Hồ Chí Minh.

4. Long X., Fang J., Yao L., et al. (2014). Correlation Analysis between Mean Corpuscular Hemoglobin and Mean Corpuscular Volume for Thalassemia Screening in Large Population, American Journal of Analytical Chemistry, 5 (14), 901-907.

5. Lương T. H. (2012), Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng bệnh nhân thalassemia trưởng thành tại bệnh viện đa khoa Trung ương Thái Nguyên, Đại học Thái Nguyên, Thái Nguyên.

6. Đào Phan Thu Hương, Vũ Hải Toàn, Nguyễn Thị Thu Hà và cộng sự. (2019). Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng và xét nghiệm ở thai phụ mang gen thalassemia tại Viện Huyết học truyền máu Trung ương năm 2018-2019, Tạp chí y học Việt Nam, 477, 260-273.

7. Lai K., Huang G., Su L., et al. (2017). The prevalence of thalassemia in mainland China: evidence from epidemiological surveys, Scientific reports, 7 (1), 920-920.

8. Velasco-Rodríguez D., Blas C., Alonso-Domínguez J.-M., et al. (2017). Cut-Off Values of Hematologic Parameters to Predict the Number of Alpha Genes Deleted in Subjects with Deletional Alpha Thalassemia, International journal of molecular sciences, 18 (12), 2707.

9. Zhang J., He J., Mao X., et al. (2017), Haematological and electrophoretic characterisation of  $\beta$ -thalassaemia in Yunnan province of Southwestern China.

## NHU CẦU VÀ TÌNH TRẠNG PHỤC HỒI CHỨC NĂNG TẠI GIA ĐÌNH CHO TRẺ KHUYẾT TẬT KHÓ KHĂN VẬN ĐỘNG Ở THÀNH PHỐ BIÊN HOÀ

Nguyễn Thị Lâm\*, Trần Đức Phần\*, Nguyễn Thị Bích Liên\*

### TÓM TẮT

**Mục tiêu** (1). Xác định nhu cầu phục hồi chức năng tại gia đình cho trẻ khuyết tật khó khăn vận động ở thành phố Biên Hòa. (2). Đánh giá tình trạng phục hồi chức năng tại gia đình cho trẻ khuyết tật khó khăn vận động ở thành phố Biên Hòa. **Đối tượng và phương pháp:** nghiên cứu cắt ngang mô tả, tiến hành với 130 trẻ khuyết tật khó khăn vận động (TKT KKVD) tại thành phố Biên Hòa - Đồng Nai. **Kết quả:** số TKT KKVD được khám về phục hồi chức năng (PHCN) là 63,8%. Trẻ được điều trị PHCN là 60,0%. Nhu cầu được PHCN tại gia đình cho trẻ khuyết tật (TKT) này là 96,2%. Trong đó nhu cầu PHCN về vận động là 96,9%, nhu cầu hòa nhập cộng đồng là 97,7 %. 97,5% các thành viên gia đình (TVGD) TKT KKVD thấy tập luyện cho trẻ tại gia đình là rất cần thiết. Khi TKT KKVD được các TVGD chăm sóc và tập luyện các kỹ năng sinh hoạt hàng ngày thì trẻ giữ được tình trạng vận động như cũ/ tốt hơn cũ cao gấp 39,75 lần trẻ không được tập luyện. Các TVGD chơi cùng trẻ và kết hợp tập nhận thức giao tiếp sẽ duy trì được mức cũ/ tốt hơn cao gấp 6,29 lần trẻ không được tập luyện. **Kết luận:** hầu hết TKTVD có nhu cầu PHCN tại gia đình, khi được các TVGD hỗ trợ thì khả năng vận động của trẻ duy trì như cũ hoặc tốt lên rất nhiều lần.

**Từ khoá:** trẻ khuyết tật, khó khăn về vận động, phục hồi chức năng tại gia đình.

### SUMMARY

#### THE NEEDS AND STATUS OF REHABILITATION AT HOME FOR CHILDREN WITH MOBILITY DIFFICULTIES IN BIEN HOA CITY

**Objectives:** (1). Identifying family rehabilitation needs for children with mobility difficulties (CWD) in Bien Hoa city. (2). Assessment of family rehabilitation for children with mobility impairment in Bien Hoa city. **Methods:** this is a descriptive cross-sectional study, conducted with 130 children with mobility difficulties in the Bien Hoa city. **Results:** showed that 63.8% of children with CWD were examined for rehabilitation. 60.0% of children receiving rehabilitation treatment. The need for rehabilitation at home for children with disabilities is 96.2%. In which, the need for rehabilitation of movement is 96.9%, the need for community integration is 97.7%. 97.5% of family members of CWD think rehabilitation at home is very necessary. When children with CWD are cared for and practiced daily living skills by family members, children can keep the same / better motor status 39.75 times higher than those who do not practice. The family members of CWD sets playing with the children and combining communicative cognitive training will remains the situation or/ better level, 6.29 times higher than that of the children who do not practice. **Conclusions:** most of the CWD have the need for rehabilitation at home, when supported by family members, the CWD will remains the situation or get better level mobility.

**Keywords:** children with disabilities, mobility impairments, rehabilitation at home.

\*Trường Đại học Y Hà Nội.

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Lâm

Email: nguyenthilam@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 5.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 18.9.2020

Ngày duyệt bài: 18.11.2020

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo WHO năm 2013, có hơn 1000 triệu người khuyết tật (NKT) trên toàn cầu (khoảng 15% dân số thế giới). Số NKT tiếp tục gia tăng cùng với sự tăng dân số và tình trạng tiến triển toàn cầu về các bệnh mãn tính. Ước tính có khoảng 93 triệu trẻ em (hoặc 1/20 trẻ dưới 15 tuổi) sống với mức độ khuyết tật vừa hoặc nặng [9]. Tại Mỹ, số NKT cũng có xu hướng tăng, đặc biệt là khuyết tật vận động [2]

Báo cáo của Quỹ dân số Liên hợp quốc (UNFPA), năm 2011 ở Việt Nam có 6.074.543 người khuyết tật, trong đó có 219.375 trẻ em khuyết tật (TKT) tương đương 3,6% (độ tuổi từ 5 ≤ 16 tuổi) [5]. Kết quả điều tra trong chương trình phục hồi chức năng dựa vào cộng đồng (PHCNDVCD), tỷ lệ khuyết tật ở Việt Nam khoảng 5% - 7%, trẻ em khuyết tật chiếm khoảng 40% và loại khuyết tật hay gặp nhất là về vận động [4].

Theo điều tra Quốc gia về Người khuyết tật do Tổng Cục Thống kê thực hiện năm 2016 - 2017 với sự hỗ trợ của Quỹ Nhi Đồng Liên Hiệp Quốc (UNICEF): trẻ từ 2 - 17 tuổi có tỉ lệ TKT là 2,79% (trong đó có 3,0% trẻ nam và 2,57% trẻ nữ). Số TKT về vận động là 56% (50% khuyết tật về vận động thân dưới và 6,0% khuyết tật về vận động thân trên), 62% khuyết tật về giao tiếp, 74% khuyết tật về nhận thức, 22% khuyết tật về nghe, 15% khuyết tật về nhìn và có đến 78% trẻ khuyết tật đa chức năng. Cơ hội đi học ở TKT từ 5 - 14 tuổi sống trong hộ nghèo thấp hơn khoảng 21% so với trẻ không khuyết tật [7].

Năm 2011, tỉnh Đồng Nai có khoảng 154.000 - 162.000 NKT (trong đó có 16.000 TKT độ tuổi từ 0 đến ≤ 16 tuổi chiếm 10%), tật về vận động chiếm 51% và có khoảng 2.400 NKT về vận động cần PHCN [5].

TKT khó khăn vận động (TKT KKVD) thường gặp rất nhiều trở ngại khi dịch chuyển/ di chuyển, sinh hoạt hàng ngày và trong cuộc sống nên rất cần được quan tâm chăm sóc, PHCN thích hợp. PHCNDVCD là biện pháp hiệu quả và phù hợp vì TKT KKVD được tập luyện phục hồi ngay tại gia đình và cộng đồng, khuyến khích cuộc sống hoà nhập, đảm bảo trẻ được chăm sóc và phát triển tốt nhất [1].

Để có cơ sở triển khai PHCN dựa vào cộng đồng cho TKT KKVD ở Biên Hòa, chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu này nhằm mục tiêu:

1. *Xác định nhu cầu phục hồi chức năng tại gia đình cho trẻ khuyết tật khó khăn vận động ở thành phố Biên Hòa.*

2. *Đánh giá tình trạng phục hồi chức năng tại gia đình cho trẻ khuyết tật khó khăn vận động ở thành phố Biên Hòa.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng và thời gian nghiên cứu

- 130 TKT KKVD độ tuổi từ 0 - 15 tuổi ở 9 xã/phường của thành phố Biên Hoà.

- 122 thành viên gia đình TKT (bố/mẹ, ông/bà, người thân, người bảo hộ TKT trên). Một số gia đình có 2 - 4 TKT.

- Thời gian nghiên cứu: từ 5/2015 - 5/2017

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

\* Thiết kế nghiên cứu là nghiên cứu mô tả cắt ngang, hồi cứu và tiến cứu.

\* Các bước nghiên cứu:

- Chọn đối tượng nghiên cứu: dựa vào danh sách TKT đã được chẩn đoán và quản lý tại 30 xã/phường thuộc thành phố Biên Hoà, chọn các xã/phường nhiều trẻ có các bệnh gây ra khó khăn vận động để khám và đánh giá.

- Khám và phân loại khuyết tật, chọn các

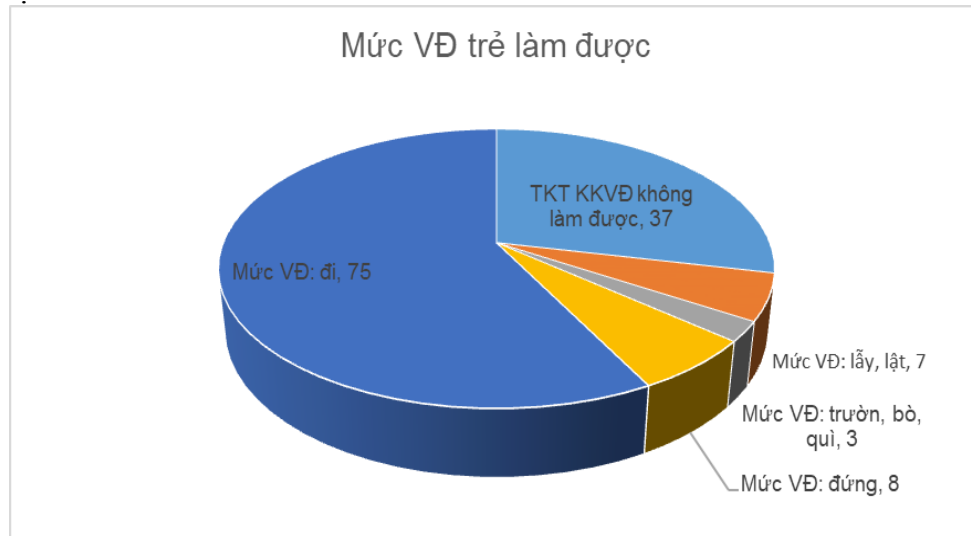
TKT KKVĐ.

- Phỏng vấn thành viên gia đình TKT KKVĐ về tình trạng chăm sóc, tập luyện PHCN tại gia đình.

- Xác định nhu cầu PHCN tại gia đình cho phù hợp với tình trạng khuyết tật của trẻ.

### III. KẾT QUẢ

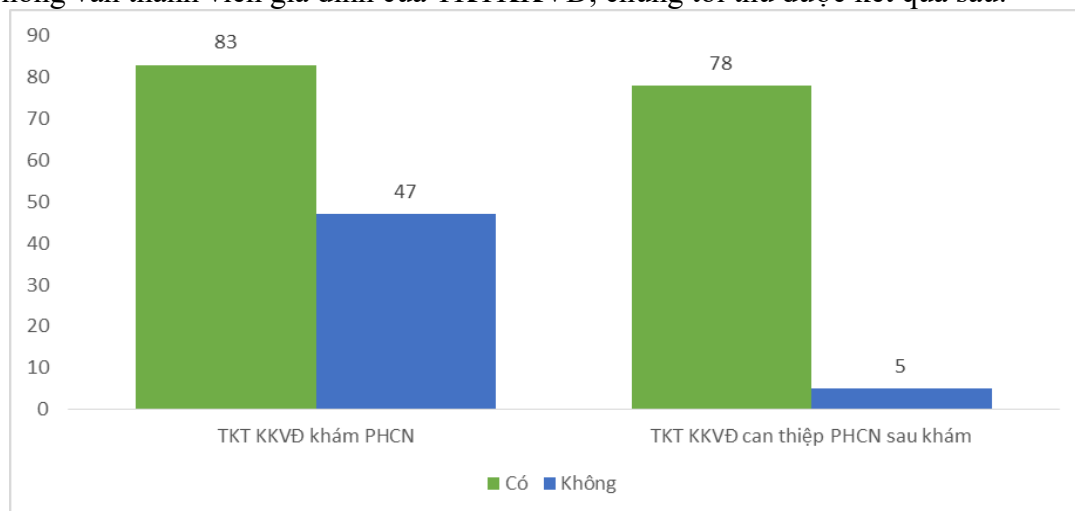
Qua khám đánh giá chọn ra 130 TKT KKVĐ. Các mức độ vận động thô (VĐ) hiện tại các trẻ đạt được như sau:



**Biểu đồ 1. Tình trạng vận động thô hiện tại của TKT KKVĐ (n = 130)**

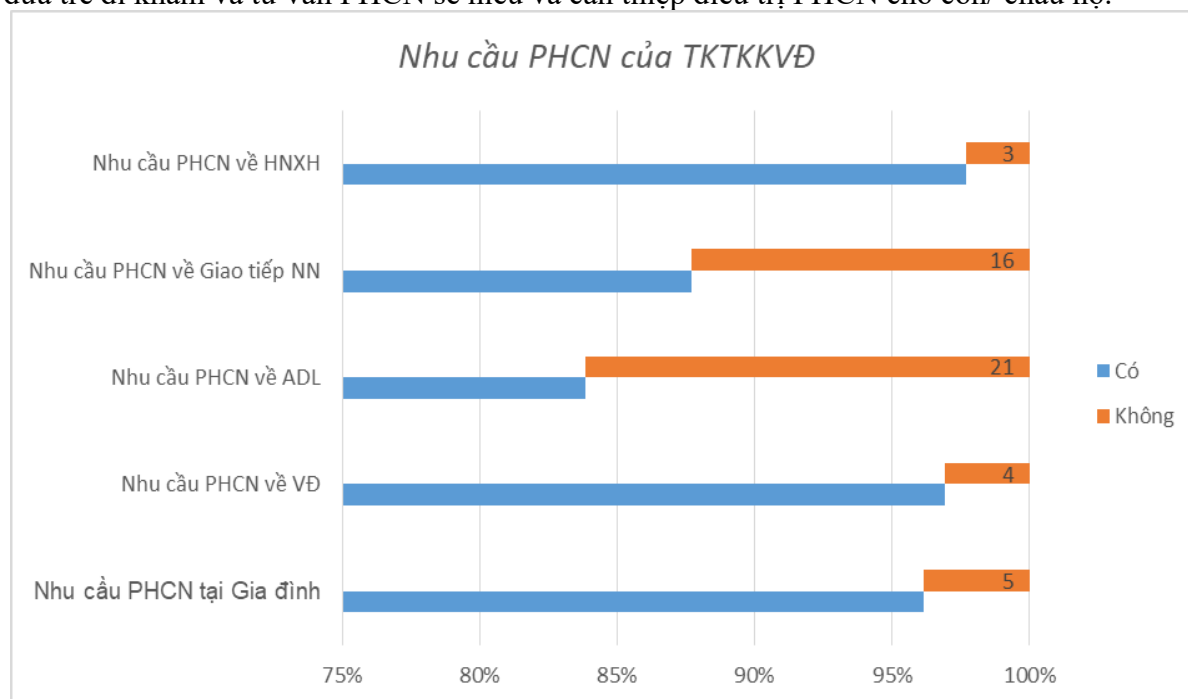
Kết quả trên cho thấy tỷ lệ TKT KKVĐ nặng chỉ nằm tại giường, phải chăm sóc hoàn toàn các nhu cầu sinh hoạt hàng ngày là 28,5%. Số trẻ có thể đi được nhưng còn phải trợ giúp hoặc với dáng đi bất thường là 57,7%. Các mức vận động khác như lẫy, lật, trườn, bò, quỳ và đứng chiếm tỷ lệ rất ít.

Phỏng vấn thành viên gia đình của TKT KKVĐ, chúng tôi thu được kết quả sau:



**Biểu đồ 2. Tỷ lệ TKT KKVĐ đã được khám và can thiệp PHCN**

Kết quả ở biểu đồ trên cho thấy: TKT KKVĐ đã được gia đình cho đi khám về PHCN là 63,8% (83/130). Sau khi khám có 78/83 trẻ đã được can thiệp PHCN (94,0%). Tỷ lệ trẻ không được can thiệp điều trị PHCN sau khi khám là 6,0%. Đa số các gia đình TKT sau khi đưa trẻ đi khám và tư vấn PHCN sẽ hiểu và can thiệp điều trị PHCN cho con/ cháu họ.



**Biểu đồ 3. Tỷ lệ các nhu cầu phục hồi chức năng của TKT KKVĐ**

Mặc dù TKT KKVĐ có nhiều mức VĐ khác nhau nhưng có đến 96,2% trẻ có nhu cầu được PHCN tại gia đình. Đa số trẻ có từ 2 nhu cầu PHCN trở lên. Trong đó hầu hết TKT KKVĐ có nhu cầu PHCN về vận động (96,9%) và nhu cầu về hội nhập xã hội chiếm tỉ lệ cao nhất (97,7%).

**Bảng 1. Sự hiểu biết của TVGD và việc tập luyện cho trẻ tại gia đình (n=122)**

| Hiểu biết, tập luyện tại gia đình |                                                                                                                     | Tình trạng |  | Có  |      | Không |      |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--|-----|------|-------|------|
|                                   |                                                                                                                     |            |  | n   | %    | n     | %    |
| Sự hiểu biết                      | Tìm kiếm thông tin (Kiến thức, các bài tập, dụng cụ trợ giúp, thuốc...) liên quan đến tình trạng khuyết tật của trẻ |            |  | 93  | 76,2 | 29    | 23,8 |
|                                   | Sự cần thiết việc chăm sóc và tập luyện vận động cho trẻ tại gia đình                                               |            |  | 119 | 97,5 | 3     | 2,5  |
|                                   | Việc áp dụng những kiến thức đã được biết để tự tập luyện cho trẻ tại gia đình                                      |            |  | 116 | 95,1 | 6     | 4,9  |
| Tập luyện tại gia                 | Tập vận động các khớp toàn thân 1 lần/1 ngày cho trẻ tại gia đình                                                   |            |  | 81  | 66,4 | 41    | 33,6 |
|                                   | Tập các mức vận động thô 1 lần/1 ngày cho trẻ tại gia đình                                                          |            |  | 62  | 50,8 | 60    | 49,2 |

|      |                                                                                               |     |      |    |      |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------|----|------|
| đình | Tập vận động làm khoẻ cơ yếu 1 lần/1 ngày cho trẻ tại gia đình                                | 70  | 57,4 | 52 | 42,6 |
|      | Tập các kỹ năng sinh hoạt hàng ngày 1 lần/1 ngày cho trẻ tại gia đình                         | 108 | 88,5 | 14 | 11,5 |
|      | Thường xuyên chơi với trẻ và luyện tập nhận thức, giao tiếp 1 lần/1 ngày cho trẻ tại gia đình | 88  | 72,1 | 34 | 33,9 |

Kết quả cho thấy: có 76,2% thành viên gia đình (TVGD) đã tìm kiếm thông tin liên quan đến khuyết tật của trẻ. Đa số họ (97,5%) cho rằng việc tập luyện cho trẻ tại gia đình rất cần thiết. Các TVGD đã áp dụng kiến thức được biết để tự tập luyện cho trẻ tại gia đình chiếm 95,1%. Họ thường xuyên tập các kỹ năng sinh hoạt hàng ngày (1 lần/1 ngày) (88,5%) và kết hợp chơi và luyện tập nhận thức, giao tiếp (1 lần/1 ngày) với trẻ (72,1%).

**Bảng 2. Mối liên quan giữa việc tập luyện trong 1 năm cho trẻ tại gia đình và đánh giá tình trạng tiến triển so với trước đó**

| Tình trạng tiến triển<br>Bài tập và người tập tại gia đình    |       | Giữ mức cũ và tốt hơn |      | Xấu đi Không rõ |      | OR (95% CI)           | P            |
|---------------------------------------------------------------|-------|-----------------------|------|-----------------|------|-----------------------|--------------|
|                                                               |       | n                     | %    | n               | %    |                       |              |
| Tập vận động các khớp toàn thân (1 lần/1 ngày)                | Có    | 77                    | 95,1 | 4               | 4,9  | 2,08 (0,49 - 8,79)    | 0,44         |
|                                                               | không | 37                    | 90,2 | 4               | 9,8  |                       |              |
| Tập các mức vận động thô (1 lần/1 ngày)                       | Có    | 59                    | 95,2 | 3               | 4,8  | 1,79 (0,41 - 7,84)    | 0,49         |
|                                                               | không | 55                    | 91,7 | 5               | 8,3  |                       |              |
| Tập các kỹ năng sinh hoạt hàng ngày (1 lần/1 ngày)            | Có    | 106                   | 98,1 | 2               | 1,9  | 39,75 (6,88 - 229,72) | <b>0,001</b> |
|                                                               | không | 8                     | 57,1 | 6               | 42,9 |                       |              |
| Chơi với trẻ và luyện tập nhận thức, giao tiếp (1 lần/1 ngày) | Có    | 88                    | 97,8 | 2               | 2,2  | 6,29 (0,03- 0,91)     | <b>0,005</b> |
|                                                               | Không | 28                    | 87,5 | 4               | 12,5 |                       |              |

Kết quả trên cho thấy: khi các TVGD tập các kỹ năng sinh hoạt hàng ngày cho TKT KKVD thì duy trì được mức cũ/ tốt hơn gấp 39,75 lần trẻ không được tập luyện với  $p < 0,001$ . Tương tự khi họ chơi cùng trẻ và luyện tập nhận thức giao tiếp sẽ duy trì được mức cũ/ tốt hơn gấp 6,29 lần trẻ không được tập luyện với  $p < 0,005$ . Các bài tập khác tỷ lệ các gia đình thực hiện chưa cao, kết quả cải thiện vận động thô không có ý nghĩa thống kê.

#### IV. BÀN LUẬN

Chăm sóc một TKT đặc biệt là TKT KKVD rất vất vả khó khăn do đặc thù khuyết tật. Hầu hết các TKT KKVD (96,2%) có nhu cầu chăm sóc, PHCN tại gia đình. Theo UNICEF (2018), trẻ khuyết tật thường có

nhu cầu chăm sóc y tế nhiều hơn. Tỷ lệ TKT từ 2 -15 tuổi bị ốm/ bệnh/ chấn thương trong vòng 12 tháng là 79,8%. Được sự quan tâm của Chính phủ và Bộ Y tế, hiện nay 57,3% các trạm y tế có chương trình PHCN, 90,6% trạm y tế triển khai hoạt động giáo dục phổ

biến kiến thức về chăm sóc sức khỏe cho người khuyết tật và 2,0% TKT được điều trị tại cơ sở PHCN khi bị ốm/ bệnh/ chấn thương [7].

Tại tỉnh Đồng Nai năm 2011 có khoảng 16.000 TKT (từ 0 đến dưới 16 tuổi chiếm 10%). Khoảng 2.400 TKT KKVD cần PHCN [8]. Mặc dù vậy, số TKT đã khám PHCN ở thành phố Biên Hòa chỉ có 63,8% và 60,0% được can thiệp điều trị PHCN, có 5/83 trẻ đã đi khám nhưng chưa được PHCN chiếm 6%. Kết quả còn cho thấy hầu hết TKT KKVD có nhu cầu PHCN về vận động (96,9%) và nhu cầu về hội nhập xã hội (97,7%). Nhu cầu về sinh hoạt hàng ngày là 83,8%. Nhu cầu về giao tiếp ngôn ngữ: 87,7%. Đa số TKT KKVD có từ 2 nhu cầu PHCN trở lên. Số trẻ mức độ nặng không di chuyển được chiếm 28,5%, đối tượng này rất cần được hỗ trợ PHCN tại gia đình.

Nghiên cứu của Phạm Thị Tĩnh và cộng sự [6] tại Quỳnh Phụ, Thái Bình cho thấy: tỷ lệ khuyết tật ở trẻ 0 - 6 tuổi là 1,12%. Về mô hình khuyết tật: nhóm khuyết tật vận động là cao nhất, chiếm 31,3%, nhóm khuyết tật nghe nói là 28,5%, nhóm khuyết tật về nhìn là 17,5%. Các dạng khuyết tật thường gặp là bại não, chậm phát triển vận động, chậm phát triển ngôn ngữ, giảm thị lực. Nghiên cứu cũng cho thấy: việc phát hiện sớm khuyết tật có ý nghĩa quan trọng trong quá trình chăm sóc và nuôi dạy trẻ, nó là cơ sở để đánh giá mức độ khuyết tật cũng như ảnh hưởng của khuyết tật, từ đó có kế hoạch can thiệp sớm, việc can thiệp sớm và đúng cách giúp trẻ phát triển tối đa khả năng của mình. Mô hình khuyết tật và tác dụng của phát hiện nhu cầu can thiệp cho trẻ khuyết tật mà

chúng tôi nghiên cứu ở Biên Hòa cũng cho thấy kết quả tương tự như của nhóm tác giả trên.

Đánh giá về nhu cầu phục hồi chức năng cho trẻ khuyết tật, Phạm Thị Nhiên và cộng sự [8] nghiên cứu tại trung tâm Bảo trợ xã hội tỉnh Hải Dương cho thấy: nhu cầu được phục hồi chức năng vận động là cao nhất (96,68%), nhu cầu hòa nhập cộng đồng, chơi đùa với bạn 60%. Phần lớn trẻ có nhu cầu học tập, tham gia hoạt động gia đình, tham gia hoạt động xã hội và nhu cầu hướng nghiệp.

Chương trình PHCNDVCD trong các nghiên cứu trên được đánh giá là có hiệu quả trong việc cải thiện chức năng sinh hoạt hàng ngày, chức năng vận động, nhưng chưa có hiệu quả trong việc cải thiện chức năng hoà nhập xã hội. Thực trạng đó cho thấy nếu TKT nói chung và TKT KKVD nói riêng được tập luyện tại chính gia đình mình sẽ giảm thiểu các chi phí, tăng khả năng giao tiếp và hoà nhập xã hội. Trong điều trị PHCN, do tiến triển rất chậm và nhiều biến chứng thứ phát, quá trình tập luyện và chăm sóc tốt giúp cho bệnh nhân không bị xấu đi, giữ nguyên ở mức như cũ, đó cũng là sự tiến triển của chương trình tập luyện. Để chương trình PHCN tại gia đình cho TKT KKVD đạt hiệu quả mong muốn, san sẻ/ trợ giúp để trẻ có thể tiến triển tốt và hoà nhập cộng đồng, rất cần sự phối hợp đa ngành, sự quan tâm thể hiện bằng hành động của gia đình và toàn thể xã hội.

## V. KẾT LUẬN

1. Nhu cầu PHCN: 96,2 % TKT KKVD có nhu cầu chăm sóc, PHCN tại gia đình. 96,9% trẻ có nhu cầu PHCN về vận động,

97,7% muốn được hỗ trợ để hội nhập cộng đồng, 83,8% có nhu cầu hỗ trợ cho sinh hoạt hàng ngày, 87,7% có nhu cầu PHCN giao tiếp ngôn ngữ. Đa số TKT có từ 2 nhu cầu PHCN trở lên.

2. Có 63,8% TKT KKVĐ ở thành phố Biên Hòa được khám về PHCN, 94,0% TKT sau khi khám được can thiệp điều trị PHCN. Số TKT nặng chỉ nằm tại giường hầu như phụ thuộc hoàn toàn về sinh hoạt chiếm 28,5%.

Có 76,2% các TVGĐTKT đã tìm kiếm thông tin liên quan đến khuyết tật của trẻ, 97,5% thấy rất cần thiết tập luyện cho trẻ tại gia đình, 95,1% đã áp dụng những kiến thức được biết để tự tập cho trẻ tại gia đình. Khi các TVGĐ tập kỹ năng sinh hoạt hàng ngày cho TKT KKVĐ thì duy trì được mức cũ/ tốt hơn gấp 39,75 lần trẻ không được tập luyện với  $p < 0,001$ . Tương tự khi họ chơi cùng trẻ và luyện tập nhận thức giao tiếp sẽ duy trì được mức cũ/ tốt hơn gấp 6,29 lần trẻ không được tập luyện với  $p < 0,005$ .

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bộ y tế (2014).** Hướng dẫn phát hiện sớm, can thiệp sớm trẻ em khuyết tật (Dành cho cán bộ Y tế), Cục quản lý Khám chữa bệnh, Bộ Y tế.
2. **Cara T. Mai, James E. Kucik, Jennifer Isenburg, Marcia L. Feldkamp et al (2015).** Selected Birth Defects Data from Population-Based Birth Defects Surveillance Programs in

the United States, 2006 to 2010: Featuring Trisomy Conditions. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 97(11): 709-725..

3. **Phạm Thị Nhuyên, Lương Tuấn Khanh (2016).** Thực trạng và nhu cầu phục hồi chức năng của trẻ khuyết tật tại trung tâm bảo trợ xã hội tỉnh Hải Dương năm 2014. Tạp chí y học thực hành. 4 (1001), 77-80.
4. **Phục hồi chức năng cho nạn nhân chất độc hoá học/dioxin (2010).** Ảnh hưởng của chất độc hoá học/dioxin tới môi trường và sức khoẻ con người, Nhà xuất bản Y học.
5. **Quỹ dân số Liên hợp quốc UNFPA Việt Nam (2011).** Một số kết quả chủ yếu từ tổng điều tra Dân số và Nhà ở Việt Nam 2009, Bộ Lao Động - Thương Binh và Xã Hội.
6. **Phạm Thị Tĩnh, Phạm Thị Dung, Phạm Bích Phương (2018).** Thực trạng khuyết tật ở trẻ 0-6 tuổi tại huyện Quỳnh Phụ tỉnh Thái Bình năm 2016. Tạp chí y học Việt Nam. 465 (1), 12-16.
7. **Tổng cục thống kê, UNICEF (2018).** Trẻ em khuyết tật tại Việt Nam. Kết quả điều tra về người khuyết tật Việt Nam năm 2016-2017. 3 - 17.
8. **Ủy ban Nhân dân tỉnh Đồng Nai (2013).** Kế hoạch 9971/ KH-UBND năm 2013 trợ giúp trẻ khuyết tật Đồng Nai giai đoạn 2013 - 2015, Báo cáo kế hoạch 9971/KH-UBND.
9. **WHO (2014).** WHO global disability action plan 2014-2021: better health for all people with disability. World Health Organization. A67/16 - 64.

# ỨNG DỤNG KỸ THUẬT CHỈNH SỬA GEN BẰNG HỆ THỐNG CRISPR/CAS9 TRONG UNG THƯ: THÀNH TỰU VÀ HẠN CHẾ

Vũ Thị Hà\*, Đoàn Thị Kim Phượng\*, Trần Đức Phấn\*

## TÓM TẮT

Để chỉnh sửa gen người ta có nhiều phương pháp. Trong đó, kỹ thuật chỉnh sửa gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9 đã đạt được hiệu quả chỉnh sửa cao trong nhiều bệnh lý, đặc biệt là trong ung thư. Hệ thống này đang được thử nghiệm invitro, invivo và bước đầu có các thử nghiệm lâm sàng. Bài báo này có **mục tiêu**: Tổng quan những thành tựu và hạn chế của việc sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 trong ung thư. **Phương pháp**: nghiên cứu là tổng quan tài liệu. **Kết quả**: qua các nghiên cứu của các tác giả cho thấy hệ thống CRISPR/Cas9 có thể dùng để chỉnh sửa vùng điều chỉnh một số gen ung thư gây ức chế ung thư, tăng cường hệ miễn dịch để chống ung thư, chèn thêm một số gen gây độc tế bào để diệt tế bào ung thư, phá vỡ chức năng của ung thư. **Kết luận**: các nghiên cứu cho thấy CRISPR/Cas9 có khả năng chỉnh sửa một số gen làm ức chế ung thư. Nghiên cứu đã thành công invitro, invivo và bước đầu có thử nghiệm lâm sàng.

**Key word**: CRISPR/cas9, chỉnh sửa gen, ung thư.

## SUMMARY

### THE APPLICATION OF GENOME EDITING BY CRISPR/CAS9 SYSTEM IN CANCER: ACHIEVEMENT AND LIMITATION

\*Bệnh viện Trường ĐH Y Hà Nội, Trường ĐH Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Vũ Thị Hà

Email: vuthiha@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 3.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 18.9.2020

Ngày duyệt bài: 20.11.2020

There are many methods to edit genes. Editing genes by CRISPR/Cas9 system has been succeed and had high efficiency in many disease, especialy in cancer. This system is being tested in vitro, in vivo and initially in clinical trials. This paper **aims** to overview the achievements and limitations of using the CRISPR/Cas9 system in cancer. **Research methodology** is literature review. **The results** of the authors' studies showed that the CRISPR/Cas9 system can edit noncoding regions for control some oncogenes, boost the immune system to impressing cancer, insert a number of cytotoxic genes to kill tumor cells, disrupt the function of cancer. Bottom Line: Studies show CRISPR/Cas9 has the ability to modify certain genes that suppress tumors. These studies were successful in vitro and in vivo and initially in clinical trials.

**Key word**: CRISPR/cas9, gene editing, cancer.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kỹ thuật chỉnh sửa bộ gen (hay còn gọi tắt là chỉnh sửa gen) bao gồm một nhóm các kỹ thuật giúp các nhà khoa học thay đổi bộ gen của nhiều loại sinh vật. Những kỹ thuật này cho phép vật liệu di truyền mong muốn được thêm vào, loại bỏ hoặc thay đổi tại những vị trí cụ thể trong bộ gen.

Những năm gần đây, hệ thống CRISPR/Cas9 đã trở thành một công cụ tiềm năng mạnh mẽ trong chỉnh sửa gen của nhiều loại sinh vật. Trong số nhiều ứng dụng của nó, CRISPR/Cas9 đã được sử dụng nhiều để chỉnh sửa gen trong ung thư từ thử nghiệm

invitro và invivo, và xa hơn nữa là một số thử nghiệm lâm sàng. Để góp phần thông tin cập nhật về vấn đề chỉnh sửa gen, chúng tôi viết bài tổng quan này với mục tiêu: Tổng quan những thành tựu và hạn chế của việc sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 trong ung thư.

## II. PHƯƠNG PHÁP

Để phân tích các ứng dụng của kỹ thuật chỉnh sửa gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9 trong điều trị ung thư, chúng tôi tổng quan các tài liệu và các nghiên cứu liên quan.

## III. TỔNG QUAN

### 1. Tổng quan về hệ thống CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 được viết tắt từ những chữ cái đầu của cụm Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats và CRISPR-associated (Cas) protein, là một hệ miễn dịch ở sinh vật nhân sơ giúp chúng có khả năng ghi nhớ và tạo miễn dịch với các yếu tố di truyền ngoại lai. Trình tự CRISPR lần đầu tiên được nhà khoa học Nhật Bản Yoshizumi Ishino và cộng sự tìm ra vào năm 1987 trên *E. coli* và nhiều vi khuẩn khác sau đó [1]. Không giống các trình tự lặp lại điển hình trong bộ gen, cụm CRISPR được phân tách bằng các trình tự DNA không lặp lại được gọi là vùng đệm spacer. Phải mất hơn một thập kỷ các nhà nghiên cứu mới nhận ra bản chất và nguồn gốc của các trình tự đệm này. Bằng chứng thực nghiệm quan trọng về chức năng tiềm tàng của hệ thống CRISPR đến từ công trình của Horvath và các đồng nghiệp [2]. Họ chứng minh rằng sau một thử thách với phage, vi khuẩn *Streptococcus thermophilus* tích hợp các spacers có nguồn gốc từ phage vào bộ gen

của nó. Trình tự đệm của CRISPR quy định đặc tính nhắm mục tiêu của Cas enzyme, cung cấp khả năng phòng thủ chống lại phage. Hoạt động của các enzym Cas được hướng dẫn bởi các RNA CRISPR ngắn (crRNA) được phiên mã từ trình tự đệm và nó có thể chặn truyền ngang DNA từ plasmid của vi khuẩn (hình 1). Một phát minh khác được tìm thấy, trong số nhiều loại protein Cas thì protein Cas9 là protein duy nhất có DNA xúc tác hoạt động ở *Streptococcus thermophilus*. Sapranaukas R. và các đồng nghiệp đã chứng minh rằng hệ thống CRISPR từ một vi khuẩn có thể chuyển cho các dòng vi khuẩn khác nhau, locus CRISPR từ *S. thermophilus* có thể xen vào cấu trúc ở *E. coli* [3]. Đáng chú ý, Jinek và cộng sự cho thấy rằng CRISPR/Cas9 cũng có thể được hướng dẫn bởi phân tử RNA duy nhất được hình thành bởi sự hợp nhất của tracrRNA và crRNA, được gọi là RNA dẫn đường đơn (sgRNA) [4]. Hoạt động của hệ CRISPR/Cas9 có thể tóm tắt như trong hình 2, bao gồm sự tham gia của hai thành phần chính là Cas9 protein và đoạn dẫn RNA không mã hóa (được gọi là sgRNA). Phân tử sgRNA bắt cặp với trình tự của vùng đệm spacer trên DNA đích mới xâm nhập và giúp protein Cas (CRISPR-associated) nhận ra và thực hiện cắt đứt, sửa chữa sợi DNA tại vùng bắt cặp. Kết quả là DNA có thể được sửa đổi nhanh hơn và dễ dàng hơn nhiều so với khả năng sử dụng các phương pháp chỉnh sửa gen trước đó [5].

Những nghiên cứu gần đây cho thấy CRISPR/Cas9 có thể được điều chỉnh cho in vivo, chỉnh sửa bộ gen trong tế bào nhân thực. Lần đầu tiên các nhà nghiên cứu đã có

một công cụ cực kỳ linh hoạt có thể dễ dàng được hướng dẫn để nhắm mục tiêu gần như bất kỳ vị trí nào trong bộ gen một cách đơn giản thiết kế một sgRNA ngắn. Do hiệu quả chỉnh sửa cao và dễ dàng sử dụng, các nhà nghiên cứu từ các lĩnh vực khác nhau đã nhanh chóng áp dụng kỹ thuật CRISPR/Cas9 như một phương pháp được lựa chọn để nhắm trúng đích các gen khác nhau.

## **2. Ứng dụng trong nghiên cứu và liệu pháp điều trị ung thư**

Bản chất của tế bào ung thư là do có sự biến đổi vật chất di truyền, dẫn tới sự mất kiểm soát chu kỳ tế bào, tăng sinh tế bào không biệt hóa một cách quá mức. Việc chỉnh sửa các gen kiểm soát chu kỳ tế bào bằng kích thích hay ức chế sự biểu hiện của các gen sẽ góp phần tìm ra hướng điều trị mới trong ung thư. Như đã đề cập ở trên, phân tử protein Cas9 có thể dễ dàng làm thay đổi sự biểu hiện của các gen nội sinh thông qua việc nhắm trúng đích nhờ sgRNA dẫn đường để kích hoạt hoặc kích thích các gen đích. Bên cạnh đó, protein Cas9 còn có khả năng liên kết với các protein histon khác làm thay đổi quá trình methyl hóa DNA ở các vùng gen khác nhau. Với mục tiêu cuối cùng là làm thay đổi vật chất di truyền liên quan tới khả năng tồn tại của tế bào ung thư, hệ thống CRISPR/Cas9 có nhiều phương thức ứng dụng khác nhau. Tuy nhiên, trong bài báo này, chúng tôi chỉ tổng quan hai ứng dụng mà nhiều nhà khoa học đã sử dụng và đạt được những thành tựu nổi bật.

### **2.1. Chỉnh sửa vùng gen không mã hóa (non-coding genome) trong ung thư**

Trong cấu trúc bộ gen người có chứa những vùng mã hóa protein (exon) và vùng

không mã hóa protein. Vùng không mã hóa protein này lại chiếm tới 98% cấu trúc bộ gen bao gồm vùng trình tự chứa cấu trúc điều hòa, vùng không mã hóa RNA, vùng trình tự lặp lại, vùng intron, vùng không có chức năng chuyên biệt. Tuy nhiên ở tế bào ung thư, sự phiên mã của các gen ung thư có thể được kiểm soát bởi những vùng này. Nghiên cứu của N.E. Sanjana và cộng sự đã sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 để vô hiệu 700Kb thuộc vùng intron của các gen ung thư như CUL3, NF1 và NF2 ứng dụng trong sàng lọc thuốc điều trị ung thư [6]. Các nhà khoa học cũng sử dụng CRISPR để xác định và chỉnh sửa vùng điều hòa trên intron của gen CDKN1A dẫn đến sự thay đổi con đường tín hiệu trong chu kỳ tế bào và giúp tế bào thay đổi sự lão hóa do gen ung thư gây ra [7].

### **2.2. Ứng dụng CRISPR/Cas9 trong liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư**

Chỉnh sửa bộ gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9 hứa hẹn to lớn trong điều trị ung thư vì nó có thể sử dụng các virus gây ung thư nhằm tối ưu hóa sự chọn lọc trên khối u và tăng cường kích thích miễn dịch. Một số ví dụ về việc sử dụng thay đổi bộ gen cho liệu pháp miễn dịch như tạo ra các biến thể của virus herpes simplex type 1 có đặc tính ly giải mạnh, được thiết kế bằng cách loại bỏ các gen ICP34.5 và ICP6 (UL39) (ribonucleotide reductase), có vai trò trong các bệnh lý thần kinh do virus [8]. Việc loại bỏ gen ICP6, dẫn đến sự nhân lên có chọn lọc của các dòng tế bào bị bất hoạt gen ức chế khối u p16<sup>INK4A</sup>, một trong những thiếu sót phổ biến nhất trong bệnh ung thư. Trong trường hợp virus gây ung thư thuộc loại

adenovirus thì các nhà khoa học thường tác động, sửa chữa gen Rb, bởi vì đặc điểm điển hình của tế bào ung thư là sự đột biến các gen trong con đường tín hiệu Rb. Một số tác giả đã loại bỏ gen E1A để ngăn chặn sự nhân lên của tế bào bệnh và thúc đẩy sự an toàn cho tế bào lành (hình 3). Một cách tiếp cận khác liên quan đến việc vô hiệu các gen thụ thể tế bào chết-1 (PD-1) trong tế bào lympho T [9]. Trục PD-1 đã được công nhận là trục chính của điểm kiểm tra miễn dịch và sự tương tác giữa PD-1 và phối tử PD-L1 của nó ức chế tế bào lympho T tăng sinh, tồn tại và các chức năng của cơ quan tác động (chẳng hạn như độc tính tế bào và giải phóng cytokine), gây ra sự tự chết tế bào T đặc hiệu khối u, cũng như khả năng kháng tế bào khối u đối với tế bào lympho T phân giải tế bào tân công (hình 4). Phương pháp này dựa trên sự vô hiệu gen PD-1 bằng hệ thống CRISPR/Cas9 trong tế bào T sau đó đưa vào bệnh nhân, trong cơ thể người bệnh các tế bào T bị vô hiệu gen PD-1 sẽ kích hoạt phản ứng miễn dịch và phát huy khả năng tiêu diệt khối u. Cách tiếp cận đầy hứa hẹn này đang được tiến hành trong 6 thử nghiệm lâm sàng với tế bào T loại bỏ PD-1 đối với ung thư hạch, ung thư dạ dày, phổi, tuyến tiền liệt, bàng quang và ung thư biểu mô tế bào thận.

Một ứng dụng khác của CRISPR/Cas9 trong liệu pháp miễn dịch chống ung thư hứa hẹn nhiều trong việc điều trị ung thư máu dựa trên việc sản xuất tế bào T miễn dịch có chứa các thụ thể kháng nguyên trên bề mặt CAR-T (Chimera antigen receptor T cell). Liệu pháp này nhằm tới việc chỉnh sửa các thụ thể trên bề mặt tế bào T, các tế bào T này có thể đặc biệt nhận biết và tiêu diệt các tế

bào biểu hiện kháng nguyên mà không bị hạn chế bởi các phân tử phức hợp hòa hợp mô (MHC). Một số tác giả đã sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 để chèn thêm các gen chức năng như interleukin, gen gây độc tế bào vào tế bào T. Kết quả đã tạo ra các tế bào T có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư [10]. Bên cạnh đó, một số tác giả khác sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 để vô hiệu một số gen có hại. Liu và cộng sự đã sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 vô hiệu hai gen (TRAC and B2M) hoặc ba gen (TRAC, B2M, and PD-1), kết quả đã tạo ra tế bào T mới có hoạt tính tiêu diệt tế bào ung thư cao hơn tế bào T ban đầu [11].

Một ứng dụng khác của hệ thống CRISPR/Cas9 là tạo ra những mô hình bệnh ung thư để nghiên cứu. Heckl D. và cộng sự, năm 2014, đã dùng hệ thống CRISPR/Cas9 tạo đột biến gây ung thư tủy bào ở chuột [12]. Ở một nghiên cứu khác, Xue W. và cộng sự đã gây đột biến gen ung thư ở gan chuột với mục đích phá vỡ chức năng của gen ung thư [13].

### 2.3. Những hạn chế

Hiện nay, hầu hết các nghiên cứu về chỉnh sửa gen đều được thực hiện với mục đích để hiểu bệnh và được thực hiện trên tế bào hoặc mô hình động vật. Các nhà khoa học vẫn đang nghiên cứu để xác định xem phương pháp này có an toàn và hiệu quả để sử dụng trên người hay không. Không chỉ được ứng dụng nhiều trên ung thư, mà nó còn được áp dụng rộng rãi trên nhiều loại bệnh khác nhau đặc biệt cho các bệnh có biến đổi vật chất di truyền, hay bệnh nhiễm trùng như HIV... Tuy nhiên, những vấn đề đạo đức về chỉnh sửa bộ gen, đặc biệt là sử dụng hệ thống

CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa bộ gen người đang là vấn đề lo ngại của con người. Những nghiên cứu hiện tại hầu hết là những chỉnh sửa trên tế bào sinh dưỡng, chứ không phải tế bào trứng và tinh trùng. Những thay đổi này chỉ ảnh hưởng tới một số mô nhất định, chứ không truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác. Việc chỉnh sửa gen ở tế bào giao tử và phôi mang lại nhiều thách thức về đạo đức bao gồm cả những vấn đề liệu có thể sử dụng công nghệ này để chỉnh sửa và nâng cao những đặc tính bình thường cho con người hay không (như chiều cao hay trí thông minh).

Ngoài những vấn đề hạn chế về đạo đức nghiên cứu thì hệ thống CRISPR/Cas9 cũng có những hạn chế nhất định về hiệu quả chỉnh sửa của nó. Đó là tác dụng chỉnh sửa các vùng gen ngoài vùng gen đích (off-target effect). Nó có thể tạo ra các đột biến ngẫu nhiên, do đó có thể kích hoạt các gen ung thư, hoặc tác động tới các gen ức chế khối u, gây nên những hậu quả không mong muốn. Các nhà khoa học đã nỗ lực tìm kiếm những cách khác nhau như lựa chọn những vùng gen đích có tính đặc hiệu, tối ưu hóa trong thiết kế sgRNA, tối ưu hóa hoạt động của sgRNA và protein Cas9, sử dụng các kỹ thuật để kiểm tra những tác động ngoài mục tiêu... nhằm giải quyết nhược điểm này của hệ thống CRISPR/Cas9 [14].

#### IV. KẾT LUẬN

Hiện tại một số tác giả đã sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa vùng mã hóa các gen ung thư như gen CUL3, NF1, NF2, CDKN1A... gây ức chế ung thư, tăng cường hệ miễn dịch để chống ung thư bằng cách loại các gen ICP34.5, ICP6, E1A, PD1,

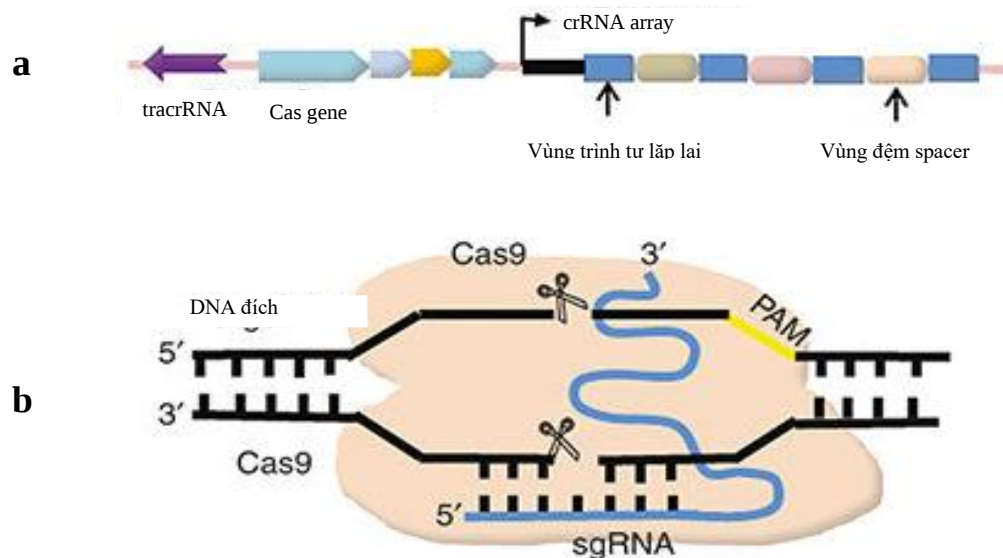
TRAC, B2M..., chèn thêm các gen interleukin, gen gây độc tế bào vào tế bào T để diệt tế bào ung thư. Ngoài ra một số tác giả còn dùng hệ thống CRISPR/Cas9 gây đột biến ở gen ung thư, phá vỡ chức năng của gen này hoặc dùng hệ thống này để tạo ung thư thực nghiệm dùng trong nghiên cứu. Kỹ thuật chỉnh sửa gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9 mang lại hiệu quả chỉnh sửa cao. Tuy nhiên các nghiên cứu mới thành công trên thực nghiệm. Cũng đã có nghiên cứu bắt đầu triển khai tới bước thử nghiệm lâm sàng. Chúng ta hy vọng sự tiến bộ không ngừng của công nghệ chỉnh sửa gen này sẽ góp phần vào cải tiến các phương pháp điều trị ung thư trong tương lai.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

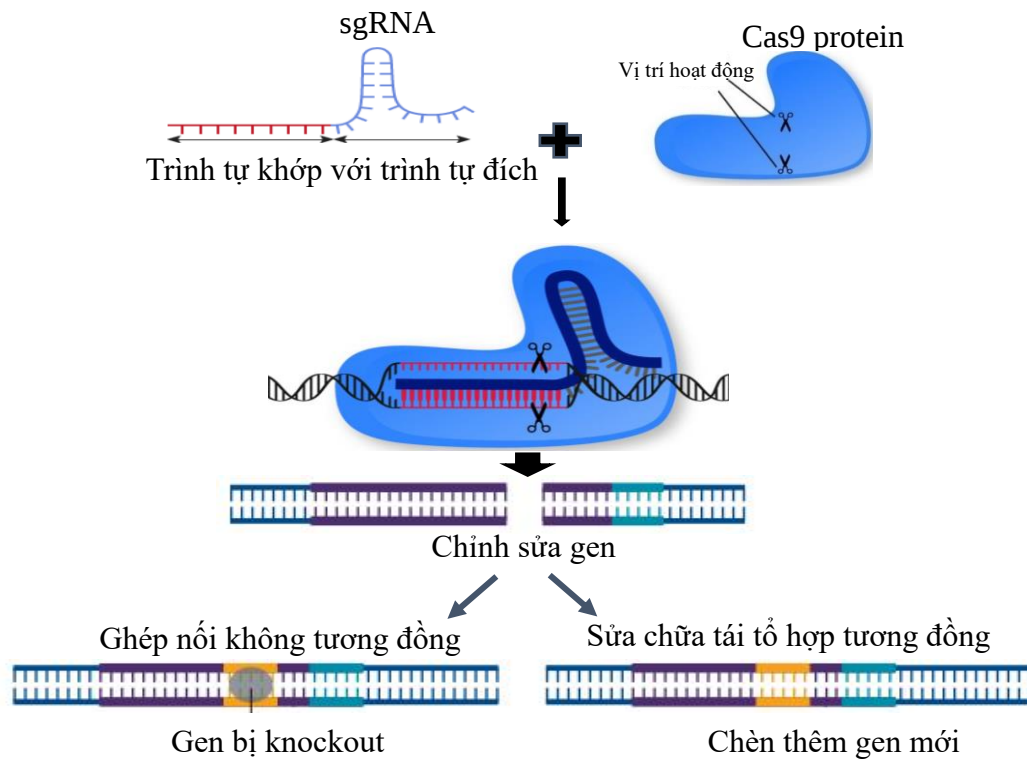
1. **Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M. & Nakata A (1987).** Nucleotide sequence of the IAP gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169, 5429-5433.
2. **Barrangou R. and Horvath P. (2017).** A decade of discovery: CRISPR functions and applications. *Nat. Microbiol.* 2, 17092.
3. **Sapranauskas R. et al (2011).** The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 39, 9275-9282.
4. **Jinek M. et al (2012).** A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-82.
5. **Gaj T., Sirk S.J., Shui S.L., Liu J. (2016).** Genome-Editing Technologies: Principles and Applications. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 8(12): a023754. doi:10.1101/cshperspect. a023754
6. **N.E. Sanjana, J. Wright, K. Zheng, O. Shalem, P. Fontanillas, J. Joung, C. Cheng,**

- A. Regev, F. Zhang (2016). High-resolution interrogation of functional elements in the noncoding genome, *Science* 353. 1545-1549, <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaf7613>.
7. S. Zhu, W. Li, J. Liu, C.H. Chen, Q. Liao, P. Xu, H. Xu, T. Xiao, Z. Cao, J. Peng, P. Yuan, M. Brown, X.S. Liu, W. Wei (2016). Genome-scale deletion screening of human long non-coding RNAs using a paired-guide RNA CRISPR-Cas9 library, *Nat. Biotechnol.* 34. 1279-1286, <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3715>
8. Goldsmith K., Chen W., Johnson D.C., Hendricks R.L. (1998). Infected cell protein (ICP)47 enhances herpes simplex virus neurovirulence by blocking the CD8+ T cell response. *J. Exp. Med.* 187, 341-348.
9. D. Cyranoski (2016). CRISPR gene-editing tested in a person for the first time, *Nature* 539. 479, <http://dx.doi.org/10.1038/nature.2016.20988>.
10. Suzuki K., Tsunekawa Y., Hernandez Benitez R. et al (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*. 540(7631):144.
11. Liu X.J., Zhang Y.P., Cheng C. et al (2017). CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. *Cell Res.* 27(1):154-157
12. Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol.* 2014;32(9):941-946. doi:10.1038/nbt.2951
13. Xue W, Chen S, Yin H et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*. 2014;514(7522):380-384. doi:10.1038/nature13589
14. Liu J., Zhou G., Zhang L. et al (2019). Building potent chimeric antigen receptor T cells with CRISPR genome editing. *Front Immunol.* 10:456.

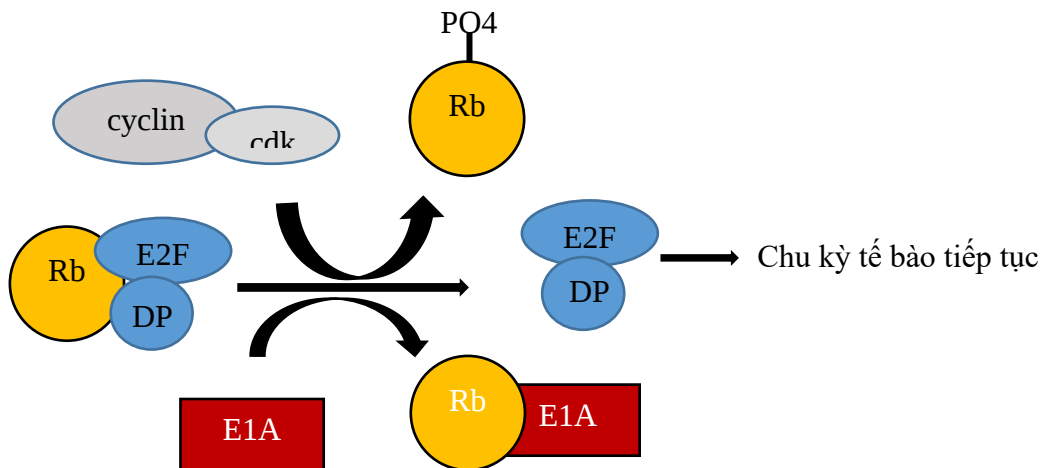
**Phụ lục:**



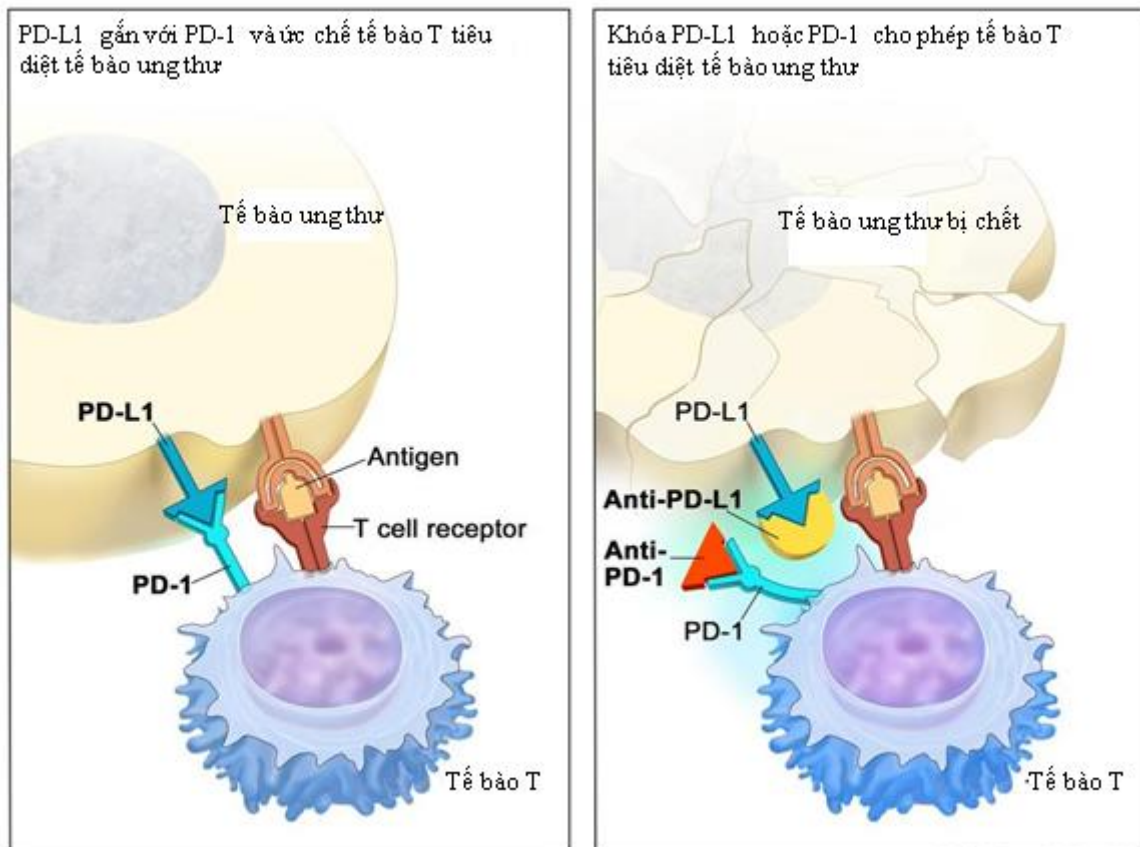
**Hình 1. Mô hình cấu trúc CRISPR ở *S. thermophiles*. (a) phân tử CRISPR, (b) vị trí cắt đặc hiệu trên phân tử DNA đích được xác định bởi đích bởi phân tử protein Cas9 và sg RNA**



**Hình 2. Mô hình hoạt động của hệ thống CRISPR/CAS9**



**Hình 3. Mô hình hoạt động của gen Rb và EA1 trong chu kỳ tế bào**



**Hình 4. Cơ chế hoạt động của PD-L1 và PD-1 trên tế bào lympho T**

## BÁO CÁO MỘT TRƯỜNG HỢP NHỒI MÁU CƠ TIM CẤP Ở BỆNH NHÂN TRẺ TUỔI CÓ TIỀN SỬ HUYẾT KHỐI TĨNH MẠCH NÃO - VAI TRÒ CỦA NHÂN TỐ DI TRUYỀN

Hoàng Bùi Hải\*, Bùi Thị Hoa\*\*,  
Lê Thị Minh Phương\*, Nguyễn Thị Trang\*

### TÓM TẮT

Các bệnh lý huyết khối thường gặp và có tỷ lệ tử vong cao: nhồi máu cơ tim, đột quỵ não, thuyên tắc phổi và thiếu máu cục bộ chi. Đây là bệnh lý đa nhân tố với sự đóng góp quan trọng của nhân tố di truyền. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với **Mục tiêu:** Đánh giá vai trò của yếu tố di truyền với cơ chế bệnh sinh, điều trị và tiên lượng của một trường hợp bệnh nhân mắc huyết khối phức tạp. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Báo cáo một trường hợp bệnh nhân trẻ tuổi, bệnh lý huyết khối phức tạp, có tiền sử gia đình nặng nề về bệnh lý huyết khối. Giải trình tự vùng mã hóa - phân tích đa hình gen liên quan đến bệnh lý huyết khối và gen kháng thuốc chống đông. Từ đó đưa ra liệu pháp điều trị chống đông phù hợp đồng thời tư vấn di truyền cho bệnh nhân và gia đình. **Kết quả:** Phát hiện các đột biến và đa hình gen PAI1, MTHFR, ITGA2, HRG, F2VKORC1 làm tăng nguy cơ huyết khối ở bệnh nhân và làm giảm đáp ứng với thuốc chống đông kháng vitamin K. **Kết luận:** Nhân tố di truyền đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh và làm phức tạp điều trị ở những bệnh nhân mắc đột biến gen.

**Từ khóa:** Huyết khối, yếu tố di truyền, PAI1, MTHFR, ITGA2, HRG, F2VKORC1.

### SUMMARY

#### REPORTED A CASE OF ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION IN YOUNG PATIENTS WITH A HISTORY OF CEREBRAL VENOUS THROMBOSIS - THE ROLE OF GENETIC FACTORS

Common and high mortality thromboembolic diseases: myocardial infarction, brain stroke, pulmonary embolism and limb ischemia. This is a multifactorial pathology with an important contribution of genetics. We conducted this study with **Objective:** To evaluate the role of genetic factors for the pathogenesis, treatment and prognosis of a complicated case of thrombosis. **Subjects and research methods:** Report a case of a young patient with complicated thrombotic disease, with a severe family history of thrombophilia. Whole exome sequencing (WES) - a method that helps find genetic polymorphisms related to thrombophlebitis and resistance genes. From there, giving appropriate anticoagulant therapy and genetic counseling for the patient and family. **Results:** Detection of mutations and gene polymorphism PAI1, MTHFR, ITGA2, HRG, F2VKORC1 increased the risk of thrombosis in patients. **Conclusion:** Genetic factors play an important role in pathogenesis and complicate treatment in patients with genetic mutations.

\*Trường đại học Y Hà Nội,

\*\*Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Trang

Email: trangnguyen@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 9.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 14.9.2020

Ngày duyệt bài: 18.11.2020

**Keywords:** Thrombosis, Genetic factor, PAI1, MTHFR, ITGA2, HRG, F2VKORC1

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Huyết khối được định nghĩa là một quá trình bệnh lý do một sự phát động và lan rộng bất hợp lý phản ứng đông, cầm máu của cơ thể dẫn đến hình thành cục máu đông trong lòng mạch máu, có thể xảy ra cả trong hệ thống động mạch và tĩnh mạch. Các bệnh lý huyết khối thường gặp và có tỷ lệ tử vong cao: Nhồi máu cơ tim, đột quỵ não, thuyên tắc phổi và thiếu máu cục bộ chi.

Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) năm 2015 có 15 triệu người chết do bệnh lý tim mạch, chiếm 1/3 tổng số ca tử vong, và chiếm 50% ngân sách y tế [1]. Tại Hoa Kỳ: năm 2016 tỷ lệ tử vong do bệnh mạch vành là 16,2%, mỗi 25 giây có một ca bị nhồi máu cơ tim cấp, mỗi 60 giây có một ca tử vong do bệnh mạch vành. Năm 2018, Hoa Kỳ có 7,8 triệu ca bị đột quỵ, số ca tử vong/100.000 dân là 44,9. Tại Anh mỗi năm có từ 25.000 – 32.000 người chết do huyết khối tĩnh mạch (VTE), chi phí điều trị lên đến 1,4 tỷ bảng Anh.

Tại Việt Nam, năm 2016 tỷ lệ tử vong do nhồi máu cơ tim cấp là 26,6%, mỗi năm cũng có gần 200.000 người mắc bệnh lý thuyên tắc huyết khối.

Như vậy bệnh lý huyết khối thực sự là một gánh nặng rất lớn đối với y tế của thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng.

Việc giải trình tự toàn bộ vùng gen mã hóa của loài người đã cho thấy khoảng 60% các bệnh lý huyết khối liên quan đến gen di truyền. Các đột biến gen mã hóa thường gặp: yếu tố V Leiden, Antithrombin III, Protien C, Protien S, yếu tố II G20210, MTHFR.

Trong thực hành lâm sàng chúng tôi luôn trăn trở khi nhận thấy có nhiều bệnh nhân trẻ

tuổi mắc bệnh lý huyết khối, kể cả khi bệnh nhân đang điều trị duy trì thuốc chống đông. Câu hỏi đặt ra là: Yếu tố di truyền đóng vai trò gì trong cơ chế bệnh sinh huyết khối ở những bệnh nhân này? Tác động của chúng lên hiệu quả điều trị thuốc chống đông và lựa chọn điều trị tối ưu cho những bệnh nhân như thế nào? Để trả lời các câu hỏi trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu:

*Đánh giá vai trò của yếu tố di truyền với cơ chế bệnh sinh, điều trị và tiên lượng của một trường hợp huyết khối phức tạp.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Đối tượng:** Báo cáo một trường hợp bệnh nhân trẻ tuổi, bệnh lý huyết khối phức tạp, có tiền sử gia đình nặng nề về bệnh lý huyết khối.

**2.2. Phương pháp nghiên cứu:** Mô tả một trường hợp bệnh.

**2.3. Xác định đột biến/đa hình gen liên quan đến bệnh lý huyết khối**

Giải trình tự vùng mã hóa - Whole exome sequencing (WES) - phân tích đa hình gen liên quan đến bệnh lý huyết khối và gen kháng thuốc chống đông. Từ đó đưa ra liệu pháp điều trị chống đông phù hợp đồng thời tư vấn di truyền cho bệnh nhân và gia hệ.

**2.4. Đạo đức nghiên cứu**

Bệnh nhân được giải thích về quyền lợi khi tham gia nghiên cứu và xác nhận đồng ý tham gia nghiên cứu. Thông tin của bệnh nhân được bảo mật tuyệt đối và chỉ phục vụ công tác nghiên cứu, không vì bất kì mục đích nào khác.

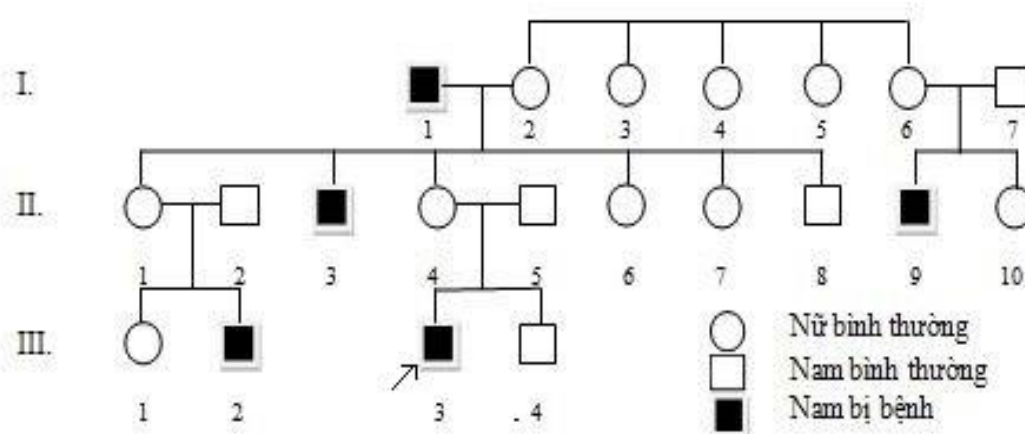
## III. KẾT QUẢ

**3.1. Báo cáo trường hợp lâm sàng**

Bệnh nhân nam 28 tuổi thuộc một gia hệ có nhiều người mắc bệnh lý huyết khối. Bệnh nhân có tiền sử bị huyết khối tĩnh

mạch não do giảm Protein C và Protein S cách 5 năm điều trị duy trì Acenocumarol (Sintrom). Trong 2 năm đầu bệnh nhân điều trị Sintrom liều 2mg-3mg ngày, duy trì INR 2-3. Trong 3 năm sau bệnh nhân tái khám không thường xuyên vẫn duy trì liều Sintrom

2mg-3mg và INR đạt: 0,94- 1,86. Cách vào viện 1 tuần bệnh nhân tự bỏ thuốc Sintrom do phải uống thuốc kháng sinh điều trị viêm mô tế bào ngón II tay phải. Bệnh nhân vào viện vì đau ngực trái giờ thứ 6.



**Hình 1. Sơ đồ gia hệ của bệnh nhân.**

#### Lâm sàng:

- Đau ngực trái, cảm giác đè ép, không lan.
- Không khó thở.
- Tim đều, phổi không ral.
- Ngón II tay phải không sưng đau.
- Mạch: 75 ck/p, HA: 140/70mmHg, Spo2: 98% (Khí trời).

#### Cận lâm sàng:

- Troponin vào viện: 129 ng/L, mẫu 2: 215 ng/L, mẫu 3: 2346 ng/L.
- CK: 409U/l, CK - MB: 31,4U/l, Triglycerid: 4,41 mmol/l, Cholesterol toàn phần: 6,81 mmol/l, LDL-C: 4,97 mmol/l.
- Đông máu cơ bản: INR: 1,01
- AT III: 88% (70-140%), Protien C:

154% (70-140), Protein S: 105,6% (70-140%).

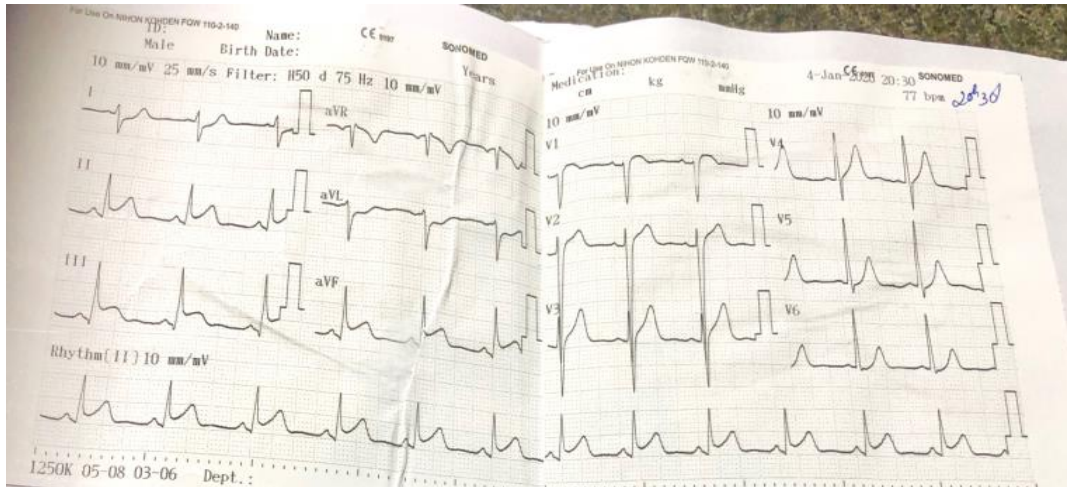
- Kháng thể kháng nhân: âm tính, kháng thể kháng dsDNA: Âm tính, kháng thể kháng Cardiolipin: âm tính, kháng thể kháng Phospholipit: Âm tính, kháng thể kháng Beta-2-Glycoprotein 1: Âm tính.

- Định lượng Folic: 5,2ng/mL (3,1-20,5ng/mL).

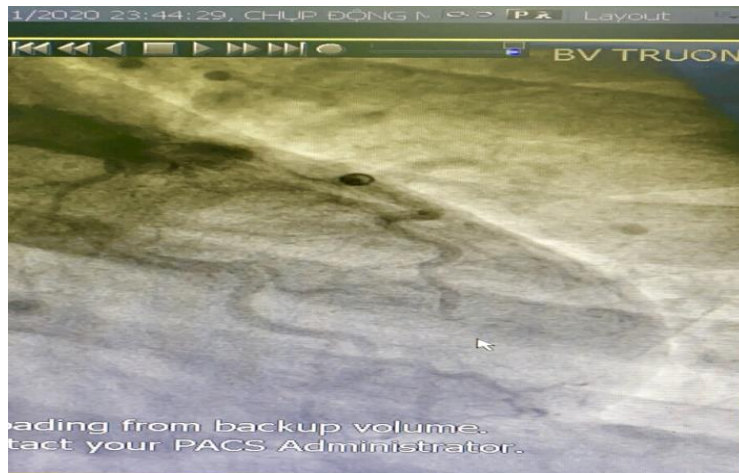
- Định lượng Homocysteine: 11,05  $\mu$ mol/ L (5,46-16,20 $\mu$ mol/L).

- Tổng phân tích tế bào máu: Hb: 163g/l, Tiểu cầu: 438G/L.

- Siêu âm tim: Không có rối loạn vận động vùng, không có huyết khối buồng tim, chức năng tâm thu thất trái trong giới hạn bình thường.



**Hình 2. Hình ảnh điện tâm đồ của bệnh nhân khi nhập viện: ST chênh DII, DIII, AVF**



**Hình 3. Hình chụp mạch vành: Tắc hoàn toàn đoạn xa LAD, hẹp 60-70% LAD1**

### 3.2. Giải trình tự vùng mã hóa các gen liên quan đến tăng đông máu

Giải trình tự vùng mã hóa (WES) là một ứng dụng của công nghệ giải trình tự thế hệ mới để xác định các biến thể trên tất cả các vùng mã hóa, hoặc exon của gen được biết đến. Kết quả thu được như sau:

| Gen          | Vị trí đột biến                                                                                                 | Nghiên cứu chứng minh vai trò của đột biến gen với bệnh huyết khối |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>MTHFR</b> | rs2066471, rs1801133, rs1994798, rs121221543, rs1801131, rs4846051, rs1476413, rs2077360, rs11559040, rs3737966 | Morita và cộng sự (1997), Schwartz và cộng sự (1997)               |
| <b>ITGA2</b> | rs1126643, rs1062535, rs2303127, rs3212538, rs2112290, rs984966, rs3212591, rs2303122                           | Santoso và cộng sự (1999) Von Beckerath và cộng sự (2000)          |

| Gen    | Vị trí đột biến              | Nghiên cứu chứng minh vai trò của đột biến gen với bệnh huyết khối                |
|--------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| HRG    | rs9898, rs7629680, rs1042464 | Houlihan và cộng sự (2010)<br>Luo và cộng sự (2018)                               |
| F2     | rs2070851, rs2070852, rs5896 | Martinelli và cộng sự (2000)<br>Miyawaki và cộng sự (2012)                        |
| F12    | rs183643295, rs17876029      | Endler và cộng sự (2001)                                                          |
| VKORC1 | rs8050894                    | Rieder và cộng sự (2005)<br>Wadelius và cộng sự (2005)<br>Limdi và cộng sự (2008) |

### 3.3. Chẩn đoán, điều trị

**Chẩn đoán:** Nhồi máu cơ tim cấp - Tắc hoàn toàn đoạn xa LAD, Hẹp 60-70% LAD1 do huyết khối/ Tiền sử huyết khối tĩnh mạch não do giảm Protein C và Protein S.

#### Điều trị:

- Hút huyết khối qua can thiệp mạch vành
- + Lovenox + Chống ngưng tập tiểu cầu kép
- + Statin.
- Duy trì: Xarelto 20mg/ngày.
- Bệnh nhân tái khám sau 1 tháng: Lâm sàng và xét nghiệm ổn định.

## IV. BÀN LUẬN

### Vai trò của các đột biến gen với sự hình thành huyết khối ở người trẻ tuổi

Vào năm 1962, báo cáo đầu tiên về những người mắc hội chứng tăng homocystein dễ mắc bệnh tim mạch nặng ở tuổi thiếu niên cho đến những năm 20 tuổi. Ở những bệnh nhân này, một enzyme bị lỗi dẫn đến sự tích lũy homocysteine trong máu đến mỗi nồng độ rất cao. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng nồng độ homocysteine cao là yếu tố nguy cơ phát triển xơ vữa động mạch và thuyên tắc động mạch cũng như tĩnh mạch [2].

Ở bệnh nhân của chúng tôi là bệnh nhân nam trẻ tuổi (hiện tại 28 tuổi) mắc bệnh lý

huyết khối từ rất sớm (23 tuổi). Bệnh nhân có tiền sử bị huyết khối tĩnh mạch não do giảm Protein C và Protein S cách 5 năm, điều trị duy trì Acenocumarol (Sintrom). Bệnh nhân thuộc một gia hệ có 5 người mắc, 2 người tử vong vì bệnh lý huyết khối. Kết quả giải trình tự gen cho thấy bệnh nhân có 5 gen bị đột biến làm tăng nguy cơ huyết khối, mỗi gen lại có nhiều đa hình bao gồm (PAI1 675 5G/4G, MTHFR, ITGA2, HRG, F2) và một gen kháng thuốc điều trị kháng Vitamin K (VKORC1).

Huyết khối tĩnh mạch thường là một tình trạng mãn tính, với tỷ lệ tái phát ước tính khoảng 5-7% hàng năm sau đợt đầu tiên. Nguy cơ dường như cao nhất trong vòng 6-12 tháng sau khi ngừng dùng kháng đông, bất kể thời gian dùng kháng đông ban đầu là bao nhiêu. Hron và cộng sự đã không thể chứng minh mối liên quan giữa tiền sử gia đình mắc bệnh huyết khối với nguy cơ tái phát huyết khối trong số 829 bệnh nhân không thiếu protein C, protein S hoặc antithrombin [3].

Người ta đã nhận ra rằng homocysteine cao có liên quan đến các đa hình di truyền trên gen MTHFR. Gen MTHFR nằm trên

1p36.22 mang thông tin quy định tổng hợp nên enzyme methylenetetrahydrofolate reductase. Enzyme này chuyển đổi một dạng folate là 5,10-methylenetetrahydrofolate thành một dạng folate khác là 5-methyltetrahydrofolate. Đây là dạng folate chính được tìm thấy trong máu và cần thiết cho quá trình chuyển đổi axit amin homocysteine thành một axit amin khác là methionine. Cơ thể sử dụng methionine để tạo ra protein và các hợp chất quan trọng khác. Khi thiếu hụt chức năng của gen MTHFR làm tăng homocystein, giảm acid folic trong máu gây ra rất nhiều các bệnh lý: huyết khối, homocystin niệu, dị tật ống thần kinh, sảy thai liên tiếp và rất nhiều rối loạn khác.

Hiện tại, gen MTHFR đã được ghi nhận có tới 64 đa hình, trong kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân tìm ra 10 đa hình trong đó C677T có vai trò quan trọng trong bệnh lý huyết khối. Theo các nghiên cứu, tỷ lệ gặp của đa hình C677T trong quần thể là 3,67%, trong đó có 28,7% gặp huyết khối tĩnh mạch, 12,9% đột quy và 0,07% bệnh mạch vành [4]. Miranda BAJ Keijzer và cộng sự xác định nguy cơ huyết khối tương đối đối với MTHFR C677T là 1,6 (95%CI: 1,1 - 2,4).

Gen PAI1 nằm trên 7q22.1 mã hóa chất ức chế hoạt hóa plasminogen nội mô. Khi có đột biến PAI1 nồng độ chất chức chế hoạt hóa plasminogen tăng, hậu quả là plasminogen không được hoạt hóa, làm suy giảm khả năng làm tan cục máu đông gây nên bệnh lý huyết khối. Gen PAI1 có 3 đa hình: PAI 4G/4G, PAI1 4G/5G, PAI1 5G/5G. Một phân tích tổng hợp 72 nghiên cứu trên 23.557 trường hợp cho thấy PAI1

4G/5G tìm thấy trên bệnh nhân làm tăng 20% nguy cơ bệnh mạch vành. Đây có thể là yếu tố nguy cơ mắc nhồi máu cơ tim của bệnh nhân.

Gen ITGA2 nằm trên 5q11.2 mã hóa integrin alpha-2, một glycoprotein màng được gọi là GP Ia, có ở nhiều loại tế bào trong đó có nguyên bào sợi và tiểu cầu. Trên màng tiểu cầu, GP Ia tạo thành phức hợp với GP IIa trở thành thụ thể xuyên màng của collagen. GP IIa có vai trò kích hoạt tiểu cầu, tăng kết dính tiểu cầu thông qua collagen từ đó kiểm soát sự hình thành huyết khối. Trong 9 đa hình tìm được của gen ITGA2 của bệnh nhân thì biến thể: ITGA2 C807T được ghi nhận có vai trò quan trọng nhất trong cơ chế hình thành huyết khối. Một nghiên cứu gộp 13 nghiên cứu trên 2.438 bệnh nhân đột quy Trung Quốc đã cho thấy tăng đáng kể nguy cơ đột quy ở bệnh nhân có đột biến ITGA2 C807T (12,4% - 15,9%). Santoro nghiên cứu trên 2.237 bệnh nhân chụp mạch vành vì bệnh lý tim mạch cho kết quả gặp đột biến ITGA2 C807T là 52,5%, đồng thời chứng minh được mối liên quan chặt chẽ giữa đột biến ITGA2 C807T với nhồi máu cơ tim, bệnh nhân càng trẻ tuổi nguy cơ càng tăng cao [4]. Như vậy đột biến ITGA2 C807T là một yếu tố nguy cơ dẫn tới biến cố nhồi máu cơ tim của bệnh nhân.

Gen HRG nằm trên 3q27. Bằng cách liên kết với plasminogen, protein HRG làm giảm lượng plasminogen có sẵn lưu thông trong máu do đó hoạt động như một chất ức chế phân hủy fibrin. Bằng cách liên kết với heparin, protein HRG làm giảm lượng heparin và thông qua cơ chế này làm giảm sự ức chế đông máu bởi phức hợp heparin-

antithrombin III. Vì cả hai tác dụng, khi nồng độ protein HRG tăng có thể gây huyết khối. Houlihan đã thực hiện một nghiên cứu trên 1.477 người trưởng thành cho thấy mối liên quan giữa aPTT và đa hình rs 9898 trong gen HRG của bệnh nhân, với mỗi alen T sẽ làm giảm aPTT bằng 0,26 SD. APTT rút ngắn có liên quan đến việc tăng nguy cơ huyết khối [5].

Gen F2 nằm trên 11p11.2 mã hóa yếu tố II - prothrombin, một glycoprotein phụ thuộc vitamin K được tổng hợp tại gan dưới dạng hoạt động. Hoạt động của các enzym thrombin đóng vai trò quan trọng trong cầm máu và huyết khối: nó chuyển fibrinogen thành fibrin, kích thích kết tập tiểu cầu, kích hoạt yếu tố V, VIII, XIII. Thrombin cũng ức chế đông máu bằng cách kích hoạt Protein C. Martineli đã chứng minh được rằng đột biến 20210G-A trong gen F2 có liên quan đến huyết khối tĩnh mạch não 'vô căn', tỷ lệ gặp 5-30% [6].

Hiện nay mới chỉ có các nghiên cứu đánh giá một cách riêng rẽ các đột biến làm tăng nguy cơ huyết khối ở bệnh nhân. Tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào đánh giá hậu quả của tổ hợp các đột biến gen đến sự hình thành huyết khối ở bệnh nhân, đặc biệt là những bệnh nhân trẻ tuổi như trong nghiên cứu này. Chúng tôi giả thuyết rằng, tương tác giữa các đột biến gen này làm tăng nguy cơ hình thành huyết khối gấp nhiều lần so với một đột biến gen riêng lẻ.

#### **Vai trò của đột biến gen VKORC1 với kháng thuốc chống đông kháng Vitamin K**

Trong quá trình điều trị thuốc chống đông kháng vitamin K Acenocumarol (Sintrom) mặc dù bệnh nhân tuân thủ hướng dẫn điều

trị nhưng cùng một liều thuốc trong 2 năm đầu bệnh nhân đáp ứng tốt, 3 năm sau lại không đạt đích điều trị. Kết quả giải trình tự gen cho thấy bệnh nhân có đột biến trong gen kháng thuốc điều trị kháng Vitamin K (VKORC1).

Gen VKORC1 nằm trên 16p11.2 mã hóa tiểu đơn vị C1 của phức hợp enzyme vitamin K epoxide reductase, là enzym xúc tác sự hạn chế trong tái hấp thu vitamin K, và là mục tiêu tác động của warfarin. Các đột biến gen ngăn chặn sự chuyển đổi Vitamin K thành dạng hoạt động do đó Vitamin K bị bất hoạt không thể tương tác với các yếu tố đông máu gây cản trở quá trình đông máu.

Kháng thuốc kháng vitamin K (AVK) được tìm thấy ở các bệnh nhân có đột biến gen VKORC1. Ở những bệnh nhân này, liều điều trị có thể lên đến 15-45mg warfarin/ngày tùy thuộc vào alen của gen VKORC1. Từ 2004: 11 đột biến VKORC1 khác nhau đã được báo cáo gây ra tình trạng kháng VAK. Trong số này, VKORC1 Asp36Tyr đã được báo cáo là một biến thể chuỗi thường gặp (80,2%) của tất cả các trường hợp đề kháng VAK được ghi nhận. Biến thể rs8050894 tìm được trên bệnh nhân mã hóa cho vùng gen điều hòa do đó không gây ảnh hưởng nhiều đến đề kháng VAK.

Tóm lại, nghiên cứu cho thấy tầm quan trọng của xét nghiệm di truyền tại những bệnh nhân huyết khối trẻ tuổi, nhất là ở những bệnh nhân có tiền sử gia đình. Đối với bản thân bệnh nhân, dựa vào kết quả xét nghiệm di truyền để chỉnh liều phù hợp cho từng bệnh nhân. Đây cũng là mục đích tối quan trọng trong y học cá thể hóa. Đối với các thành viên trong gia đình bệnh nhân, xét

nghiệm giúp chẩn đoán nguyên nhân sinh bệnh sớm ở bệnh nhân để dự phòng cho các thế hệ sau.

## V. KẾT LUẬN

Nhân tố di truyền đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh, điều trị bệnh lý huyết khối. Giải trình tự vùng mã hóa là phương pháp mới, có giá trị cao trong việc xác định đa hình của các gen huyết khối, gen kháng thuốc chống đông từ đó giúp các bác sỹ lâm sàng đưa ra phác đồ chẩn đoán và điều trị tốt nhất cho bệnh nhân.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO (2017). Cardiovascular diseases (CVDs). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
2. E. A. Varga, A. C. Sturm, C. P. Misita et al (2005). Homocysteine and MTHFR Mutations. *Circulation*, 111 (19), e289-e293.
3. G. Hron, S. Eichinger, A. Weltermann et al (2006). Family history for venous thromboembolism and the risk for recurrence. *Am J Med*, 119 (1), 50-53.
4. S. A. Santoro và M. M. Zutter (1995). The alpha 2 beta 1 integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost*, 74 (3), 813-821.
5. L. M. Houlihan, G. Davies, A. Tenesa et al (2010). Common variants of large effect in F12, KNG1, and HRG are associated with activated partial thromboplastin time. *Am J Hum Genet*, 86 (4), 626-631.
6. I. Martinelli, E. Sacchi, G. Landi et al (1998). High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med*, 338 (25), 1793-1797.

## XÁC ĐỊNH ĐA HÌNH MỘT SỐ GEN CHUYỂN HÓA XENOBIOTICS Ở BỆNH NHÂN VÔ SINH NAM

Trần Đức Phần<sup>1,2</sup>, Vũ Thị Huyền<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Trang<sup>1,2</sup>,  
Lương Thị Lan Anh<sup>1,2</sup>, Đoàn Thị Kim Phượng<sup>1,2</sup>, Nguyễn Hoài Bắc<sup>1,2</sup>,  
Nguyễn Thị Minh Ngọc<sup>2</sup>, Nguyễn Xuân Tùng<sup>1</sup>, Lê Đình Trung<sup>1,2</sup>

### TÓM TẮT

Hiện nay vẫn còn một tỷ lệ đáng kể vô sinh không rõ nguyên nhân. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy, xác định đa hình của các gen CYP1A1, GSTP1 và NAT2 có thể tìm được nguy cơ gây vô sinh nam, qua đó có biện pháp điều trị phù hợp. Vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm **mục tiêu**: (1) Xác định được đa hình của các gen chuyển hóa xenobiotics (CYP1A1, NAT2, GSTP1) ở người nam vô sinh. (2) Đánh giá mối liên quan giữa đa hình gen chuyển hóa xenobiotics với mức độ stress oxy hóa và đứt gãy DNA tinh trùng. **Phương pháp nghiên cứu** gồm: Xác định đa hình của 3 gen trên bằng kỹ thuật ARMS-PCR, đo mức độ oxy hóa trong tinh dịch và xác định mức độ đứt gãy DNA của tinh trùng. **Kết quả**: Các đa hình NAT2(481C>T), NAT2(590 G>A), GSTP1(313G>A), GSTP1(341C>T), CYP1A1 2455A>G ở nhóm vô sinh lần lượt là 52,0%, 63,5%, 53,6%, 46,4%, 57,1% trong khi nhóm chứng lần lượt là 13,0%, 21,7%, 5,2%, 5,2% và 20,0%. Xuất hiện 1 đa hình trên, nguy cơ vô sinh tăng 5,32 - 15,7 lần, xuất hiện 2 đa hình phối hợp, nguy cơ vô sinh tăng 9,2 - 63,7 lần. Có các đa hình trên nguy cơ bị stress oxy hóa trong tinh

dịch tăng, mức độ đứt gãy DNA của tinh trùng tăng. **Kết luận**: các đa hình NAT2(481C>T), NAT2(590 G>A), GSTP1(313G>A), GSTP1(341C>T), CYP1A1 2455A>G ở bệnh nhân vô sinh cao hơn ở nhóm chứng. Đa hình các gen trên làm tăng khả năng bị vô sinh, phối hợp các đa hình, khả năng vô sinh tăng, các đa hình trên làm tăng nguy cơ bị stress oxy hóa trong tinh dịch, tăng mức độ đứt gãy DNA của tinh trùng.

**Từ khóa**: vô sinh, xenobiotics, NAT2, GSTP1, CYP1A1, stress oxy.

### SUMMARY

#### DETERMINATION POLYMORPHISM OF SOME METABOLIZE XENOBIOTICS GENES IN MALE INFERTILITY

At present, there is still a number of unknown reason of infertility. Some recent studies show that polymorphism of the CYP1A1, GSTP1 and NAT2 genes can find the risk of male infertility, thereby giving appropriate treatment. Therefore, we conducted this study with 2 **objectives**: (1) Identify polymorphism of the genes that metabolize xenobiotics (CYP1A1, NAT2, GSTP1) in infertile men. (2) Identify the relative between the polymorphism of xenobiotics metabolism genes and the degree of oxidative stress and sperm DNA fracture. **Research methods** include: Determination of polymorphism of the above 3 genes by ARMS-PCR technique, measuring the level of oxidation in the semen and determining the level of DNA fracture of sperm. Results: NAT2(481C>T), NAT2(590G>A), GSTP1(313G>A),

<sup>1</sup>Đại học Y Hà Nội,

<sup>2</sup>Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Trần Đức Phần

Email: tranducphan@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 10.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 23.9.2020

Ngày duyệt bài: 18.11.2020

GSTP1(341C>T), CYP1A1 2455A>G polymorphisms in the infertility group were, respectively 52.0%, 63.5%, 53.6%, 46.4%, 57.1% while the control group were 13.0%, 21.7%, 5.2%, 5.2% and 20.0 respectively. Appearing 1 above polymorphism, the risk of infertility increased from 5.32 to 15.7 times, 2 polymorphisms, the risk of infertility increased 9.2 - 63.7 times. There are polymorphisms on the increased risk of oxidative stress in semen, and increased sperm DNA fracture levels. **Conclusions:** polymorphisms NAT2(481C>T), NAT2(590 G>A), GSTP1(313G>A), GSTP1(341C>T), CYP1A1(2455A>G) were higher in infertility patients than in the control group. The polymorphism of these genes increases the risk of infertility, the above polymorphisms increase the risk of oxidative stress in the semen, increase the level of DNA fracture of sperm.

**Key words:** infertility, xenobiotics, NAT2, GSTP1, CYP1A1, oxidative stress.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vô sinh có xu hướng ngày càng tăng. Theo tổ chức Y tế Thế giới, 10% - 15% các cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh sản bị vô sinh, trong đó khoảng 30% - 40% nguyên nhân do nam giới, 40% do nữ giới, 10% do cả nam và nữ, 10% không rõ nguyên nhân.

Đã có nhiều nghiên cứu ở mức độ phân tử để chỉ ra mối liên quan giữa gen và vấn đề vô sinh. Những gen đang được nghiên cứu gần đây là CYP1A1, GSTP1 và NAT2, đây là các gen mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình chuyển hóa, đào thải các xenobiotics, trong đó có các chất gây vô sinh ở nam giới. Khi các gen này bị đột biến sẽ làm rối loạn chức năng của enzym giải độc gây ra một số bệnh mãn tính trong đó có ung thư và vô sinh ở nam giới.

Tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào đánh giá sự tác động của các gen này. Vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm góp phần chẩn đoán nguyên nhân vô sinh nam từ đó đưa ra hướng điều trị, nâng cao hiệu quả chăm sóc sức khỏe sinh sản nam giới. Đề tài thực hiện nhằm 2 mục tiêu:

1. *Xác định được đa hình của các gen chuyển hóa xenobiotics (CYP1A1, NAT2, GSTP1) ở người nam vô sinh.*
2. *Đánh giá mối liên quan giữa đa hình gen chuyển hóa xenobiotics với mức độ stress oxy hóa và đứt gãy DNA tinh trùng.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Đây là nghiên cứu mô tả cắt ngang có đối chứng.

Đối tượng nghiên cứu là những người nam trong độ tuổi sinh sản, vô sinh không rõ nguyên nhân, không có tinh trùng hoặc ít tinh trùng (< 5 triệu/ml) hoặc/và tinh trùng di động kém được xét nghiệm tinh dịch đồ tại trung tâm Tư vấn di truyền, bệnh viện Đại học Y Hà Nội, từ 2017- 2019.

### 2.2 Nghiên cứu của chúng tôi tiến hành với nhóm bệnh là 233 và nhóm chứng 115.

Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu gồm:

- Xác định các đa hình gen chuyển hóa xenobiotics bằng kỹ thuật ARMS-PCR
- Đánh giá mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch bằng bộ kit Oxisperm (Halotech, Tây Ban Nha).
- Xác định tỷ lệ đứt gãy DNA tinh trùng bằng kỹ thuật Halosperm

Về đạo đức trong nghiên cứu: nghiên cứu nằm trong đề tài cấp Bộ: “Nghiên cứu xác định đột biến/đa hình một số gen chuyển hóa xenobiotics ứng dụng trong chẩn đoán vô

sinh nam”, đã được thông qua và chấp thuận của hội đồng đạo đức trường Đại học Y Hà Nội. Kết quả nghiên cứu chỉ sử dụng để tư vấn cho bệnh nhân và dung trong nghiên cứu này, không dung cho bất kỳ mục đích nào khác.

### III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Biến đổi nucleotid của các gen NAT2, GSTP1, CYP1A1

##### 3.1.1. Kết quả nghiên cứu đa hình gen NAT2

**Bảng 3.1. Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình NAT2 481C>T**

| Kiểu gen của NAT2(481C>T) |   | Kiểu gen |       | $\chi^2$ | p          | OR(95%CI)            |
|---------------------------|---|----------|-------|----------|------------|----------------------|
|                           |   | CC       | CT+TT |          |            |                      |
| Nhóm chứng (115)          | n | 100      | 15    |          |            |                      |
|                           | % | 87,0     | 13,0  |          |            |                      |
| Nhóm azo (130)            | n | 60       | 70    | 44,84    | $10^{-10}$ | 7,78<br>(4,09-14,79) |
|                           | % | 46,2     | 53,8  |          |            |                      |
| Nhóm bất thường (103)     | n | 52       | 51    | 34,24    | $10^{-8}$  | 6,54<br>(3,36-12,73) |
|                           | % | 50,5     | 49,5  |          |            |                      |
| Tổng nhóm bệnh (233)      | n | 112      | 121   | 48,91    | 0,00000    | 7,2<br>(3,95-13,13)  |
|                           | % | 48,0     | 52,0  |          |            |                      |

Bảng 3.1 cho thấy: Nhóm chứng: tỷ lệ mang gen dị hợp tử CT là 13,0%; Nhóm bệnh chung tỷ lệ này là 52,0%. Người mang kiểu gen CT/TT khả năng bị vô tinh tăng lên 7,78 lần, khả năng bị thiếu tinh nặng, hoặc /và tinh trùng di động kém tăng lên 6,54 lần.

**Bảng 3.2. Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình NAT2 590G>A**

| Kiểu gen của NAT2(590G>A) |   | Kiểu gen |       | $\chi^2$ | p         | OR(95%CI)            |
|---------------------------|---|----------|-------|----------|-----------|----------------------|
|                           |   | GG       | GA+AA |          |           |                      |
| Nhóm chứng (115)          | n | 90       | 25    |          |           |                      |
|                           | % | 78,3     | 21,7  |          |           |                      |
| Nhóm azo (130)            | n | 48       | 82    | 42,39    | $10^{-7}$ | 6,15<br>(3,48-10,86) |
|                           | % | 36,9     | 63,1  |          |           |                      |
| Nhóm bất thường (103)     | n | 37       | 66    | 40,05    | $10^{-9}$ | 6,42<br>(3,53-11,69) |
|                           | % | 35,9     | 64,1  |          |           |                      |
| Tổng nhóm bệnh (233)      | n | 85       | 148   | 53,76    | 0,00000   | 6,27<br>(3,74-10,51) |
|                           | % | 36,5     | 63,5  |          |           |                      |

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy: Nhóm vô tinh: Kiểu gen có GA+AA là 63,1%. Nhóm thiếu tinh nặng hoặc/và di động kém: kiểu có đa hình GA+AA là 64,1%. Trong khi nhóm chứng chỉ xuất hiện dị hợp tử đa hình GA là 21,7%. Người mang kiểu gen GA/AA khả năng bị vô tinh tăng lên 6,15 lần, khả năng bị thiếu tinh nặng, hoặc /và tinh trùng di động kém tăng lên 6,42 lần.

### 3.2.2. Kết quả nghiên cứu đa hình gen GSTP1

**Bảng 3.3. Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình GSTP1 313G>A**

| Kiểu gen của GSTP1(313G>A) |   | Kiểu gen |       | $\chi^2$ | p          | OR(95%CI)             |
|----------------------------|---|----------|-------|----------|------------|-----------------------|
|                            |   | GG       | GA+AA |          |            |                       |
| Nhóm chứng (115)           | n | 109      | 6     |          |            |                       |
|                            | % | 94,8     | 5,2   |          |            |                       |
| Nhóm azo (130)             | n | 58       | 72    | 65,77    | $10^{-10}$ | 22,55<br>(9,25-55,01) |
|                            | % | 44,6     | 55,4  |          |            |                       |
| Nhóm bất thường (103)      | n | 50       | 52    | 34,89    | $10^{-7}$  | 9,76<br>(3,9-24,4)    |
|                            | % | 48,5     | 51,5  |          |            |                       |
| Tổng nhóm bệnh (233)       | n | 108      | 125   | 49,15    | 0,0000     | 15,7<br>(6,63-37,14)  |
|                            | % | 46,4     | 53,6  |          |            |                       |

Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy: Nhóm vô tinh: kiểu gen dị hợp tử đa hình GA là 55,4%. Nhóm thiếu tinh nặng hoặc/và di động kém: kiểu gen có đa hình GA+AA là 35,0%. Trong khi nhóm chứng chỉ xuất hiện dị hợp tử đa hình GA là 5,2%. Người mang kiểu gen đa hình GA/AA khả năng bị vô tinh tăng 22,55 lần, nhóm thiếu tinh nặng hoặc/và độ di động kém tăng 9,76 lần.

**Bảng 3.4. Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình GSTP1341C>T**

| Kiểu gen của GSTP1(341C>T) |   | Kiểu gen |       | $\chi^2$ | p                  | OR(95%CI)             |
|----------------------------|---|----------|-------|----------|--------------------|-----------------------|
|                            |   | CC       | CT+TT |          |                    |                       |
| Nhóm chứng (115)           | n | 109      | 6     |          |                    |                       |
|                            | % | 94,8     | 5,2   |          |                    |                       |
| Nhóm azo (130)             | n | 58       | 72    | 70,77    | 0,000000           | 22,55<br>(9,25-55,01) |
|                            | % | 44,6     | 55,4  |          |                    |                       |
| Nhóm bất thường (103)      | n | 67       | 36    | 30,88    | $2 \times 10^{-7}$ | 9,76<br>(3,9-24,4)    |
|                            | % | 65,0     | 35,0  |          |                    |                       |
| Tổng nhóm bệnh (233)       | n | 125      | 108   | 59,15    | 0,0000000          | 15,7<br>(6,63-37,14)  |
|                            | % | 53,6     | 46,4  |          |                    |                       |

Kết quả ở bảng 3.5 cho thấy: Nhóm vô tinh: kiểu gen có đa hình CT+TT là 55,4%. Nhóm thiếu tinh nặng hoặc/và di động kém: kiểu gen có đa hình CT+TT là 35,0%. Trong khi nhóm chứng chỉ xuất hiện dị hợp tử đa hình CT là 5,2%. Người có kiểu gen đa hình CT/TT, khả năng bị vô tinh tăng 22,55 lần, khả năng bị thiếu tinh nặng hoặc/và tinh trùng di động kém tăng 9,76 lần.

### 3.2.3. Kết quả nghiên cứu đa hình gen CYP1A1

**Bảng 3.5. Kết quả phân tích kiểu gen của đa hình CYP1A1 2455A>G**

| Kiểu gen của CYP1A1(2455A>G) |   | Kiểu gen |       | $\chi^2$ | p          | OR(95%CI)           |
|------------------------------|---|----------|-------|----------|------------|---------------------|
|                              |   | AA       | AG+GG |          |            |                     |
| Nhóm chứng (115)             | n | 92       | 23    |          |            |                     |
|                              | % | 80,0     | 20,0  |          |            |                     |
| Nhóm azo (130)               | n | 51       | 79    | 41,74    | $10^{-10}$ | 6,2<br>(3,48-11,03) |
|                              | % | 39,2     | 60,8  |          |            |                     |
| Nhóm bất thường (103)        | n | 49       | 54    | 25,01    | $10^{-6}$  | 4,41<br>(2,42-8,02) |
|                              | % | 47,6     | 52,4  |          |            |                     |
| Tổng nhóm bệnh (233)         | n | 100      | 133   | 42,81    | $10^{-10}$ | 5,32<br>(3,15-9)    |
|                              | % | 42,9     | 57,1  |          |            |                     |

Bảng 3.5 cho thấy: Nhóm vô tình: kiểu gen có đa hình GA+GG là 60,8%. Nhóm thiếu tình nặng hoặc/và di động kém: kiểu gen có đa hình GA+GG là 52,4%. Trong khi nhóm chứng chỉ xuất hiện dị hợp tử đa hình GA là 20,0%. Người có kiểu gen AG/GG khả năng vô tình tăng 6,2 lần, khả năng thiếu tình nặng hoặc/và tình trùng di động kém tăng 4,41 lần.

### 3.2.4. Sự phối hợp các đa hình gen GSTP1, NAT2, CYP1A1 trong vô sinh nam

**Bảng 3.6. Sự phối hợp của các đa hình và khả năng vô sinh**

| TT | Các đa hình phối hợp             | Số lần tăng nguy cơ vô sinh |
|----|----------------------------------|-----------------------------|
| 1  | NAT2(481C>T) và GSTP1(313G>A)    | 2,8 - 15,4                  |
| 2  | NAT2(481C>T) và GSTP1(341C>T)    | 3,7 - 29,2                  |
| 3  | NAT2(590G>A) và GSTP1(313G>A)    | 2,3 - 14,3                  |
| 4  | NAT2(590G>A) và GSTP1(341C>T)    | 2,17 - 63,7                 |
| 5  | NAT2(481C>T) và CYP1A1(2455A>G)  | 1,9 - 11,6                  |
| 6  | NAT2(590A>G) và CYP1A1(2455A>G)  | 1,2 - 12,4                  |
| 7  | GSTP1(313G>A) và CYP1A1(2455A>G) | 1,9 - 15,4                  |
| 8  | GSTP1(341C>T) và CYP1A1(2455A>G) | 2,3 - 20,8                  |

### 3.3. Mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch

**Bảng 3.7. Phân bố các mức độ OS trên người có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics và người không có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics**

| Nhóm                                            |                | HOS         | LOS      |
|-------------------------------------------------|----------------|-------------|----------|
| Có đa hình gen xeno (Nhóm bệnh) (n=101)         | n <sub>1</sub> | 66          | 35       |
|                                                 | %              | 65,3        | 34,7     |
| Không có đa hình gen xeno (Nhóm chứng) (n = 56) | n <sub>2</sub> | 3           | 53       |
|                                                 | %              | 5,4         | 94,6     |
| p                                               |                | <0,001      |          |
| OR                                              |                | 33,31       | 0,03     |
| (95% CI)                                        |                | 9,71-114,35 | 0,01-0,1 |

Kết quả ở bảng 3.7 cho thấy:

Ở nhóm có ít nhất 1 đa hình gen chuyển hóa xenobiotics, mức oxy hóa cao (HOS) là 65,3%. Ngược lại, ở nhóm chứng, tỷ lệ người có mức oxy hóa cao chỉ chiếm 5,4%.

Những nam giới vô tinh có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics, có nguy cơ tăng mức độ stress oxy hóa hơn những người bình thường 33,31 lần.

➤ **Mối liên quan giữa mức độ stress oxy hóa và số lượng đa hình gen chuyển hóa xenobiotics ở nhóm bệnh**

**Bảng 3.8. Sự phân bố mức oxy hóa tinh dịch ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh theo số lượng đa hình gen chuyển hóa xenobiotics**

| Số lượng đa hình | Nhóm HOS       |      | Nhóm LOS       |      | P     | OR (95% CI)       |
|------------------|----------------|------|----------------|------|-------|-------------------|
|                  | n <sub>1</sub> | %    | n <sub>2</sub> | %    |       |                   |
| 1                | 5              | 45,5 | 6              | 54,5 | <0,05 | 2,52(1,71 - 8,96) |
| > 2              | 61             | 67,8 | 29             | 32,2 |       |                   |
| <b>Tổng</b>      | <b>66</b>      |      | <b>35</b>      |      |       |                   |

Kết quả ở bảng 3.8 cho thấy:

- Những người chỉ có 1 đa hình có mức oxy hóa cao là 5/11, mức oxy hóa thấp là 6/11, có từ 2 đa hình trở lên có 67,8% có mức oxy hóa cao.

- Những người có từ 2 đa hình gen chuyển hóa xenobiotics trở lên thì nguy cơ bị stress oxy hóa ở mức cao tăng 2,52 lần so người có 1 đa hình.

### 3.4. Mức độ đứt gãy DNA tinh trùng

**Bảng 3.9. DFI ở người nam có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics**

| Mức DFI (%) | Nhóm bệnh (n = 89) |      | Nhóm chứng (n = 56) |      | $\chi^2$ (p)    | OR    | (95% CI)   |
|-------------|--------------------|------|---------------------|------|-----------------|-------|------------|
|             | n <sub>1</sub>     | %    | n <sub>2</sub>      | %    |                 |       |            |
| DFI<15      | 8                  | 9,0  | 40                  | 71,4 | 63,48 (p<0,001) | 0,04  | 0,02-0,10  |
| 15<DFI<30   | 53                 | 59,6 | 15                  | 26,8 |                 | 4,02  | 1,94-8,33  |
| DFI>30      | 28                 | 31,5 | 1                   | 1,8  |                 | 25,25 | 3,32-191,8 |

Bảng 3.9 cho thấy: những người có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics: 31,5% có mức độ đứt gãy DNA cao; 59,6% đứt gãy DNA ở mức độ trung bình.

## IV. BÀN LUẬN

### 4.1. Về các biến đổi nucleotid của các gen chuyển hóa xenobiotics

Về đa hình NAT2 481C>T: nghiên cứu của chúng tôi thấy kiểu gen CT chủ yếu có ở nhóm vô tinh và thiếu tinh hoặc/và tinh trùng di động kém, người vô tinh khả năng mang kiểu gen này cao gấp 7,78 lần, nhóm thiếu tinh nặng hoặc/và tinh trùng di động kém cao

gấp 6,54 lần, khác biệt với nhóm chứng với p<0,001. Với đa hình NAT2 590G>A, kiểu gen có đa hình (GA/AA) chủ yếu gặp ở nhóm vô tinh (63,1%) và nhóm thiếu tinh nặng hoặc/và di động kém (64,1%), trong khi nhóm chứng chỉ là 21,7%. Người mang kiểu gen GA/AA khả năng bị vô tinh tăng lên 6,15 lần, khả năng bị thiếu tinh nặng, hoặc /và tinh trùng di động kém tăng lên 6,42 lần.

Theo Yarosh và cs (2014) [6], đa hình gen NAT2(590G>A) và NAT2(481C>T) làm tăng tính nhạy cảm dẫn đến vô sinh nam khi có sự tiếp xúc với các chất oxy hóa như: khói thuốc lá (OR = 1,7; 95%CI = 1,02 - 2,87; p = 0,042), uống rượu (OR = 2,14; 95%CI = 1,08 - 4,27; p = 0,029), lượng thức ăn ít chất xơ (OR = 1,68; 95%CI = 1,01 - 2,79; p = 0,04). Yarosh giả định lạm dụng rượu và chất độc trong khói thuốc lá tác động lên những cơ thể mang đa hình gen NAT2(590G>A) và NAT2(481C>T) sẽ sản xuất nhiều gốc oxy hóa với nồng độ cao hơn, do đó làm tăng khả năng vô sinh nam [6].

Như vậy nghiên cứu của chúng tôi về đa hình NAT2(481C>T) và NAT2(590G>A) tương tự như với kết quả của Yarosh và cộng sự.

Về đa hình GSTP1 313G>A và GSTP1 341C>T: theo nhiều tác giả, alen Val105 liên quan đến sự giảm khả năng chịu nhiệt và hoạt tính enzym trong chuyển hóa các xenobiotics khác nhau. Người mang alen Val105 gen GSTP1 có thể có nguy cơ vô sinh và dễ mắc các ung thư. Mặt khác, sự giảm hoạt tính enzym GSTP1 liên quan đến sự có mặt của alen Val105, sẽ làm tăng sự tổng hợp các gốc tự do. Kết quả sẽ gây nên stress oxy hóa và làm tổn thương không chỉ tế bào sinh tinh, mà còn các tế bào tham gia vào quá trình thuần thực và phân hóa của tinh trùng.

Kết quả của chúng tôi cho thấy tỷ lệ genotypes đa hình (dị hợp CT) ở nhóm vô tinh lớn hơn nhóm chứng, p<0,001; nhóm thiếu tinh nặng hoặc vô di động tinh trùng kém, với kiểu gen dị hợp tử CT cũng cao hơn nhiều so với nhóm chứng (p<0,001). Kiểu gen đa hình của gen GSTP1 tại vị trí 341 làm tăng nguy cơ bị vô tinh lên 22,55 lần, tăng

nguy cơ thiếu tinh nặng hoặc/và độ di động tinh trùng kém lên 9,76 lần.

Về đa hình gen CYP1A1 (2555G>A): nghiên cứu của chúng tôi cho thấy: nhóm vô tinh, thiếu tinh nặng hoặc/và di động kém có đa hình thể dị hợp (AG) là 59,2% và 47,5%, đa hình đồng hợp (GG) là 1,5% và 4,8%. Trong khi đó ở nhóm chứng có 20,0% có kiểu gen dị hợp tử (AG), 80,0% có kiểu gen bình thường (AA) và không có trường hợp đồng hợp từ đa hình.

Theo nghiên cứu của Yarosh S.L. (2013), nguy cơ vô sinh tăng lên đáng kể ở những nam mang kiểu gen 2455A>G gen CYP1A1 khi có kèm theo hút thuốc lá (OR = 1,91; 95%CI = 1,01-3,59) [7]. Một số tác giả khác cũng cho thấy đa hình gen CYP1A1 ở một vài vị trí nhưng chủ yếu là ở vị trí 2455 và làm tăng khả năng bị vô sinh.

Như vậy nghiên cứu của chúng tôi có sự tương đồng với nghiên cứu của Aydos S.E. (2009) [2], Yarosh S.L. (2013) [7] khi cho rằng đa hình 2455A>G gen CYP1A1 làm tăng nguy cơ vô sinh ở nam giới. Hậu quả làm giảm hoạt tính và tính cảm ứng của enzym CYP1A1.

Nghiên cứu về tác động cộng gộp của các đột biến gen NAT2, GSTP1 và CYP1A1 chúng tôi thấy nguy cơ vô sinh đều tăng hơn so với chỉ mang một đột biến/đa hình.

Một số tác giả cho thấy đa hình CYP1A1 2455A>G làm tăng hoạt tính của enzym, kết hợp với đa hình NAT2 có kiểu hình acetylator chậm, dẫn đến làm tăng nhanh các sản phẩm chuyển hóa trung gian có tính oxy hóa cao ở giai đoạn I và tích tụ tại giai đoạn II của chuyển hóa gây ra các đột biến gây bệnh trong đó có làm giảm chất lượng tinh trùng [3], [9]. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy đa hình của gen CYP1A1, NAT2 có liên

quan với vô sinh ở nam giới. Tỷ lệ đột biến gen càng nhiều thì nguy cơ vô sinh càng cao.

Xue Kun Huang và cs (2017), Safarinejad M. R. Và cs (2012) nghiên cứu đa hình gen GSTP ở nam giới vô sinh và thấy: các gen đa hình phối hợp với nhau sẽ làm tăng nguy cơ gây vô sinh [5], [8].

#### **4.2. Về mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch và mức độ đứt gãy DNA của tinh trùng ở bệnh nhân nam có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics**

##### **Về mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch**

Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy OS làm suy yếu chức năng của tinh trùng và đóng một vai trò quan trọng trong bệnh học về sự khiếm khuyết của tinh trùng. Điều này có thể dẫn tới việc vô sinh nguyên phát ở nam giới thông qua cơ chế liên quan đến việc gây ra tổn thương màng tế bào.

Trong nghiên cứu của chúng tôi: Ở nhóm bệnh, tỷ lệ bệnh nhân có mức OS cao (HOS) là 66,0% và tỷ lệ bệnh nhân có mức OS thấp (LOS) là 34,0%. Ngược lại, ở nhóm chứng, tỷ lệ bệnh nhân có mức OS cao (HOS) chỉ chiếm 10,7%, trong khi đó tỷ lệ bệnh nhân có mức OS thấp là 89,3%. Những nam giới vô sinh có đột biến gen chuyển hóa xenobiotics, có nguy cơ mức độ stress oxy hóa cao hơn những người bình thường 10,3 lần (OR = 10,3, 95% CI = 5,07-20,94),  $p < 0,01$ .

Nghiên cứu của Valeria M.I. và cs (2015) ở 56 bệnh nhân nam giới vô sinh, cho thấy: nhóm HOS chiếm 51,8% và nhóm LOS chiếm 48,2% [4].

Nghiên cứu của Aida Pujol và cs (2016) ở nam giới vô sinh cho thấy: mức OS 1 là 25%, mức OS 2 là 30,3%, mức OS 3 là 43,2% và mức OS 4 là 1,5% [1].

Như vậy kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng giống với một số tác giả khác đều cho

thấy mức độ OS hoặc ROS ở nhóm bệnh cao hơn nhóm chứng có ý nghĩa thống kê.

##### **Về mức độ đứt gãy DNA của tinh trùng**

Nghiên cứu của Irvine cho thấy các thông số tinh dịch đặc biệt là mật độ tinh trùng có mối tương quan nghịch với tỷ lệ đứt gãy DNA tinh trùng.

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy: những người có từ 1 đa hình gen chuyển hóa xenobiotics trở lên có nguy cơ bị đứt gãy DNA của tinh trùng ở mức 2 cao gấp 4,02 lần, có nguy cơ bị đứt gãy DNA của tinh trùng ở mức 3 (DFI>30%) cao gấp 25,25 lần so với người không có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics. Kết quả nghiên cứu này là phù hợp với nghiên cứu của các tác giả khác.

Ngày nay, nhiều tác giả xác định đa hình gen chuyển hóa xenobiotics, xác định mức độ đứt gãy DNA tinh trùng và xác định mức stress oxy hóa trong tinh dịch qua đó chọn ra các thuốc chống oxy hóa thích hợp cho điều trị, tăng hiệu quả của điều trị vô sinh.

## **V. KẾT LUẬN**

### **1. Biến đổi nucleotid của các gen CYP1A1, NAT2, GSTP1**

Các đa hình NAT2(481C>T), NAT2(590 G>A), GSTP1(313G>A), GSTP1(341C>T), CYP1A1 2455A>G ở nhóm vô sinh lần lượt là 52,0%, 63,5%, 53,6%, 46,4%, 57,1% trong khi nhóm chứng lần lượt là 13,0%, 21,7%, 5,2%, 5,2% và 20,0%.

### **2. Liên quan giữa đa hình gen GSTP1, NAT2, CYP1A1 với vô sinh nam**

- Gen NAT2: Có đa hình NAT2(481C>T) làm tăng nguy cơ vô sinh nam lên 7,2 lần; có đa hình NAT2 590 G>A làm tăng nguy cơ vô sinh nam lên 6,27 lần.

- Gen GSTP1: có đa hình GSTP1(313G>A) làm tăng nguy cơ vô sinh nam lên 7,16 lần; Có đa hình GSTP1

341C>T làm tăng nguy cơ vô sinh nam 15,7 lần.

- Gen CYP1A1: có đa hình CYP1A1(2455A>G) làm tăng khả năng vô sinh lên 5,32 lần.

- Kết hợp 2 đa hình GSTP1 và NAT2: nguy cơ bị vô sinh tăng 13,84 đến 63,7 lần.

- Kết hợp 2 đa hình CYP1A1 và NAT2: nguy cơ bị vô sinh tăng 9,2 đến 10 lần.

- Kết hợp 2 đa hình GSTP1 và CYP1A1: nguy cơ bị vô sinh tăng 13,5 đến 13,9 lần

### **3. Mức độ stress oxy hóa trong tinh dịch và đa hình gen chuyển hóa xenobiotics**

- Nam giới có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics, có nguy cơ bị stress oxy hóa ở mức cao, nhiều hơn những nam giới bình thường 33,31 lần.

- Người có từ 2 đa hình gen chuyển hóa xenobiotics trở lên, nguy cơ bị stress oxy hóa ở mức cao tăng 2,52 lần so người có 1 đa hình.

### **4. Mức độ đứt gãy DNA ở người nam có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics**

Những người có từ 1 đa hình gen chuyển hóa xenobiotics trở lên có đứt gãy DNA ở mức 2 cao gấp 4,02 lần, ở mức 3 cao gấp 25,25 lần so với người không có đa hình gen chuyển hóa xenobiotics.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Aida Pujol, A. Obradors, E. Esteo et al (2016). "Oxidative stress level in fresh ejaculate is not related to semen parameters or to pregnancy rates in cycles with donor oocytes", J Assist Reprod Genet, 33(4), tr. 529-34.
2. Aydos S.E., Taspinar M., Sunguroglu A., Aydos K. (2009). Association of CYP1A1 and glutathione S-transferase polymorphisms with male factor infertility. Fertil. Steril. 92, 541- 547.
3. Mohammad Abu Zahra, Mahmoud Kandeel, Sara A. Aldossary and Abdulla Al-Taher (2020). Study on Genotyping Polymorphism and Sequencing of N-Acetyltransferase 2 (NAT2) among Al-Ahsa Population. Biomed Res Int. 2020; 2020: 8765347.
4. Valeria M. I., Alessandra D. R. (2015). "Ejaculate Oxidative Stress Is Related with Sperm ADN Fragmentation and Round Cells", International journal of Endocrinology, tr. 1-6.
5. Safarinejad M. R., Dadkhah F., Asgari M.A. (2012). Glutathione S-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and male factor infertility risk: a pooled analysis of studies. Urol J. 9: 541-548.
6. Yarosh S.L., Kokhtenko E.V., Churnosov M.I. (2014). Synergism between the N-acetyltransferase 2 gene and oxidant exposure increases the risk of idiopathic male infertility. Reprod Biomed Online, 29(3), 362-369.
7. Yarosh S.L., Kokhtenko E.V., Starodubova N.I. et al (2013). Smoking status modifies the relation between CYP1A1\*2C gene polymorphism and idiopathic male infertility: the importance of gene-environment interaction analysis for genetic studies of the disease. Reprod Sci, 20(11), 1302- 1307.
8. Xue Kun Huang, Yong-Han Huang, Juan-Hua Huang and Jing-Yao Liang (2017). Glutathione S-transferase P1 Ile105Val Polymorphism and Male Infertility Risk: An Updated Meta-analysis. Chin. Med. J. 130(8): 979-985.
9. Zhangming Wei, Mengmeng Zhang, Xinyue Zhang et al (2019). NAT2 gene polymorphisms and endometriosis risk: A PRISMA-compliant meta-analysis. PLoS One. 14(12): e0227043.

## NGHIÊN CỨU ĐỘT BIẾN GEN LIÊN QUAN ĐẾN BỆNH ALZHEIMER KHỞI PHÁT MUỘN BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ THỂ HỆ MỚI

Đào Hồng Thuý<sup>1</sup>, Tống Mai Trang<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Tuyết Lan<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Quỳnh Tho<sup>1</sup>, Đỗ Thị Thanh Thủy<sup>1</sup>, Trương Đình Kiệt<sup>1</sup>,  
Nguyễn Hoài Nghĩa<sup>3</sup>, Trần Công Thắng<sup>4</sup>, Giang Hoa<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Alzheimer (AD) và bệnh gây sa sút trí tuệ (SSTT) là một trong mười nguyên nhân tử vong trên toàn thế giới (WHO/2016) và là nguyên nhân duy nhất không thể phòng ngừa chữa trị trong nhóm nguyên nhân trên. Việc nghiên cứu cơ sở phân tử di truyền của bệnh AD đang ngày càng được giới khoa học quan tâm. Hiện nay kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (Next generation sequencing- NGS) cho phép khảo sát toàn bộ gen mục tiêu liên quan tới bệnh cũng như những đột biến mới trong quần thể. Vì vậy, nhóm tiến hành nghiên cứu xác định đột biến trên 15 gen mục tiêu liên quan đến bệnh AD khởi phát muộn bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới. Trong tổng số 49 bệnh nhân Alzheimer khởi phát muộn, alen e4 của gen APOE được phát hiện trong 25 bệnh nhân (51%), bao gồm 7 trường hợp đồng hợp e4/e4 và 18 trường hợp dị hợp e4/-. Tần suất của alen APOE e4 ghi nhận trong nghiên cứu tương đồng với các công bố trước đây trên thế giới và

Việt Nam. Nghiên cứu cho thấy khả năng ứng dụng quy trình giải trình tự thế hệ mới phát hiện biến thể trên gen mục tiêu liên quan bệnh Alzheimer khởi phát muộn. Quy trình này có thể giúp phát hiện biến thể gây bệnh và gen nguy cơ trên đối tượng có tiền sử gia đình về bệnh Alzheimer khởi phát muộn.

**Từ khóa:** Sa sút trí tuệ (SSTT), bệnh Alzheimer (AD), APOE, APP, PSEN1, PSEN2, biến thể, kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS).

### SUMMARY

#### MUTATIONAL ANALYSIS OF VIETNAMESE PATIENTS WITH LATE-ONSET ALZHEIMER'S DISEASE USING NEXT-GENERATION SEQUENCING

Alzheimer's disease (AD) and dementia is known as one of the top ten causes of death worldwide (WHO/2016) and is the only unpreventable cause in this group. Genetic molecular studies of Alzheimer's disease is attracting a lot of attention from scientific community. At present, next-generation sequencing (NGS) technology allows analysis of many disease-related genes as well as novel mutations in the population. Hence, we conducted an investigation to identify mutations in 15 target genes related to late-onset Alzheimer's disease (LOAD) using next-generation sequencing. In a total of 49 LOAD patients, 25 patients (51%) carried APOE e4 allele, including 7 cases of homozygous e4/e4

<sup>1</sup>Viện Di truyền Y học Thành phố Hồ Chí Minh.

<sup>2</sup>Khoa Thần kinh, Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

<sup>3</sup>Trung tâm Y Sinh học Phân tử, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

<sup>4</sup>Bộ môn Thần Kinh, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

Chịu trách nhiệm chính: Giang Hoa

Email: gianghoa@gmail.com

Ngày nhận bài: 7.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 5.10.2020

Ngày duyệt bài: 18.11.2020

and 18 cases of heterozygous e4/-. The mutation rate of the APOE e4 allele reported in the study was consistent to that in previous studies. Our study shows the possibility of applying next-generation sequencing to detect variants in the target genes associated with LOAD. This procedure allow the identification of pathogenic mutations and risk genes in subjects that have LOAD in family history.

**Keywords:** Dementia, Alzheimer's Disease (AD), APOE, APP, PSEN1, PSEN2, variants, next-generation sequencing (NGS).

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

AD là bệnh gây mất trí nhớ, giảm nhận thức, rối loạn thời gian và không gian, nặng hơn nữa là nhầm lẫn ký ức, hoang tưởng, trầm cảm. Theo thống kê tại Mỹ năm 2019 có khoảng 5,8 triệu người bị ảnh hưởng bởi bệnh Alzheimer, đến năm 2050 con số này sẽ tăng lên 14 triệu. Cứ mỗi 65 giây lại có thêm một trường hợp bệnh mới được phát hiện và cứ 3 bệnh nhân sẽ có 1 người chết vì Alzheimer. Chi phí chăm sóc cho bệnh nhân Alzheimer trên toàn thế giới năm 2019 ước tính là 290 tỉ đô la Mỹ, dự báo đến năm 2050 con số này sẽ tăng lên 1,1 nghìn tỉ đô la nếu bệnh không được ngăn chặn và kiểm [1].

Hầu hết các nhà khoa học đều cho rằng AD là bệnh di truyền đa yếu tố do kết hợp yếu tố di truyền và tác động môi trường. Nghiên cứu về gen trong các bệnh nhân Alzheimer hiện đang là mối quan tâm hàng đầu với sự phát triển của một kỹ thuật phân tích đồng thời nhiều gen cùng lúc là kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (Next-generation sequencing – NGS) [4]. Kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới thực hiện giải trình tự hàng triệu phân tử DNA đồng thời trên phiên kính với chi phí rất thấp so với phương pháp giải trình

tự truyền thống. Bên cạnh đó, khi kết hợp với kỹ thuật lai-bắt giữ đặc hiệu cho gen cụ thể, cho phép thực hiện giải trình tự nhiều gen trong cùng một phản ứng, cung cấp cái nhìn toàn diện về những biến đổi gen diễn ra trong mẫu DNA, góp phần hỗ trợ cho việc ứng dụng kỹ thuật này trong xác định biến thể liên quan đến bệnh di truyền. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện giải trình tự thế hệ mới trên mẫu DNA bộ gen từ máu ngoại vi của bệnh nhân AD khởi phát muộn để khảo sát 15 gen liên quan đến AD. Sự thành công của nghiên cứu sẽ cung cấp phổ biến thể gen liên quan đến bệnh AD khởi phát muộn, tạo tiền đề mở rộng nghiên cứu, phục vụ mục đích phát hiện sớm, theo dõi và điều trị AD hiệu quả hơn.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**Thiết kế nghiên cứu:** nghiên cứu bệnh chứng.

**Đối tượng nghiên cứu:** Mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh AD theo tiêu chuẩn chẩn đoán rối loạn thần kinh nhận thức DSM-5 và từ 65 tuổi trở lên được thu nhận tại bệnh viện Đại học Y được TP HCM từ tháng 05/2019 tới tháng 04/2020. Nhóm chứng được chọn là mẫu máu của người từ 65 tuổi trở lên và không được chẩn đoán mắc AD theo tiêu chuẩn DSM-5. Nhóm nghiên cứu đã thu nhận được 49 mẫu máu của bệnh nhân AD khởi phát muộn và 32 mẫu đối chứng.

**Phương pháp nghiên cứu:**

**Tách chiết DNA bộ gen từ mẫu máu:** mẫu máu thu nhận được ly trích DNA bằng bộ kit Magjet Whole blood DNA (Thermo Scientific, Đức). DNA bộ gen sẽ được bảo quản ở -20°C cho tới khi được thực hiện giải trình tự.

**Chuẩn bị thư viện và làm giàu phân mảnh DNA:** DNA bộ gen sẽ được sử dụng để tạo thư viện bằng bộ kit Ultra II FS library preparation (New England Biolabs, Hoa Kỳ) bao gồm các bước: phân mảnh DNA, chỉnh sửa đầu mút, gắn adaptor và được khuếch đại bằng phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction) với số lượng chu kỳ tối ưu theo hướng dẫn của bộ kit.

**Lai và bắt giữ gen mục tiêu:** Sản phẩm PCR từ bước tạo thư viện sẽ được tiến hành lai với hỗn hợp mẫu dò (probe) đặc hiệu cho 15 gen mục tiêu, có gắn biotin ở các mẫu dò. Sau đó sử dụng hạt từ Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (ThermoFisher) để bắt giữ phân mảnh DNA của các gen trên thông qua tương tác streptavidin-biotin. Phản ứng lai sử dụng hóa chất và thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit xGen library hybridization (IDTDNA, Hoa Kỳ). Mẫu dò được thiết kế dựa trên trình tự mRNA của 15 gen mục tiêu và tổng hợp bởi IDTDNA (Hoa Kỳ). Thư viện DNA sau khi được bắt giữ sẽ được nhân bản lần 2 bằng PCR để đạt nồng độ cần thiết cho giải trình tự thế hệ mới (10nM).

**Giải trình tự trên hệ thống giải trình tự thế hệ mới NextSeq (Illumina, Hoa Kỳ):** Thư viện đạt chuẩn nồng độ trên 10nM được biến tính và giải trình tự bằng kit NextSeq 500/550 High Output trên hệ thống NextSeq 550 (Illumina, Hoa Kỳ).

**Phân tích kết quả giải trình tự:** Dữ liệu giải trình tự được sao lưu và gửi lên máy chủ để phân tích kết quả. Kết quả giải trình tự thế hệ mới là hàng triệu cặp trình tự DNA có kích thước 75 nucleotit. Từng trình tự DNA được sắp xếp lên bộ gen người chuẩn của Trung tâm Quốc gia về Thông tin Công nghệ Sinh học Hoa Kỳ (NCBI - National Center of Biotechnology Information, Hoa Kỳ) để xác định vị trí của trình tự này trên bộ gen người.

Vị trí của mỗi trình tự trong cặp trình tự cho phép xác định biến đổi xảy ra trên vùng gen mục tiêu.

Phần mềm phân tích được xây dựng dựa trên trình tự tại từng vị trí nucleotit để xác định các biến đổi di truyền xảy ra. Toàn bộ phần mềm được viết dựa trên phương pháp phân tích tối ưu hoá bởi Viện nghiên cứu Broad thuộc Đại học Harvard - Hoa Kỳ (Broad Institute, Harvard University, USA). Kết quả phân tích ghi nhận những biến thể di truyền trong 15 vùng gen mục tiêu.

**Phân loại các biến đổi di truyền:** biến thể phát hiện được phân loại làm 5 nhóm đột biến: (1) lành tính (benign), (2) gần giống lành tính (likely benign), (3) gây bệnh (pathogenic), (4) gần giống gây bệnh (likely pathogenic) và (5) không rõ chức năng (variant of uncertain significance). Trong đó, nhóm lành tính và gần giống lành tính là những biến thể không làm gia tăng nguy cơ mắc bệnh AD, trong khi nhóm gây bệnh và gần giống gây bệnh lại làm tăng nguy cơ mắc AD thể khởi phát muộn. Biến thể không rõ chức năng là những biến thể chưa có bằng chứng khoa học đầy đủ trong việc xác định vai trò của biến thể liên quan đến nguy cơ gây bệnh. Sự phân loại đột biến này dựa trên cơ sở dữ liệu thông tin lâm sàng về biến thể của Trung tâm Quốc gia về Thông tin Công nghệ Sinh học Hoa Kỳ (Clinvar database, NCBI - National Center of Biotechnology Information, Hoa Kỳ) và cơ sở dữ liệu đột biến liên quan bệnh Alzheimer ([www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)).

### III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

**Mô tả đặc điểm của nhóm bệnh nhân Alzheimer khởi phát muộn trong nghiên cứu**

Bệnh nhân AD được tuyển chọn theo quy trình chẩn đoán bệnh Alzheimer đã được hội đồng khoa học Bệnh viện Đại học Y được thông qua, bao gồm khám lâm sàng, kết quả hình ảnh và đánh giá nhận thức bằng test tâm thần kinh. Những bệnh nhân thỏa tiêu chuẩn

chẩn đoán DSM5 trên lâm sàng (Probable Alzheimer Disease) được tư vấn di truyền và mời tham gia chương trình nghiên cứu. Thông tin lâm sàng của 49 bệnh nhân AD khởi phát muộn đồng ý tham gia trong nghiên cứu được tóm tắt trong bảng 1.

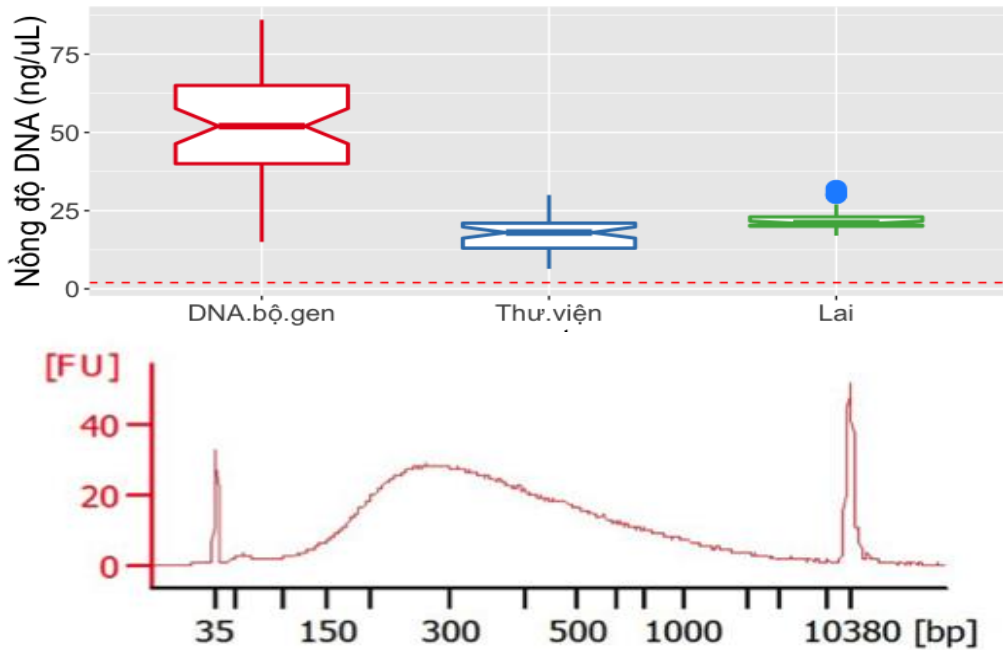
**Bảng 1: Thông tin lâm sàng của 49 bệnh nhân AD khởi phát muộn**

|                           | Tổng: 49 ca             |                |               |              |                |
|---------------------------|-------------------------|----------------|---------------|--------------|----------------|
|                           | Số ca                   |                | Tỉ lệ (%)     |              |                |
| Nữ                        | 31                      |                | 63.3%         |              |                |
| Nam                       | 18                      |                | 36.7%         |              |                |
| Tuổi khởi phát trung bình | 73 tuổi (65-84 tuổi)    |                |               |              |                |
| Có người thân SSTT        | 11                      |                | 22.4%         |              |                |
| Bệnh nền                  | 33                      |                | 67.3%         |              |                |
|                           | Các bệnh nền thường gặp |                |               |              |                |
|                           | Cao huyết áp            | Đái tháo đường | Tim mạch khác | Bệnh lý khác | Nhiều bệnh nền |
|                           | 6.1%                    | 15.2%          | 9.1%          | 15.2%        | 54.4%          |

Độ tuổi khởi phát trung bình của các bệnh nhân AD khởi phát muộn tham gia nghiên cứu là 73 tuổi, trong đó có từ 65-74 tuổi là 51%, từ 75-84 tuổi là 45% và trên 85 tuổi là 4%. So sánh với số liệu thống kê về sự phân bố bệnh Alzheimer theo độ tuổi tại Hoa Kỳ [5], tỉ lệ người mắc AD trong độ tuổi 65-74 của Việt Nam cao hơn đáng kể (51% so với 17%). Hai nguyên nhân chính có thể giải thích sự khác biệt này là yếu tố môi trường và yếu tố chủng tộc giữa nghiên cứu trên và kết quả của chúng tôi. Trong nghiên cứu, bệnh nhân nữ chiếm tỉ lệ 63.3%, gấp đôi tỉ lệ bệnh nhân nam (36.7 %). Số liệu này phù hợp với các công bố trước đó về nguy cơ mắc AD ở nữ giới cao gấp 1.5-2 lần so với nam giới.

Trong 49 bệnh nhân AD khởi phát muộn có đến 11 bệnh nhân có người thân trong gia đình có triệu chứng SSTT, chiếm tỉ lệ 22%. Điều này cho thấy mối liên hệ về mặt di truyền giữa các cá thể trong gia đình khi có tiền sử SSTT.

Kết quả thống kê có đến 67.3% bệnh nhân AD khởi phát muộn có mang trong người các bệnh nền khác như cao huyết áp, đái tháo đường... Trong đó, tỉ lệ mắc nhiều bệnh nền cùng một lúc lên đến hơn 50%. Các bệnh nhân tham gia nghiên cứu đều lớn tuổi nên sẽ có xu hướng mắc các bệnh nền của tuổi già. Mặc khác, các bệnh nền này cũng được coi là yếu tố nguy cơ của bệnh AD, góp phần làm tăng khả năng mắc bệnh AD. Vì vậy, các bệnh nhân trên 65 tuổi sẽ có nguy cơ mắc bệnh AD cao hơn những người nhỏ tuổi hơn.



**Hình 1. Kết quả kiểm tra nồng độ DNA bộ gen, thư viện trước và sau bước lai-bắt giữ (hình trên) và sự phân bố kích thước thư viện trên máy phân tích trình tự DNA BioAnalyzer (hình dưới)**

**Thiết lập quy trình giải trình tự 15 gen liên quan bệnh Alzheimer từ mẫu máu ngoại vi**

DNA bộ gen được sử dụng để xây dựng thư viện giải trình tự thông qua các bước: phân cắt DNA ngẫu nhiên, chỉnh sửa đầu mút bằng nhiều loại enzyme tổng hợp, gắn kết với trình tự adapter bằng enzyme ligase. Trình tự có adapter sẽ được khuếch đại bằng phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction) để đạt nồng độ cần thiết trước khi thực hiện bước lai-bắt giữ. Thư viện DNA được lai với mẫu dò đặc hiệu gắn biotin để làm giàu các phân mảnh DNA trong vùng mã hóa của 15 gen mục tiêu. Một thư viện được đánh giá có chất lượng tốt nếu phần lớn thư viện có chiều dài từ 300-500 nucleotit và có nồng độ cao hơn 10 nM. Kết quả cho thấy thư viện giải trình tự thu được có kích thước trung bình 300-500bp và nồng độ trung bình trên 2ng/ul

(quy đổi tương đương với ngưỡng 10nM) (hình 1).

**Khảo sát biến thể trên 15 gen liên quan đến bệnh Alzheimer khởi phát muộn**

Để khảo sát phổ biến thể liên quan bệnh Alzheimer, chúng tôi thực hiện giải trình tự 15 gen liên quan đến bệnh Alzheimer, trong đó có 3 gen liên quan bệnh Alzheimer khởi phát sớm (APP, PSEN1, PSEN2), 2 gen chính liên quan bệnh Alzheimer khởi phát muộn (APOE và TREM2), và 10 gen liên quan bệnh SSTT thùy trán thái dương (Frontotemporal Dementia - FTD). Chúng tôi đặt gen bệnh FTD vào nghiên cứu nhằm hỗ trợ chẩn đoán loại trừ nhóm bệnh này vì đây là một dạng sa sút trí tuệ có những dấu hiệu tương tự bệnh Alzheimer.

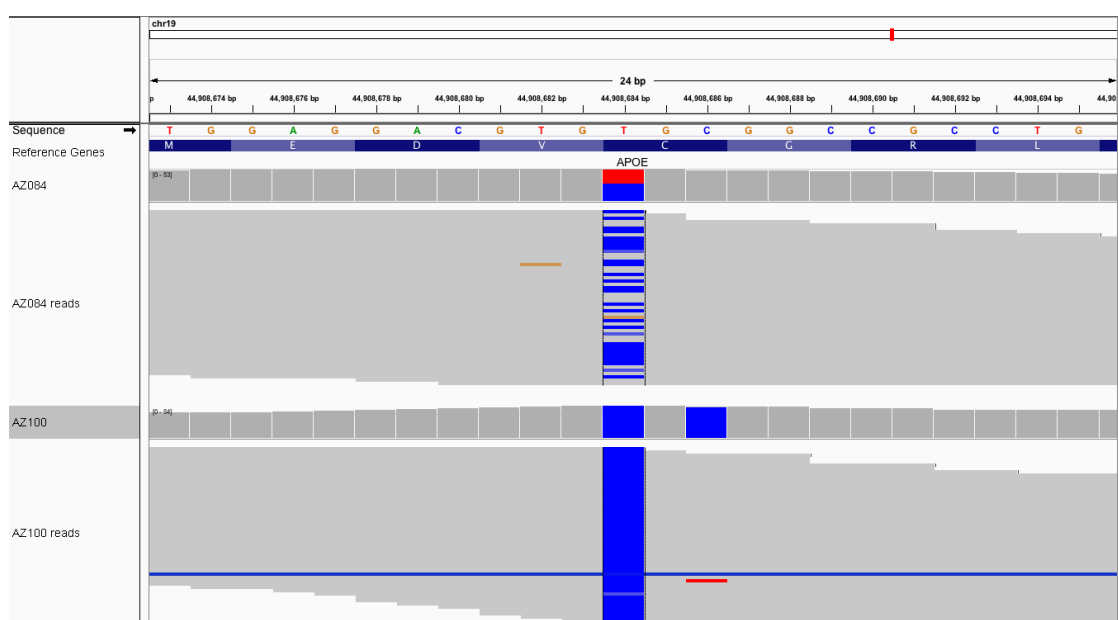
Trong 49 bệnh nhân AD khởi phát muộn và 32 người đối chứng, chúng tôi không tìm thấy biến thể gây bệnh nào trên các gen APP,

PSEN1 và PSEN2. Điều này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đó rằng APP, PSEN1 và PSEN2 là gen quyết định trong bệnh Alzheimer khởi phát sớm, nhóm bệnh nhân xuất hiện bệnh trước 65 tuổi [6, 7].

Trong các gen liên quan đến bệnh Alzheimer khởi phát muộn, APOE là gen nguy cơ, mã hóa cho protein chịu trách nhiệm vận chuyển cholesterol đến tế bào thần kinh, cũng như tăng trưởng tế bào thần kinh, đáp ứng sửa chữa tổn thương mô, tái tạo thần kinh, điều hòa miễn dịch và kích hoạt các enzyme lipolytic. APOE là một gen đa hình, có 3 alen chính là e2, e3 và e4, trong đó e4 được xem là biến thể gây bệnh của gen APOE làm tăng nguy cơ bệnh AD hơn 11 lần so với người bình thường [1]. Khi khảo sát các biến thể trên gen APOE, chúng tôi phát hiện có 25/49 bệnh nhân AD khởi phát muộn có mang biến thể APOEe4, chiếm 51%. Trong đó có 7/25 bệnh nhân có biến thể đồng hợp và 18/25 bệnh nhân có biến thể dị hợp.

Kết quả của nhóm phù hợp với các nghiên cứu công bố [8], cho thấy có 40-65% bệnh nhân được chẩn đoán mắc AD có mang biến thể APOEe4, làm tăng tốc lắng đọng amyloid, hình thành các mảng xơ rối, gây nên bệnh AD.

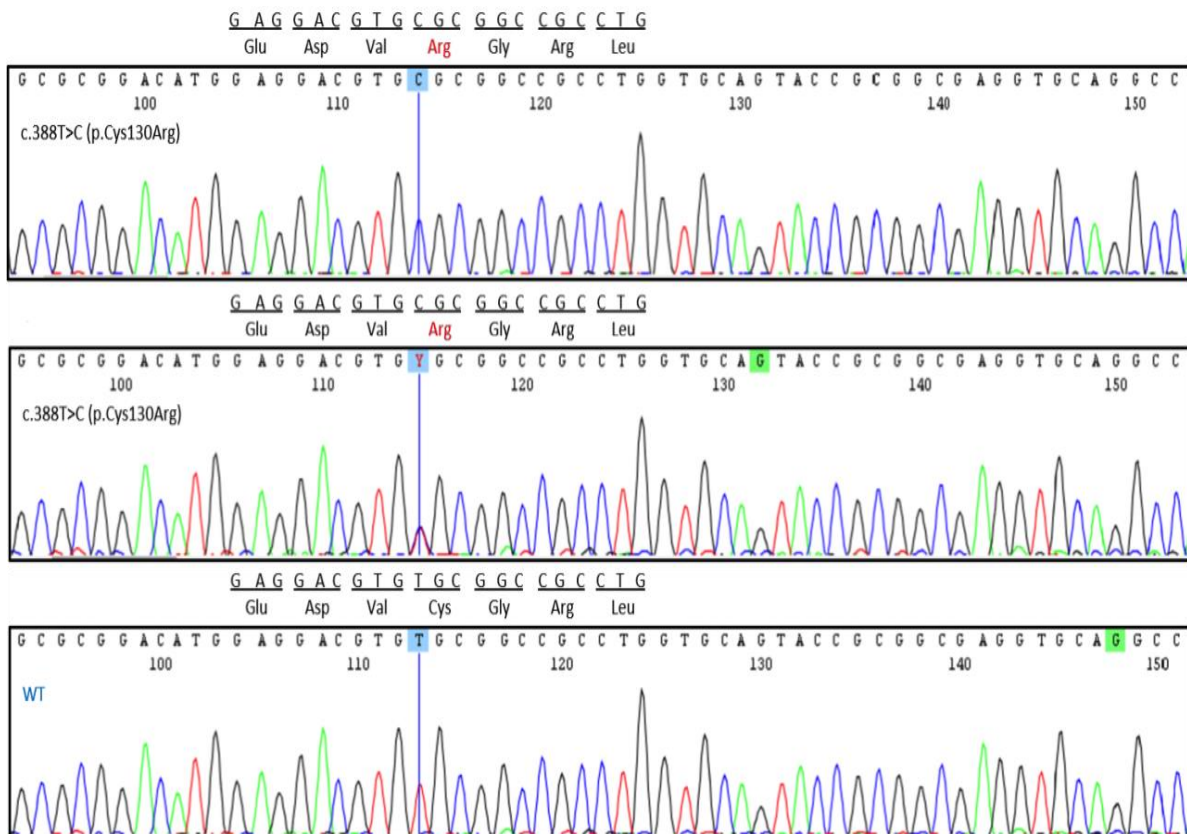
Kết quả khảo sát trên nhóm chứng (n=32) không phát hiện trường hợp mang biến thể đồng hợp APOEe4 mà chỉ phát hiện 6 trường hợp mang biến thể dị hợp APOEe4 (tỉ lệ 19%). Tỉ lệ phát hiện biến thể APOEe4 trong nhóm chứng tương đồng với nghiên cứu trước đây tại Việt Nam [8]. Điều này phù hợp với những ghi nhận cho rằng APOE là gen nguy cơ gây AD khởi phát muộn và độ thẩm (genetic penetrance) có thể thay đổi tùy theo nhiều yếu tố lối sống và môi trường khác. Một lưu ý ở đây là nhóm chứng được chẩn đoán chưa phát bệnh ở thời điểm tham gia nghiên cứu, tuy nhiên không loại trừ khả năng nhóm này có phát triển bệnh AD sau nghiên cứu.



**Hình 2. Kết quả phân tích giải trình tự thế hệ mới cho thấy vị trí đột biến trong mẫu AZ084 (dị hợp APOEe4) và mẫu AZ100 (đồng hợp APOEe4) tại locus chr19:44908684 (T>C).**

Ngoài ra, chúng tôi còn phát hiện có 3 bệnh nhân AD khởi phát muộn và 3 đối tượng trong nhóm chứng có mang biến thể APOEε2. Alen ε2 của gen APOE có liên quan đến vai trò bảo vệ đối với bệnh Alzheimer khởi phát muộn. Việc phát hiện biến thể bảo vệ APOEε2 trên 3 bệnh nhân

AD khởi phát muộn cho thấy yếu tố di truyền đa gen của bệnh Alzheimer vẫn chưa được hiểu đầy đủ. Biến thể APOEε4 của mẫu bệnh và mẫu chứng được tiến hành giải trình tự Sanger để khẳng định khả năng phát hiện đột biến của quy trình giải trình tự thế hệ mới (hình 3).



**Hình 3. Kết quả giải trình tự Sanger kiểm chứng biến thể APOEε4 đồng hợp (C/C, bảng trên cùng), dị hợp (T/C, bảng ở giữa) và bình thường (T/T, bảng dưới cùng) trên mẫu máu bệnh nhân Alzheimer khởi phát muộn. Thanh màu xanh dương chỉ thị vị trí biến thể.**

## V. KẾT LUẬN

Thông qua nghiên cứu giải trình tự thế hệ mới 15 gen mục tiêu của 49 bệnh nhân Alzheimer khởi phát muộn, chúng tôi phát hiện biến thể gây bệnh APOEε4 trên 25 bệnh nhân (51%), bao gồm 7 trường hợp đồng hợp và 18 trường hợp dị hợp. Tần suất tương

đồng với các công bố trước đây trên thế giới và Việt Nam, cho thấy nguy cơ cao của alen này trong diễn tiến bệnh Alzheimer khởi phát muộn. Nghiên cứu không phát hiện đột biến gen APP/PSEN1/PSEN2 trên nhóm bệnh nhân Alzheimer khởi phát muộn. Sử dụng Sanger như tiêu chuẩn vàng để kiểm tra

các đột biến được phát hiện bằng phương pháp giải trình tự thế hệ mới, nghiên cứu cho thấy sự tương đồng giữa kết quả giải trình tự Sanger và kết quả giải trình tự thế hệ mới. Nghiên cứu mở ra khả năng ứng dụng quy trình giải trình tự thế hệ mới phát hiện biến thể trên gen mục tiêu liên quan bệnh Alzheimer khởi phát muộn.

### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự hỗ trợ của Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ TPHCM thuộc Sở Khoa học và Công nghệ TPHCM (mã số 1122/QĐ-SKH-CN).

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Alzheimer's Association. (2019).** Alzheimer's Disease Facts and Figures . Alzheimers Dement ,321-87 .
2. **Bird T. (2008).** Genetic aspects of Alzheimer disease. Genet Med , 231–239.
3. **Chia-Chen Liu T. K. (2013).** Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. Nature Reviews Neurology , 106-118.
4. **Kunkle BW G.-B. B. (2019).** Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A $\beta$ , tau, immunity and lipid processing. Nat Genet. , 414-430.
5. **Hebert LE W. J. (2013).** Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 Census. Neurology .
6. **Cacace Rita S. K. (2016).** Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited . Alzheimer's & Dementia , 733-748.
7. **Giau V. B. (2019).** Genetic analyses of early-onset Alzheimer's disease using next generation sequencing. Sci Rep , 8368.
8. **Hoàng Văn Lương N. D. (2009).** Phân tích sự đa hình kiểu gen APOE ở các bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer . Tạp chí Y học Việt Nam , 42-48.

## CHUYỂN ĐOẠN ETV6/RUNX1 TRÊN BỆNH NHÂN MANG BẤT THƯỜNG DI TRUYỀN DẠNG TỨ BỘI HOẶC GẦN TỨ BỘI Ở TRẺ EM MẮC BỆNH BẠCH CẦU CẤP DÒNG LYMPHO B

An Thùy Lan, Vũ Đình Quang, Nguyễn Xuân Huy,  
Ngô Diễm Ngọc, Đặng Thị Hà, Nguyễn Hoài Anh, Bùi Ngọc Lan(\*)

### TÓM TẮT

Bất thường số lượng nhiễm sắc thể (NST) dạng tứ bội (tetraploidy: 92 NST) hoặc gần tứ bội (near-tetraploidy: 82-94 NST) chiếm tỷ lệ khoảng 1% các trường hợp bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu cấp dòng Lympho (BCCDL), có tiên lượng xấu khi so sánh với nhóm bệnh nhân mang bất thường số lượng NST ở các dạng ploidy khác. Trong nghiên cứu này, trên 608 bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh bạch cầu cấp (BCC) tại bệnh viện Nhi Trung ương (2015-8/2020), phát hiện 5 bệnh nhân có bất thường NST dạng tứ bội hoặc gần tứ bội, chiếm tỷ lệ 1,08% (5/463 bệnh nhân có kết quả phân tích NST). Thực hiện phân tích chuyển đoạn NST 12;21 (tổ hợp gen ETV6/RUNX1) bằng kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang (FISH) trên các bệnh nhân này nhằm đánh giá tiên lượng và hỗ trợ trong lựa chọn phác đồ điều trị, phát hiện một trường hợp có chuyển đoạn.

**Từ khóa:** bạch cầu cấp dòng Lympho, ETV6/RUNX1, tứ bội, gần tứ bội.

### SUMMARY

#### THE FEATURE OF ETV6/RUNX1 POSITIVE IN CHILDHOOD B-CELL PRECURSOR ACUTE

(\*)Bệnh viện Nhi Trung Ương

Chịu trách nhiệm chính: An Thùy Lan

Email: anthuylan@gmail.com

Ngày nhận bài: 1.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 15.9.2020

Ngày duyệt bài: 18.11.2020

### LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA WITH TETRAPLOIDY OR NEAR- TETRAPLOIDY.

Tetraploidy (92 chromosomes) or near-tetraploidy (82-94 chromosomes) make up fewer than 1% of childhood with acute lymphoblastic leukemia (ALL) cases and have been reported with a possibly poorer prognosis compared with other ploidy groups. We analyzed 608 patients at the National Children Hospital from 2015 to August, 2020, who were diagnosed with ALL in order to assess its incidence, biological characteristics and prognosis relevance. 468/608 patients had karyotype, among them we found 5/468 patients had tetraploidy or near-tetraploidy (1.3%) with B-cell precursor phenotype. Fluorescence in situ hybridization revealed all of these patients that one case had ETV6/RUNX1 rearrangement. Analyzed karyotype and confirmed the positive of ETV6/RUNX1 rearrangement or not indicated that tetraploidy or near tetraploidy appears to be a specific feature of ETV6/RUNX1+ in B-cell precursor ALL cases that in turn may explain its good outcome.

**Key words:** B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, ETV6/RUNX1, tetraploidy, near- tetraploidy.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bất thường số lượng NST là một trong những yếu tố quan trọng để xác định tiên lượng của bệnh BCC ở trẻ em [1], [2].

Bất thường số lượng NST dạng đa bội (hyperdiploidy) trong đó nhóm tăng số lượng NST > 50 NST phát hiện ở 20-30% bệnh BCCDL ở trẻ em. Các NST tăng thêm thường gặp là 2, 6, 14, 18, 21. Những bệnh nhân này thuộc nhóm tiên lượng tốt, đáp ứng bền vững với điều trị [3]. Bất thường số lượng NST dạng hyperdiploidy, trong đó tăng số lượng NST từ 47-50 NST chiếm tỷ lệ 10-15% trẻ em mắc BCCDL. Các NST tăng thêm thường là 8, 13, 21. Nhóm bệnh nhân có tiên lượng trung bình, hóa trị liệu nhiều thuốc phối hợp cải thiện đáng kể kết quả điều trị. Trong nhóm này, bất thường 3 NST 21 đơn độc liên quan tiên lượng tốt.

Bất thường số lượng NST dạng thiếu bội (hypodiploidy <46 NST) có tiên lượng xấu, mặc dù được áp dụng các phương pháp điều trị tích cực nhất. Bất thường số lượng NST dạng tứ bội (92 NST), hoặc gần tứ bội (82-94NST), chiếm tỷ lệ ít hơn, khoảng dưới 1% những bệnh nhân trẻ em mắc BCCDL, những bệnh nhân này thường có tiên lượng xấu hơn nhóm bệnh nhân bất thường các dạng đa bội khác [4]. Chuyển đoạn NST t(12;21)(p13;q22) với tổ hợp gen trong chuyển đoạn này là ETV6/RUNX1. Chuyển đoạn này là chuyển đoạn thường gặp nhất ở bệnh BCCDL trẻ em, chiếm khoảng 25% số trường hợp BCCDL [5]. Phần lớn những bệnh nhân có chuyển đoạn này thuộc nhóm tuổi từ 1 đến 12, thường gặp nhất là độ tuổi từ 2 đến 5 tuổi. Các bệnh nhân này đều có biểu hiện dấu ấn miễn dịch thuộc dòng precursor-B, đặc biệt là BCCDL thể common và BCCDL thể pre-B, hiếm gặp ở BCCDL thể pro-B. Bệnh nhân mang chuyển đoạn ETV6/RUNX1 thuộc nhóm tiên lượng tốt, độc lập với các yếu tố nguy cơ trên lâm sàng như tuổi và số lượng bạch cầu. Kết quả điều trị tốt và tỷ lệ sống khỏi bệnh đến 90%.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: 5/608 bệnh nhân được chẩn đoán bệnh bạch cầu cấp tại bệnh viện Nhi Trung ương, thời gian từ tháng 1/2015 đến tháng 8/2020.

Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân:

- Bệnh nhân thuộc nhóm bạch cầu cấp dòng Lympho.

- Bệnh nhân có bất thường số lượng NST dạng tứ bội (số lượng NST là 92) hoặc gần tứ bội (số lượng NST 82-94)

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân tích NST nuôi cấy từ tế bào tủy xương. Các bước tiến hành như sau:

- Mẫu bệnh phẩm: 1-1.5ml dịch tủy xương, vô trùng chống đông Heparin.

- Môi trường nuôi cấy: 75% RPMI 1640 (môi trường dư thymidine) và 25% Fetal Bovin Serum.

- Nuôi cấy trong flask vô trùng thể tích 25ml, 0.5-1ml tủy xương trong 8ml môi trường, flask nuôi cấy đặt trong tủ ấm 37°C, thời gian 24h. Mỗi mẫu bệnh phẩm nuôi cấy trong 2 flask: 1 mẫu chỉ bổ sung Chocemid; 1 mẫu bổ sung cả Etidium Bromide và Colcemid.

- Thu hoạch tế bào: nhuộm trương bằng dung dịch KCl, định hình tế bào bằng dung dịch Carnoy.

- Nhuộm tiêu bản bằng kỹ thuật băng G và nhuộm Giemsa.

- Lập Karyotype: xếp bộ NST theo quy ước quốc tế ISCN 2016.

- Phương pháp lai tại chỗ huỳnh quang (Fluorescence In situ Hybridization - FISH).

Kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang (FISH) sử dụng đầu dò gắn huỳnh quang để phát hiện trình tự DNA. Đầu dò ETV6 và RUNX1 đặc hiệu cho các vùng gen tương

ứng trên NST 12p13 và 21q22.

Mẫu bệnh phẩm: tế bào tủy xương đã qua nuôi cấy theo quy trình phân tích NST, các bước tiến hành như sau: tạo tiêu bản; đánh dấu vùng lai; phủ đầu dò; biến tính nhiệt: 77 C trong 5 phút, 37 C trong 16-24h; phủ dapi II.

Phân tích tín hiệu huỳnh quang trên kính hiển vi huỳnh quang: tín hiệu lai ETV6 có màu đỏ, tín hiệu lai RUNX1 có màu xanh. Bệnh nhân mang chuyển đoạn t(12;21) có tín hiệu fusion gen có màu cam.

### III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trong 608 bệnh nhân chẩn đoán xác định mắc BCC, theo dõi tại bệnh viện Nhi Trung ương từ năm 2015 đến tháng 8 năm 2020 được thực hiện phân tích công thức NST từ tế bào tủy xương. 468/608 bệnh nhân có kết quả phân tích NST từ tủy xương (76,15%), tỷ lệ thất bại trong xét nghiệm này là 23,85%. Trong 468 bệnh nhân này, phát hiện 6 bệnh nhân có bất thường NST dạng tứ bội hoặc gần tứ bội chiếm tỷ lệ 1,3%, tương đương với các nghiên cứu về nhóm bệnh nhân này [6], [7].

Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu: các bệnh nhân đều thuộc nhóm trẻ lớn, bệnh nhân nhỏ nhất 4 tuổi, bệnh nhân lớn nhất 13 tuổi.

Đặc điểm huyết học: số lượng tế bào tủy trung bình 43,62G/l, tỷ lệ tế bào blast trong tủy xương là 67,4%.

Trong 6 bệnh nhân này có 1 bệnh nhân mang dấu ấn miễn dịch dòng tủy, 5 bệnh nhân mang dấu ấn miễn dịch dòng Lympho, phân nhóm pre-B. Các dấu ấn miễn dịch của 5 bệnh nhân trong nghiên cứu đều dương tính với CD10, CD19 và CD79a.

Phân tích các biến đổi di truyền: trên công thức NST từ tế bào tủy xương các bệnh nhân

này, số lượng trong mỗi cụm tế bào của các bệnh nhân từ 82 đến 93 NST. Ngoài bất thường về số lượng NST, còn phát hiện các bất thường về cấu trúc NST kèm theo.

Bệnh nhân 1: thêm đoạn NST số 1 vị trí p36.2, mất đoạn ở NST số 4 vị trí p15, mất đoạn NST số 8 vị trí p21.

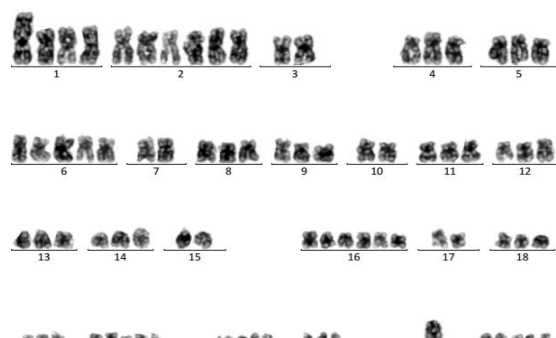
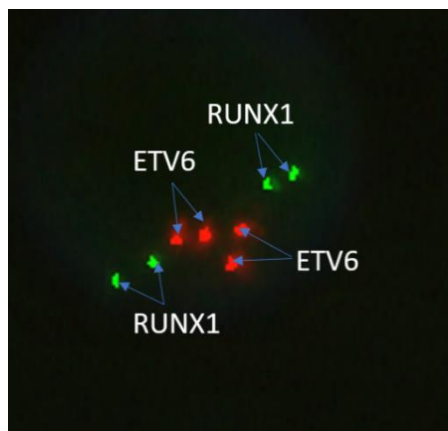
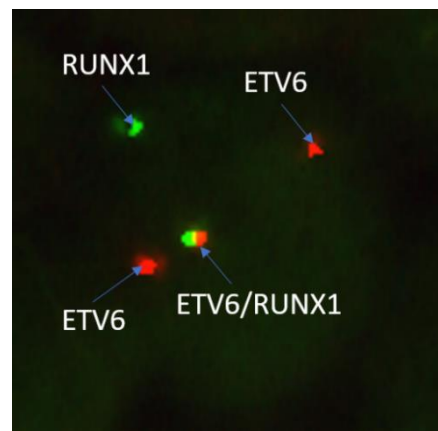
Bệnh nhân 2: mất đoạn NST số 2 vị trí p23.

Bệnh nhân 4: thêm đoạn 02 NST số 3 tại vị trí p26.

Thực hiện kỹ thuật FISH xác định chuyển đoạn giữa NST 12 và NST 21 mang tổ hợp gene ETV6/RUNX1. Chuyển đoạn ETV6/RUNX1 là một yếu tố độc lập với các chuyển đoạn NST khác góp vai trò xác định phân nhóm nguy cơ của các bệnh nhân BCCDL. Bệnh nhân 5 dương tính với chuyển đoạn này, kết hợp với kết quả phân tích NST không có bất thường cấu trúc NST kèm theo, bệnh nhân được xếp và nhóm có tiên lượng tốt, đáp ứng với điều trị hóa chất.

Các bệnh nhân còn lại đều không mang chuyển đoạn ETV6/RUNX1, kết hợp phân tích công thức NST và kết quả âm tính với chuyển đoạn ETV6/RUNX1 các bệnh nhân 1, 2, 4 đều xếp vào nhóm có tiên lượng nguy cơ cao, đáp ứng điều trị không tốt.

Ngoài chuyển đoạn ETV6/RUNX1, các bệnh nhân được phân tích các chuyển đoạn NST thường gặp trên bệnh nhân BCCDL bằng kỹ thuật FISH. Các chuyển đoạn này là t(9;22)(q34;q11) mang tổ hợp gene BCR/ABL; t(1;19)(q23;p13.3) mang tổ hợp gene TCF3/PBX1 và t(4;11)(q21;q23) mang tổ hợp gene AF4/MLL. Không có bệnh nhân nào dương tính với các chuyển đoạn này, trên hình ảnh phân tích kỹ thuật FISH thấy có thay đổi số lượng tín hiệu của các NST trong các tổ hợp gen này phù hợp với công thức NST từ tế bào tủy xương.

**Hình 1: 92,XXYY****Hình 2: 82,XYYY,add(1)(p36.2),del(4)(p15),del(8)(p21)****Hình 3: ETV6/RUNX1 (-)****Hình 4: ETV6/RUNX1 (+)**

Trong nghiên cứu này, có 2 bệnh nhân bỏ điều trị trong quá trình theo dõi. Ba bệnh nhân còn lại được điều trị theo phác đồ CCG 1991 (Children's Cancer Group), nguy cơ thường. Các bệnh nhân này đều được làm xét nghiệm tủy đồ và bệnh tồn lưu tối thiểu (Minimal Residual Disease - MRD) tại ba thời điểm: sau khi kết thúc giai đoạn tấn công, trước điều trị duy trì và khi kết thúc điều trị. Đánh giá lui bệnh hoàn toàn khi tủy đồ sau giai đoạn điều trị tấn công có tỷ lệ tế bào Lymphoblast < 5% và MRD < 0,01%.

Bệnh nhân 1: tuổi khởi phát bệnh 70 tháng, tại thời điểm chẩn đoán chỉ có tế bào ác tính tại tủy xương, chưa di căn, không mang chuyển đoạn ETV6/RUNX1, bệnh nhân đáp ứng với điều trị lui bệnh hoàn toàn, tiên lượng tốt. Bệnh nhân được theo dõi, điều

trị được 30 tháng, nguy cơ tái phát thấp.

Bệnh nhân 3: tuổi khởi phát bệnh 47 tháng, tại thời điểm khởi phát bệnh, ngoài biểu hiện tế bào ác tính tại tủy xương, bệnh nhân có thâm nhiễm gan và đường mật, không mang chuyển đoạn ETV6/RUNX1. Bệnh nhân đáp ứng với điều trị hoàn toàn sau giai đoạn điều trị tấn công, hiện bệnh nhân được theo dõi, điều trị được 9 tháng, nguy cơ tái phát cao.

Bệnh nhân 5: tuổi khởi phát bệnh 66 tháng, tại thời điểm khởi phát bệnh chưa có di căn ngoài tủy xương, bệnh nhân có dương tính với chuyển đoạn ETV6/RUNX1. Bệnh nhân được theo dõi, điều trị được 5 tháng. Tuy nhiên bệnh nhân có xuất hiện biến chứng huyết khối tĩnh mạch do tác dụng phụ của thuốc điều trị Ecoli asparaginase.

**Bảng 1: Tóm tắt đặc điểm huyết học và di truyền của các bệnh nhân nghiên cứu**

| Bệnh nhân | Giới tính | Tuổi (tháng) | Số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi ( $\mu$ l) | Kiểu hình miễn dịch | Dấu ấn miễn dịch      | Số lượng tế bào tủy (G/l) | Tỷ lệ tế bào Blast trong tủy xương (%) | Số lượng NST | ETV6/RUNX1 (+/-) |
|-----------|-----------|--------------|-------------------------------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------------------|--------------|------------------|
| 1         | Nam       | 70           | 21.92                                           | Pre-B               | CD10+,CD19+<br>CD79a+ | 56.11                     | 60                                     | 82           | -                |
| 2         | Nữ        | 64           | 12.13                                           | Pre-B               | CD10+,CD19+<br>CD79a+ | 37.47                     | 50                                     | 86-90        | -                |
| 3         | Nam       | 47           | 2.87                                            | Pre-B               | CD10+,CD19+<br>CD79a+ | 46.03                     | 72                                     | 89           | -                |
| 4         | Nữ        | 156          | 14.17                                           | Pre-B               | CD10+,CD19+<br>CD79a+ | 30.42                     | 60                                     | 70-93        | -                |
| 5         | Nam       | 66           | 8.4                                             | Pre-B               | CD10+,CD19+<br>CD79a+ | 48.16                     | 95                                     | 84           | +                |

**Bảng 2: Công thức NST của các bệnh nhân trong nghiên cứu**

| Bệnh nhân | Karyotype                                                                        |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 1         | 82,XYYY,add(1)(p36.2),del(4)(p15),del(8)(p21),-2,-3,-6x2,-12,-13,-16,-17,-18,-22 |
| 2         | 90,XXXX,del(2)(p23),-9,-13                                                       |
| 3         | 89,XXYY,-6,-19,-19                                                               |
| 4         | 93,XXX,add(3)(p26)x2,+7                                                          |
| 5         | 84,XXYY,-4,-5,-7,-12,-1,-16,-21x2                                                |

#### IV. BÀN LUẬN

Gene ETV6 là một gen kích thước lớn gồm 8 exon, tuy nhiên vùng có mang những điểm đứt gãy (intron 5) có kích thước chỉ 15kb, nằm giữa exon 5 và exon 6, rất hiếm các trường hợp điểm đứt gãy nằm ở exon 4. Đối với gene RUNX1 những điểm đứt gãy có thể xuất hiện trên intron 1 có kích thước rất lớn hoặc intron 2. Do vậy có 2 dạng bản mã tổ hợp ETV6/RUNX1 được hình thành. Dạng thứ nhất là gene ETV6 exon

5(nucleotide 1033)-RUNX1 exon2 (nucleotide 503) có tỷ lệ gặp cao. Trong một số ít trường hợp, do hiện tượng ghép nối khác nhau (alternative splicing), có thể gây ra hiện tượng bỏ qua (skipping) exon 2 (dài 39bp) trên gen ETV6 dẫn đến tạo thành 2 sản phẩm PCR trên cùng một bệnh nhân có kích thước lệch nhau 39bp. Dạng thứ 2 là tổ hợp gene ETV6 exon 5- RUNX1 exon 3, ít gặp hơn, gặp trong khoảng 10% trong những bệnh nhân BCCDL có dương tính với tổ hợp

gene ETV6/RUNX1. Tuy nhiên protein được tạo thành từ hai dạng bản mã này vẫn có cùng bộ khung và cấu trúc. Cả gene ETV6 và RUNX1 đều mã hóa cho những yếu tố điều hòa phiên mã. Tổ hợp gene này phá vỡ chức năng bình thường của gene ETV6 và hoặc tạo ra một yếu tố ức chế phiên mã làm suy giảm biểu hiện của gene RUNX1. Tổ hợp gene có tần xuất xuất hiện cao trong nhóm bệnh nhân BCCDL, do vậy có nhiều nghiên cứu được triển khai nhằm vào tổ hợp gene này để theo dõi tồn lưu tế bào ác tính. Những dữ liệu ban đầu cho thấy tồn lưu tế bào ác tính vẫn có thể được phát hiện sau giai đoạn tấn công trong 40-50% bệnh nhân.

Theo nghiên cứu của Attarbaschi năm 2004 [1], tỷ lệ bệnh nhân mang chuyển đoạn ETV6/RUNX1 là 20-25%, và là chuyển đoạn phổ biến nhất trong nhóm bệnh nhân BCCDL có bất thường NST dạng tứ bội hoặc gần tứ bội. Trong nghiên cứu này, trong 5 bệnh nhân có 1 bệnh nhân mang chuyển đoạn ETV6/RUNX1, tỷ lệ 20%.

Sự sai lệch về NST có thể gây tăng tần số phân bào, do vậy những tế bào tứ bội đơn nhân có thể tăng do quá trình không phân ly của NST, cơ chế này chưa làm rõ nguyên nhân gây nên các tế bào dương tính với ETV6/RUNX1. Do vậy cần có những nghiên cứu sâu trên số lượng bệnh nhân lớn hơn để giải thích mối liên hệ giữa việc tăng tỷ lệ bệnh nhân mắc BCCDL dạng tứ bội hoặc gần tứ bội dương tính với chuyển đoạn ETV6/RUNX1.

Bên cạnh khảo sát chuyển đoạn ETV6/RUNX1 trên nhóm bệnh nhân có bất thường NST dạng tứ bội hoặc gần tứ bội, các bệnh nhân này có chỉ định khảo sát các

chuyển đoạn NST thường gặp trong nhóm bệnh nhân BCCDL nói chung: t(9;22); t(1;19), t(4;11). Theo phân loại ASH 2009 (hiệp hội huyết học Hoa Kỳ), những bệnh nhân mang các chuyển đoạn này đều có tiên lượng xấu, tỷ lệ thất bại trong điều trị cao, nguy cơ tái phát cao. Trong nghiên cứu của Andishe [6], trên tổng số 948 bệnh nhân được chẩn đoán mắc BCCDL có 12 bệnh nhân có bất thường NST dạng tứ bội hoặc gần tứ bội, tất cả 12 bệnh nhân này không có bệnh nhân nào mang các chuyển đoạn t(9;22); t(1;19); t(4;11). Kết quả cũng tương tự trong nghiên cứu của Ruqing Yang [7], trong tổng số 10/1031 bệnh nhân được chẩn đoán BCCDL mang bất thường NST dạng tứ bội hoặc gần tứ bội, không có bệnh nhân nào mang các chuyển đoạn này. Theo kết quả các nghiên cứu này, đều thống nhất vai trò của việc phát hiện chuyển đoạn ETV6/RUNX1 trong phân nhóm yếu tố nguy cơ, tiên lượng điều trị cho các bệnh nhân mang bất thường NST dạng tứ bội hoặc gần tứ bội. Nhóm bệnh nhân này chỉ chiếm tỷ lệ rất nhỏ trong nhóm các bệnh nhân BCCDL ở trẻ em, trên dưới 1%.

Trong nghiên cứu này, do số lượng bệnh nhân ít, thời gian theo dõi điều trị chưa đủ, nhóm nghiên cứu mới chỉ mô tả được các bất thường về vật liệu di truyền của các bệnh nhân. Về mặt tiên lượng điều trị, dự đoán nguy cơ tái phát cần thời gian theo dõi thêm. Bệnh nhân 5 trong nghiên cứu, có biến chứng huyết khối tĩnh mạch, do biến chứng việc sử dụng thuốc Ecoli asparaginase, không liên quan đến bản chất bệnh. Theo y văn, những bệnh nhân có bất thường NST dạng tứ bội hoặc gần tứ bội, dương tính với

chuyển đoạn ETV6/RUNX1 thường có đáp ứng điều trị tốt, lui bệnh hoàn toàn, nguy cơ tái phát thấp.

## V. KẾT LUẬN

Tỷ lệ bệnh nhân mang bất thường số lượng NST dạng tứ bội hoặc gần tứ bội trong các bệnh nhân mắc BCCDL ở trẻ em rất thấp, khoảng 1%. Những bệnh nhân này có thể kèm theo những bất thường về cấu trúc 1 hoặc nhiều NST. Chuyển đoạn ETV6/RUNX1 là chuyển đoạn NST thường gặp nhất ở nhóm bệnh nhân BCCDL ở trẻ em có bất thường NST dạng tứ bội hoặc gần tứ bội. Chuyển đoạn ETV6/RUNX1 có vai trò phân loại nhóm nguy cơ và tiên lượng trong việc đáp ứng điều trị cũng như khả năng tái phát của bệnh nhân.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Harrison C. J., Cuneo A., Clark R., Johansson B., Lafage-Pochitaloff M., Mugneret F., Moorman A. V., Secker-Walker L. M. (1998). "Ten novel 11q23 chromosomal partner sites. European 11q23 Workshop participants". *Leukemia*, 12 (5), pp. 811-22.
2. Harrison CJ, Moorman AV, Broadfield ZJ. (2004)'' Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 125:552–559''.
3. Young DB. (2002). "**Molecular cytogenetics of leukemia**". *Leukemia*. 7th edition. In: Henderson SE., Lister AT., Greaves FM. (Eds.). Saunders, USA, pp. 69-84.
4. Raimondi SC. 1993. Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 81:2237–2251.
5. Shurtleff S. A., Meyers S., Hiebert S. W., Raimondi S. C., Head D. R., Willman C. L., Wolman S., Slovak M. L., Carroll A. J., Behm F., et al. (1995). "Heterogeneity in CBF beta/MYH11 fusion messages encoded by the inv(16)(p13q22) and the t(16;16)(p13;q22) in acute myelogenous leukemia". *Blood*, 85 (12), pp. 3695-703.
6. Andishe A, Georg M, Magrit K (2006). Near-tetraploidy in childhood B-Cell precursor acute lymphoblastic leukemia is a highly specific feature of ETV6/RUNX1positive leukemic cases. *Gene, chromosomes and cancer*, 45:608-611.
7. Ruqing Yang,1 Minghua Jiang,2 Junzhao Zhao. (2019). Identification of chromosomal abnormalities and genomic features in near-triploidy/ tetraploidy-acute leukemia by fluorescence in situ hybridization, *Cancer Management and Research*, 11: 1559–1567.

## TỶ LỆ BIẾN THỂ GENE THROMBOPHILIA Ở BỆNH NHÂN SẼY THAI, THAI LƯU TÁI DIỄN

Phan Thị Thu Giang<sup>1</sup>, Lê Phương Thảo<sup>1</sup>, Đoàn Thị Kim Phượng<sup>1,2</sup>,  
Trần Danh Cường<sup>1,2</sup>, Hoàng Thị Ngọc Lan<sup>1,2</sup>

### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Xác định tỷ lệ các biến thể (đột biến/đa hình) gen PAI-1, MTHFR (C677T, A1298C), FII, FVR2, FVL ở bệnh nhân sảy thai, thai lưu tái diễn. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu mô tả, tiến cứu trên 90 phụ nữ có tiền sử sảy thai, thai lưu tái diễn (từ hai lần trở lên), đến Trung tâm Chẩn đoán trước sinh Bệnh viện Phụ Sản Trung ương. Phương pháp: ADN của bệnh nhân được tách chiết từ máu ngoại vi. Sử dụng bộ kit Devyser Thrombophilia để phát hiện biến thể gen dựa trên cơ sở kỹ thuật QF-PCR. **Kết quả:** Tỷ lệ bệnh nhân mang biến thể là 92,2%. Nghiên cứu không phát hiện được dạng đồng hợp và dị hợp tử của đột biến FII G20210A, tần suất đột biến dị hợp tử của FVL là 2,2%, FVR2 là 4,4%, đột biến gen PAI-1 5G hay gặp nhất với tỷ lệ 78,9%, biến thể gen MTHFR A1298C và MTHFR C677T gặp với tỷ lệ 44,5% và 26,6%. Trong các cá thể mang biến thể, tỷ lệ 2 loại biến thể kết hợp chiếm tỷ lệ cao nhất 48,2%, 3 loại biến thể kết hợp là 10,8%, 1 biến thể riêng lẻ là 41%. **Kết luận:** tần suất xuất hiện các biến thể gen trong nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với dữ liệu của một số nghiên cứu khác, các biến thể riêng lẻ và kết hợp các yếu tố tăng đông có tỷ lệ cao trong nhóm sảy thai, thai lưu tái diễn.

Do vậy, chúng tôi khuyến cáo làm xét nghiệm này cho các phụ nữ với tiền sử sảy thai, thai lưu tái diễn trước khi đưa ra liệu pháp điều trị.

**Từ khóa:** Sảy thai, thai chết lưu liên tiếp, Thrombophilia, PAI-1, MTHFR, FII, FVL, FVR2

### SUMMARY

#### THE FREQUENCY OF HEREDITARY THROMBOPHILIA GENETIC VARIANTS IN RECURRENT PREGNANCY LOSS

**Aim:** Determine the rate of genetic variants in the Factor V Leiden (FVL), FV (A4070G), prothrombin (FII), methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T, A1298C), and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI -1) genes in women with recurrent pregnancy loss (RPL). **Methods:** The prospective description of 90 women with two or more recurrent pregnancy loss, referred to the Center of Prenatal Diagnosis, National Hospital of Obstetrics and Gynecology. Genomic DNA of participants was evaluated using QF-PCR to determine the genotype frequency. **Results:** The percentage of patients with mutations was 92.2%. The study did not detect mutation FII G20210A, while PAI-1 mutations was common. The frequency of heterozygotes for FVL 1691AA was 2,2%, FVR2 was 4,4%, for two polymorphisms in MTHFR, genotype frequencies of MTHFR 1298 and 677 were 44,5% and 26,6%, respectively. Among the individuals with mutations, 41% had single type of mutation, while 48,2% had

<sup>1</sup>Bệnh viện Phụ sản Trung Ương,

<sup>2</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Hoàng Thị Ngọc Lan  
Email: hoangthingoclan@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 4.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 13.10.2020

Ngày duyệt bài: 18.11.2020

combination of 2 types of mutations, the patients of with three types of mutations account for only 10,8%. **Conclusion:** The allele frequencies for the assessed genotypes in this study are consistent with the data obtained from other countries. According to the relatively high prevalence of these variants in RPL, we recommend genetic testing for women with RPL before therapeutic decisions.

**Keywords:** Thrombophilia, Recurrent pregnancy loss, PAI-1, MTHFR, FII, FVL, FVR2

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sảy thai, thai lưu tái diễn (Recurrent pregnancy loss - RPL) được định nghĩa khi có từ 2 lần sảy thai, thai lưu trở lên, ảnh hưởng khoảng 5% phụ nữ ở độ tuổi sinh sản. Tình trạng tăng tạo cục máu đông có thể do di truyền hoặc mắc phải, khoảng 40% là do di truyền. Chứng ưa huyết khối di truyền là rối loạn di truyền trong con đường đông máu dẫn đến tạo các cục máu đông bất thường gây biến chứng mạch máu dẫn đến sảy thai, thai chết trong tử cung, tiền sản giật và biến chứng sản khoa. Các đột biến gen chính gây tắc nghẽn mạch máu là: đột biến gen yếu tố V Leiden (FV), đột biến gen yếu tố II prothrombin G20210 (FII), đột biến methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR), đột biến yếu tố V R2 (A4070G), PAI-1 gây tăng homocystein máu. Bình thường trong cơ thể có protein C hoạt hóa (APC) có chức năng chống đông máu. Nguyên nhân hàng đầu gây thuyên tắc là do cơ thể có hiện tượng đối kháng protein này. Đột biến 677C>T của gen MTHFR dẫn tới thiếu hụt 50% enzym methylene tetrahydrofolate reductase gây tăng nồng độ

homocysteine, được xác nhận là yếu tố nguy cơ của huyết khối tĩnh mạch sâu. Trường đại học sản phụ khoa Mỹ cho rằng các yếu tố F5 1691A, F2 20200A, và MTHFR 677T có thể tăng nguy cơ cho sảy thai, thai lưu [1]. Đột biến F2 20210G> A làm tăng mức độ prothrombin và được coi là yếu tố nguy cơ của huyết khối tĩnh mạch. Tỷ lệ lưu hành của F2 202210G >A ở người da trắng gốc Âu là 1 đến 8%, ở địa trung hải là 1 đến 12%. Đột biến FVL 1691G >A dạng đồng hợp làm tăng nguy cơ huyết khối tĩnh mạch gấp 50-100 lần. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là phát hiện tỷ lệ lưu hành và liên quan của yếu tố MTHFR C677T, MTHFR A1295C, FII, FVR2, FV Leiden, PAI -1 với các trường hợp sảy thai, thai lưu tái diễn ở phụ nữ Việt Nam.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**Đối tượng:** 90 phụ nữ có tiền sử sảy thai, thai lưu tái diễn (từ hai lần trở lên), có một con hoặc chưa có con, đến Trung tâm Chẩn đoán trước sinh Bệnh viện Phụ Sản Trung ương. Tất cả những bệnh nhân tham gia nghiên cứu đều không có bất thường về giải phẫu hệ sinh dục, nội tiết tố bình thường, nhiễm sắc thể đồ bình thường, hội chứng kháng phospholipid âm tính.

### Phương pháp:

Thiết kế nghiên cứu: Mô tả tiến cứu.

Phương pháp: ADN được tách chiết từ máu ngoại vi (trong nghiên cứu này sử dụng bộ kit QIAamp ADN Blood Mini Kit (Qiagen, cat.# 51104)). Sử dụng bộ kit Devyser Thrombophilia để phát hiện đột biến gen được xác định dựa trên cơ sở kỹ thuật QF-PCR. Xét nghiệm phân tích được 6 đột biến: yếu tố V G1691A, yếu tố V

H1299R (R2), Prothrombin G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, PAI-1 4G/5G.

**Xử lý số liệu:** trên phần mềm thống kê SPSS 16.0.

**Đạo đức nghiên cứu:** Bệnh nhân hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu. Bệnh nhân sẽ được thông báo về kết quả xét nghiệm gen để giúp cho các bác sỹ tư vấn di truyền hoặc lựa chọn phác đồ phù hợp. Các thông tin cá nhân sẽ được đảm bảo bí mật.

### III. KẾT QUẢ

Trong nhóm 90 bệnh nhân nghiên cứu, tất cả bệnh nhân đều có tiền sử sảy thai, thai lưu sớm trước 12 tuần (ít nhất 2 lần và nhiều nhất là 9 lần), chỉ 10 trường hợp có tiền sử đẻ non lớn hơn 28 tuần và có 43 trường hợp đã có 1 đến 2 con. Độ tuổi trung bình là  $30,47 \pm 4,9$  (thấp nhất là 20 tuổi, cao nhất là 41 tuổi). Không có trường hợp nào bị tắc mạch liên quan đến mang thai và cũng không có trường hợp nào bị tắc tĩnh mạch sau sảy thai.

**Bảng 1: Tỷ lệ bệnh nhân mang đột biến**

|                    | Có ít nhất 1 gen đột biến |       | Không có đột biến |      |
|--------------------|---------------------------|-------|-------------------|------|
|                    | n                         | %     | n                 | %    |
| Bệnh nhân (n = 90) | 83                        | 92,2% | 7                 | 7,8% |

**Nhận xét:** Trong số 90 bệnh nhân có 83 (92,2%) bệnh nhân mang đột biến gen được khảo sát

**Bảng 2: Tần suất xuất hiện các đột biến gen**

| Kiểu gen                       | PAI-1<br>5G   | MTHFR<br>1298A | MTHFR677C  | FVR2<br>4070A | FVL<br>1691G  | FIIP<br>20210G |
|--------------------------------|---------------|----------------|------------|---------------|---------------|----------------|
| Wild type:<br>Bình thường      | 19<br>(21,1%) | 50<br>(55,5%)  | 66 (73,4%) | 86<br>(95,6%) | 88<br>(97,8%) | 90<br>(100%)   |
| Heterozygous:<br>Dị hợp tử     | 40<br>(44,5%) | 34<br>(37,8%)  | 21 (23,3%) | 4 (4,4%)      | 2<br>(2,2%)   | 0 (0%)         |
| Homozygous:<br>Đồng hợp tử     | 31<br>(34,4%) | 6 (6,7%)       | 3 (3,3%)   | 0 (0%)        | 0 (0%)        | 0 (0%)         |
| Tổng số (đồng<br>hợp + dị hợp) | 71<br>(78,9%) | 40<br>(44,5%)  | 24 (26,6%) | 4 (4,4%)      | 2<br>(2,2%)   | 0 (0%)         |

**Nhận xét:** Trong nhóm sảy thai, thai lưu đột biến gen PAI-1 5G hay gặp nhất với tỷ lệ 78,9%, đột biến gen MTHFR 1298A và MTHFR677C gặp với tỷ lệ 44,5% và 26,6%.

**Bảng 3: Tần suất xuất hiện các đột biến trên một bệnh nhân**

| Số lượng đột biến trên một bệnh nhân | N         | %           |
|--------------------------------------|-----------|-------------|
| 1 đột biến                           | 34        | 41%         |
| 2 đột biến kết hợp                   | 40        | 48,2%       |
| 3 đột biến kết hợp                   | 9         | 10,8%       |
| <b>Tổng</b>                          | <b>83</b> | <b>100%</b> |

**Nhận xét:** tần suất xuất hiện 2 đột biến kết hợp trên một bệnh nhân chiếm tỷ lệ cao nhất là 48,2%

#### IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ bệnh nhân mang đột biến là 92,2% (83/90). Trong đó, đột biến PAI-1 có tần suất xuất hiện cao nhất với tỷ lệ 78,9% kiểu gen PAI-1 4G/5G chiếm 44,5% và kiểu gen PAI-1 4G/4G chiếm 34,4%. Trong 1 phân tích tổng hợp bao gồm 4306 trường hợp sảy thai, thai lưu và nhóm chứng gồm 3076 trường hợp chỉ ra yếu tố PAI-1 4G/5G có liên quan đến RPL ở người da trắng [2]. Nghiên cứu của Iglal Youssef Shaala và cs 2019 trên 66 trường hợp RPL và 34 trường hợp chứng cho thấy mối liên quan có ý nghĩa của đột biến PAI-1 4G/5G với tần suất RPL [3]. Một phân tích tổng hợp khác cho kết quả ngược lại được đưa ra bởi Su và cộng sự cho rằng không tìm thấy mối liên quan của PAI-1 4G/5G đến RPL [4]. Nghiên cứu của Amela Jusic' (2018) trên 60 bệnh nhân có tiền sử RPL trước 20 tuần và nhóm chứng 80 trường hợp ở Bosnia cũng không tìm thấy mối liên quan giữa PAI-1 4G/5G hoặc 4G/4G với RPL và tần suất xuất hiện alen 4G và 5G khác biệt không có ý nghĩa giữa 2 nhóm [5]. Sự khác biệt về mối liên quan của yếu tố này với RPL có thể do sự khác nhau giữa các chủng tộc và kích cỡ mẫu khác nhau trong các nghiên cứu này.

Tỷ lệ lưu hành của F2 202210G >A ở người da trắng gốc Âu là 1 đến 8%, ở địa trung hải là 1 đến 12%. Trong nghiên cứu của chúng tôi không có sự xuất hiện đột biến FII G20210A ở những bệnh nhân RPL. Nghiên cứu của Najmeh Ahangari cũng không phát hiện được trường hợp nào có đột biến yếu tố này [6].

Đột biến yếu tố V Leiden là đột biến thay thế điểm (G1691A) làm biến đổi yếu tố V, dẫn đến bất hoạt protein C. Đột biến dị hợp tử gây tăng nguy cơ đông máu cao gấp 5 đến 10 lần, đột biến đồng hợp tử gây tăng nguy cơ 80 lần ở mỗi cá thể mang đột biến [7]. Yếu tố V Leiden chịu trách nhiệm cho 20-40% tình trạng huyết khối đơn độc và 40-45% trường hợp huyết khối có tính chất gia đình. Tần suất xuất hiện của FVL ở Mỹ ước lượng khoảng 3-7%, gặp nhiều nhất ở người da trắng [7,8,9]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tần suất gặp đột biến này là 2,2%, cả 2 trường hợp này đều ở trạng thái dị hợp tử. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Najmeh Ahangari và cs tỷ lệ gặp đột biến dị hợp tử FVL là 2,9% và 1,6% tương ứng ở nhóm bệnh và nhóm chứng, tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p=0,261$ ) [6]. Hai trường hợp dị hợp tử FVL trong nghiên cứu của chúng tôi đều có tiền sử thai lưu 2 lần, tuy nhiên đều có thai tự nhiên, có 1 con khỏe mạnh và gia đình không có tiền sử huyết khối. Do vậy, tần suất xuất hiện và mức độ biểu hiện của các yếu tố đông máu có thể khác nhau ở các chủng tộc.

Tần suất xuất hiện đột biến FVR2 là 4,4%, trong đó chỉ xuất hiện đột biến dị hợp tử, không có đột biến đồng hợp tử. Nghiên cứu của Razieh Bigdeli và cs cho kết quả thấy xuất hiện đột biến này ở nhóm bệnh nhân là 6% dị hợp tử và 1% đồng hợp tử, ở nhóm chứng là 2% dị hợp tử và không có đột biến đồng hợp tử, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p=0,0721$ ). Nhưng khi so sánh giữa người mang và người không mang đột biến chỉ ra mối liên quan đáng kể của FVR2 và RPL.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tần suất xuất hiện đột biến MTHFR 677T là 26,6%, thấp hơn so với báo cáo ở cộng đồng Bonian, Ukraina, Naury tương ứng là 37,5%, 29,1%, 29,0%, cao hơn so với báo cáo ở cộng hòa Séc và Thụy Điển (25,0%) [1]. Tỷ lệ của đột biến dị hợp tử và đồng hợp tử tương ứng là 23,3% và 3,3%. Nghiên cứu của Najmeh Ahangari và cs (2019) trên 245 bệnh nhân có tiền sử sảy thai, thai lưu từ 2 lần trở cho thấy tỷ lệ của các đột biến này tương ứng là 28,8% và 9,4%, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ( $p=0.000$ ) [6]. Trong nghiên cứu này, tần suất xuất hiện đột biến MTHFR A1298C là 44,5%, trong đó dị hợp tử là 27,8 và đồng hợp tử là 6,7%. Nghiên cứu của Najmeh Ahangari và cs (2019) cho tỷ lệ là 13,4% cao hơn so với nhóm chứng là 5,6% ( $p=0.000$ ) [6], kết quả của chúng tôi thấp hơn có thể do cỡ mẫu trong nghiên cứu chưa đủ lớn. Mục đích của nghiên cứu là tính tỷ lệ xuất hiện đột biến của các yếu tố MTHFR C677T, MTHFR A1298C, FII, FVR2, FV Leiden, PAI -1 trên bệnh nhân sảy thai, thai lưu liên tiếp. Đến nay, một vài bằng chứng chỉ ra sự kết hợp của các yếu tố nguy cơ, bao gồm liên quan của rối loạn nhiều yếu tố tăng đông có tính chất di truyền với tình trạng tăng cục máu đông thứ phát và biến chứng trong thai kỳ thai kỳ. Kết hợp 2 đột biến MTHFR 677T và MTHFR 1298C trong sảy thai, thai lưu nhiều lần đã được công bố trước đó. Thêm vào đó, vai trò của đột biến MTHFR 677T/ 1298C hoặc MTHFR 677TT/ 1298CC trong sự phát triển của thai đã được xác định, trong đó đột biến dạng cis có ý nghĩa hơn vì nó cho phép nhiều hơn 2 alen đột biến có mặt trong kiểu gen và

đột biến đồng hợp tử của 2 yếu tố này kết hợp có vai trò quan trọng trong biến chứng thai kỳ. Trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ có 1 trường hợp có 2 đột biến này kết hợp ở trạng thái dị hợp tử, bệnh nhân này có tiền sử sảy thai thai lưu liên tiếp dưới 10 tuần và 1 lần đẻ non 28 tuần, trong khi các xét nghiệm khác hoàn toàn bình thường, vậy nên việc phát hiện ra bệnh nhân có kết hợp 2 đột biến MTHFR 677T/ 1298C giúp cho bác sỹ đưa ra liệu pháp điều trị sớm và phù hợp. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, tỷ lệ 2 loại đột biến chiếm tỷ lệ cao nhất là 48,2%, 1 đột biến riêng lẻ là 41%, 3 loại đột biến kết hợp là 10,8% trong nhóm sảy thai, thai lưu tái diễn. Do vậy, cần nhiều nghiên cứu và với cỡ mẫu lớn hơn để xác định mức độ ảnh hưởng của các loại đột biến kết hợp trong sảy thai, thai lưu.

## V. KẾT LUẬN

Các đột biến gen được xem như nguy cơ cao của huyết khối mạch máu và có mối liên quan mạnh mẽ với RPL như đột biến yếu tố V Leiden, G20210A của yếu tố II thì yếu tố V Leiden xuất hiện với tỷ lệ thấp và không xuất hiện đột biến FII. Đột biến xuất hiện nhiều nhất là PAI-1. Tần số các alen đột biến còn lại có tỷ lệ gặp tương đồng với một số nghiên cứu khác và có tỷ lệ lưu hành cao ở nhóm RPL. Kết hợp nhiều yếu tố tăng đông chiếm tỷ lệ cao (2 yếu tố: 48,2%, 3 yếu tố: 10,8%) ở nhóm bệnh nhân RPL, cần nghiên cứu thêm mối liên quan giữa kết hợp các yếu tố tăng đông với biến chứng thai kỳ để có thể đưa ra phác đồ điều trị cụ thể cho các bệnh nhân này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Lockwood C, Wendel G (2011).** Practice bulletin no 124: inherited thrombophilias in pregnancy. *Obst Gynecol.* 118(3):730–740.
2. **Li X, Liu Y, Zhang R, Tan J, Chen L, Liu Y (2015).** Me-ta-analysis of the association between plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and recurrent pregnancy loss. *Med Sci Monit.* 21:1051- 6.
3. **Iglal Youssef Shaala, Akram Abdel Moneim Deghady, Reham Abdel Haleem Abo Elwafa, et al. (2019).** Detection of plasminogen activator inhibitor-1 (-675 4G/5G) gene polymorphism in women with recurrent abortion. *Hematology & Transfusion International Journal.* Volume 7 Issue 2 – 2019.
4. **Su MT, Lin SH, Chen YC, Kuo PL (2013).** Genetic association studies of ACE and PAI-1 genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost.*109:8-15.
5. **Amela Jusić , Devleta Balić , Aldijana Avdić, et al. (2018).** The association of factor V G1961A (factor V Leiden), prothrombin G20210A, MTHFR C677T and PAI-1 4G/5G polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Bosnian women. *Med Glas (Zenica)* 2018; 15(2):158-163.
6. **Najmeh Ahangari, Mohammad Doosti, Nezhat Mousavifar, et al (2019).** Hereditary thrombophilia genetic variants in recurrent pregnancy loss. *Archives of Gynecology and Obstetrics.* 2019 Sep;300(3):777-782.
7. **Rosendaal F, Koster T, Vandenbroucke J, Reitsma P (1995)** High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance) [see comments]. *Blood* 85(6):1504–1508.
8. **Foka Z, Lambropoulos A, Saravelos H, Karas G, Karavida A, Agorastos T et al (2000)** Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reduc-tase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 15(2):458–462.
9. **Bare S, Poka R, Balogh I, Ajzner E (2000)** Factor V Leiden as a risk factor for miscarriage and reduced fertility. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 40(2):186–190.

## ỨNG DỤNG KỸ THUẬT LAI HUỖNH QUANG TẠI CHỖ TRONG CHẨN ĐOÁN SỚM LỆCH BỘI NHIỄM SẮC THỂ SỐ 13, 18, 21 TRÊN TRẺ SƠ SINH

Vũ Đình Quang<sup>1</sup>, Đinh Thị Hồng Nhung<sup>1</sup>,  
Lê Thị Liễu<sup>1</sup>, Lê Thị Hà<sup>2</sup>, Ngô Diễm Ngọc<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Các bất thường di truyền trên trẻ sơ sinh khá đa dạng, trong đó hay gặp nhất là hội chứng Down (tam nhiễm số 21), Patau (tam nhiễm số 13) và Edwards (tam nhiễm số 18). Việc chẩn đoán sớm ba hội chứng này nói riêng, cũng như các bất thường khác nói chung có một vai trò quan trọng trong điều trị bệnh nhân. **Mục tiêu:** phát hiện các bất thường lệch bội (nếu có) nhiễm sắc thể số 13, 18, 21, XY trong thời gian 24 giờ kể từ khi nhận mẫu. **Đối tượng:** Một số bệnh nhân đang điều trị tại khoa Sơ sinh có một số đặc điểm lâm sàng nghi ngờ một trong ba hội chứng trên và cần chẩn đoán sớm để quyết định điều trị. **Phương pháp:** kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ trên các tế bào máu ngoại vi không qua nuôi cấy sử dụng bộ kit AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit của hãng Vysis (Abbott) để đánh dấu vào các nhiễm sắc thể số 13, 18, 21 và nhiễm sắc thể giới. **Kết quả:** Có 52 bệnh nhân sơ sinh được chỉ định làm xét nghiệm này, trong đó 30 bệnh nhân phát hiện ra lệch bội: 3 ca tam nhiễm 13; 17 ca tam nhiễm 18 và 7 ca tam nhiễm 21. Đồng thời, bằng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ, 20/30 bệnh nhân đã được phát hiện mang khám với tỷ lệ từ 1% đến 97%. Các kết quả đều được

trả trong vòng 24 giờ kể từ lúc lấy mẫu. **Kết luận:** Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ trên các tế bào máu ngoại vi không qua nuôi cấy đã được triển khai thành công, mang lại kết quả chính xác và nhanh chóng về đặc điểm lệch bội nhiễm sắc thể số 13, 18, 21 và XY cho bệnh nhân và lâm sàng để kịp thời đưa ra phác đồ điều trị phù hợp.

**Từ khóa:** kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ, lệch bội nhiễm sắc thể, trẻ sơ sinh

### SUMMARY

#### APPLICATIONS OF FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION IN EARLY DIAGNOSIS ANEUPLOIDY OF CHROMOSOME 13, 18, 21, XY IN NEWBORNS

**Abstract:** Genetic abnormalities in newborns are quite diverse, the most common of which are Down syndrome (trisomy 21), Patau syndrome (trisomy 13) and Edwards syndrome (trisomy 18). Early diagnosis of those syndromes as well as other abnormalities plays an important role in the treatment protocol. **Objective:** detect aneuploidy (if any) chromosome 13, 18, 21, XY within 24 hours of sample receipt. **Sample:** Fifty-five suspected patients (from January 2019 to May 2020) at neonatal department in National Children's Hospital who has been demanded an early and accurate diagnosis. **Method:** The fluorescent in situ hybridization technique had been performed on uncultured peripheral blood cell with the kit AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit of Vysis company (Abbott) to detect

<sup>1</sup>Khoa Di truyền và Sinh học Phân tử,

<sup>2</sup>Trung tâm sơ sinh, Bệnh viện Nhi Trung ương

Chịu trách nhiệm chính: Vũ Đình Quang

Email: quangvd@nch.org.vn

Ngày nhận bài: 1.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 16.9.2020

Ngày duyệt bài: 18.11.2020

the copy number variation of chromosome 13, 18, 21 and sex chromosome. **Results:** All the patients got the results during 24h. Thirty in fifty five patients had found the aneuploidy: 3 cases of trisomy 13, 17 cases of trisomy 18 and 7 ones of trisomy 21. Moreover, by this technique, the mosaicism had been detected in 20/30 patients, with the ratio of mosaic from 1% to 97%. **Conclusion:** The fluorescent in situ hybridization technique on uncultured peripheral blood cell has been successfully deployed, providing the fast and accurate results of the aneuploidy of chromosome 13, 18, 21 and XY which helps the clinicals promptly give appropriate treatment protocol for patients.

**Keyword:** fluorescent in situ hybridization technique, aneuploidy, newborns

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng Down (tam nhiễm số 21), hội chứng Patau (tam nhiễm số 13) và hội chứng Edwards (tam nhiễm số 18) là ba hội chứng bất thường di truyền hay gặp nhất ở trẻ sơ sinh. Trong đó, phổ biến nhất là hội chứng Down với tỷ lệ mắc khoảng 1-2 trẻ/1000 trẻ đẻ sống. Hội chứng Edwards có tỷ lệ gây tử vong cao ở trẻ sơ sinh, với khoảng 1/3 trẻ mắc Edwards tử vong trong thời kỳ sơ sinh, 1/2 số trẻ tử vong trong vòng 2 tháng và chỉ một số rất ít trẻ sống đến hết năm đầu tiên của cuộc đời. Hội chứng Patau dù có tỷ lệ tử vong thấp hơn hội chứng Edwards nhưng cũng chỉ có khoảng 10% trẻ mắc Patau sống được hơn 1 năm. Tỷ lệ mắc hội chứng Edwards và Patau so với hội chứng Down lần lượt là 1/8 và 1/13 [1]. Các hội chứng này đều dẫn đến các bất thường nặng trên lâm sàng, đặc biệt là tim bẩm sinh. Việc chẩn đoán sớm trẻ mắc hội chứng Down, Patau hay Edwards có ý nghĩa quan trọng trong

việc can thiệp điều trị, nhất là can thiệp ngoại khoa cho bệnh nhân [2].

Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ là một trong hai kỹ thuật di truyền tế bào cơ bản (cùng với công thức nhiễm sắc thể) được sử dụng rộng rãi trong các phòng xét nghiệm di truyền. Kỹ thuật này sử dụng các đầu dò đặc hiệu gắn huỳnh quang để đánh dấu huỳnh quang vào các vị trí cần nghiên cứu trên nhiễm sắc thể. Căn cứ vào số lượng tín hiệu huỳnh quang có thể xác định được các mất đoạn nhỏ, thêm đoạn nhỏ, lặp đoạn nhỏ hay các thay đổi về số lượng nhiễm sắc thể một cách chính xác và trong thời gian ngắn (từ 24 giờ đến 48 giờ). Tại bệnh viện Nhi Trung ương, chẩn đoán sớm các lệch bội nhiễm sắc thể để có hướng can thiệp phù hợp là một yêu cầu luôn được đặt ra tại Trung tâm Sơ sinh. Việc này thường được thực hiện thông qua lập công thức nhiễm sắc thể từ máu ngoại vi với thời gian trả kết quả từ 10 đến 14 ngày. Với mục đích rút ngắn thời gian phát hiện các lệch bội nhiễm sắc thể số 13, 18 và 21, chúng tôi tiến hành nghiên cứu “*Ứng dụng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ trong chẩn đoán sớm lệch bội nhiễm sắc thể số 13, 18, 21 trên trẻ sơ sinh*” với mục tiêu tối ưu quy trình FISH hiện đang thực hiện ở khoa Di truyền và Sinh học Phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương để phát hiện các bất thường lệch bội (nếu có) trong thời gian 24 giờ kể từ khi nhận mẫu.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng:

Một số bệnh nhân điều trị tại khoa sơ sinh bệnh viện Nhi Trung ương, tuổi dưới 1 tháng, có một triệu chứng lâm sàng nghi ngờ

mắc hội chứng Down, Patau hoặc Edwards như suy hô hấp, tim bẩm sinh... Các bệnh nhân này cần khẳng định hoặc loại trừ sớm lệch bội nhiễm sắc thể số 13, 18, 21 để quyết định hướng điều trị phù hợp.

## **2. Phương pháp nghiên cứu:**

### **2.1. Xử lý mẫu bệnh phẩm**

Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ được thực hiện trên tế bào máu ngoại vi không qua nuôi cấy.

Khoảng 1ml máu ngoại vi được thu thập trong ống heparin chân không tại khoa Sơ sinh, và gửi đến khoa Di truyền và Sinh học Phân tử ngay sau khi lấy. Lấy 200µl máu chuyển sang ống ly tâm 15ml, bổ sung 8ml dung dịch nhược trương KCl 0,075M và ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau khi ủ, thêm 3ml dung dịch cố định Carnoy (3 methanol:1 acid acetic), trộn đều và ly tâm 1800 vòng/phút trong 5 phút. Hút bỏ phần dịch nổi, giữ lại cặn tế bào và bổ sung 7ml dung dịch Carnoy như trên. Trộn đều và ly tâm 1800 vòng/phút trong 5 phút. Lặp lại bước rửa cặn tế bào từ 1 – 2 lần nữa đến khi cặn tế bào không còn hồng cầu. Sau lần rửa cuối, để lại 100µl Carnoy ở đáy ống, trộn đều và chuyển hết sang ống ly tâm 1,5ml.

Đánh dấu 2 vùng khác nhau bằng bút kim cương trên tiêu bản SuperFrost, mỗi vùng có kích thước khoảng 18x18mm. Nhỏ 10µl cặn tế bào lên mỗi vùng, kiểm tra dưới kính hiển vi soi ngược (mật độ cần đạt là khoảng 50 tế bào trên 1 vi trường).

### **2.2. Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ**

Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ sử dụng kit đầu dò AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit của hãng Vysis (Abbott) gồm 2 bộ đầu dò: bộ 1 có đệm và đầu dò 2 màu: màu

xanh đánh dấu vào nhiễm sắc thể số 13 (13q14) và màu đỏ đánh dấu vào nhiễm sắc thể số 21 (21q22.13-q22.2); bộ 2 có đệm và đầu dò 3 màu: màu xanh đánh dấu vào nhiễm sắc thể X (Xp11.1-q11.1), màu đỏ đánh dấu vào nhiễm sắc thể Y (Yp11.1-q11.1) và màu xanh aqua đánh dấu vào nhiễm sắc thể số 18 (18p11.1-q11.1). Đây là bộ kit đang được sử dụng trong chẩn đoán trước sinh trên tế bào dịch ối.

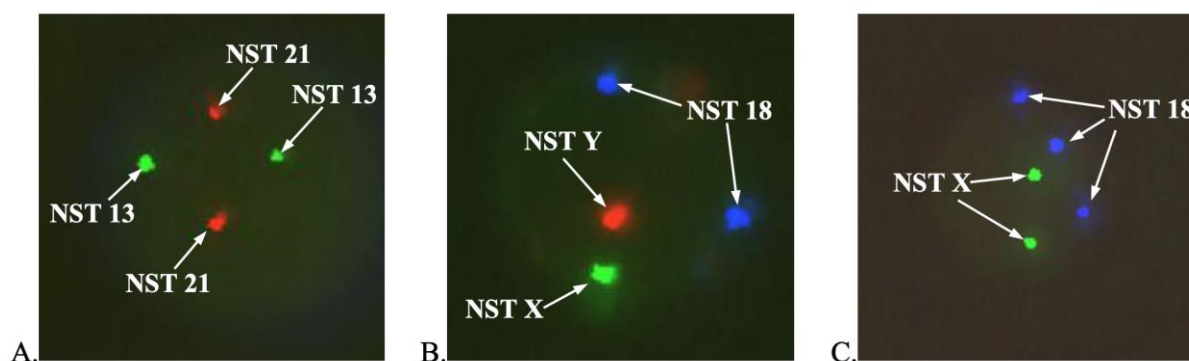
Nhỏ hỗn hợp đầu dò (1µl đầu dò và 9µl đệm) vào các vùng tế bào đã đánh dấu trên tiêu bản, mỗi kit tương ứng với 1 vùng. Che phủ vùng lai đầu dò bằng lamén 18x18mm, cố định lamén bằng cao su. Biến tính tiêu bản ở 72°C trong 5 phút và lai đầu dò ở 37°C qua đêm. Sau khi lai đầu dò, rửa tiêu bản để loại bỏ đầu dò thừa bằng dung dịch SSC 2X ở 72°C trong 3 phút, tiếp đến là dung dịch SSC 2X ở nhiệt độ phòng trong 2 phút và rửa nhanh bằng nước cất. Để tiêu bản khô tự nhiên, nhỏ 7µl DAPI II Counterstain lên mỗi vùng tế bào để đánh dấu tế bào chất, che phủ bằng lamén 22x22mm và cố định bằng sơn móng tay.

Tiêu bản được phân tích dưới kính hiển vi huỳnh quang với các bộ lọc khác nhau để xác định số lượng tín hiệu quan sát được tương ứng với số lượng nhiễm sắc thể của bệnh nhân.

## **III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

### **1. Kết quả lai huỳnh quang tại chỗ**

Các tín hiệu huỳnh quang rõ ràng, không có tín hiệu nhiễu cho phép phân tích chính xác số lượng nhiễm sắc thể số 13, số 18, số 21 và nhiễm sắc thể XY (hình 1) cũng như loại trừ các trường hợp dương tính hay âm tính giả.



**Hình 1.** Một số hình ảnh lai huỳnh quang tại chỗ trên tế bào máu ngoại vi.

A. Hình ảnh tế bào có 2 nhiễm sắc thể số 13 và 2 nhiễm sắc thể số 21.

B. Hình ảnh tế bào có 1 nhiễm sắc thể X, 1 nhiễm sắc thể Y và 2 nhiễm sắc thể số 18.

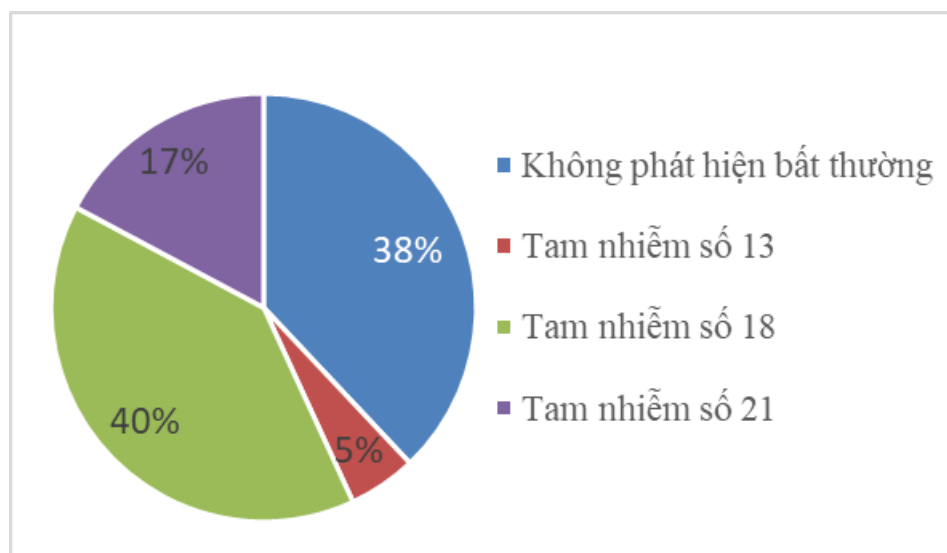
C. Hình ảnh tế bào có 2 nhiễm sắc thể X và 3 nhiễm sắc thể số 18

Tất cả các kết quả đều được trả trong vòng 24 giờ kể từ lúc lấy mẫu, đáp ứng đúng yêu cầu của lâm sàng về tính kịp thời và nhanh chóng của xét nghiệm.

## 2. Phát hiện các dạng bất thường số lượng lệch bội nhiễm sắc thể

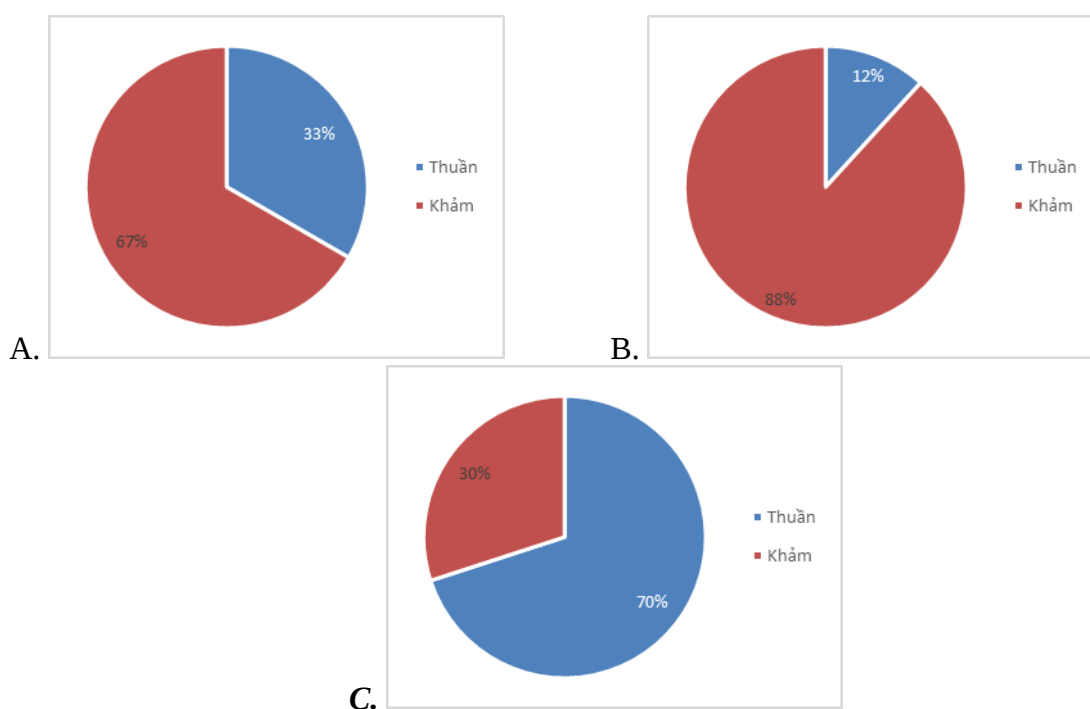
Từ tháng 1 năm 2019 đến tháng 5 năm 2020, có 52 bệnh nhân sơ sinh được chỉ định

làm xét nghiệm lai huỳnh quang tại chỗ để tìm lệch bội nhiễm sắc thể số 13, số 18 và số 21. Trong đó, có 22 bệnh nhân không thấy bất thường nhiễm sắc thể và 30 bệnh nhân phát hiện lệch bội một trong 3 nhiễm sắc thể nói trên (3 ca tam nhiễm số 13, 17 ca tam nhiễm số 18 và 10 ca tam nhiễm số 21) (hình 2).



**Biểu đồ 1.** Tỷ lệ các dạng lệch bội phát hiện bằng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ

Trong 30 bệnh nhân có tam nhiễm sắc thể, có 10 trường hợp dạng thuần (chiếm tỷ lệ khoảng 33%), còn lại là 20 bệnh nhân có xuất hiện thể khảm với tỷ lệ từ 1% đến 97% (hình 3).



**Biểu đồ 2. Tỷ lệ thuần và khảm ở từng dạng tam nhiễm**  
 A. Tam nhiễm số 13; B. Tam nhiễm số 18; C. Tam nhiễm số 21

#### IV. BÀN LUẬN

Hội chứng Patau (tam nhiễm 13), Edwards (tam nhiễm 18) và Down (tam nhiễm 21) là các hội chứng do bất thường số lượng nhiễm sắc thể hay gặp trên trẻ sơ sinh. Việc phát hiện các bất thường này bằng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ với bộ kit đầu dò sử dụng cho chẩn đoán trước sinh đã cho thấy nhiều ưu điểm.

Ưu điểm đầu tiên và quan trọng nhất là thời gian trả kết quả được rút ngắn rõ rệt, thông thường là trong vòng 24 giờ kể từ khi nhận mẫu (so với từ 10 đến 14 ngày bằng cách lập nhiễm sắc thể đồ). Việc giảm thời gian xét nghiệm này là kết quả của việc thực hiện kỹ thuật trực tiếp trên các tế bào máu ngoại vi không qua nuôi cấy, từ đó đã giảm được thời gian từ bước nuôi cấy đến thu hoạch tế bào. Bên cạnh đó, thời gian phân tích kết quả cũng được giảm đi do chỉ cần tập trung vào phân tích số lượng tín hiệu của

từng nhiễm sắc thể tương ứng với bộ kit sử dụng và do chất lượng tốt, rõ ràng, không nhiễu của tín hiệu huỳnh quang sau quá trình lai (hình 1).

Ưu điểm tiếp theo là khả năng phát hiện ra các thể khảm có tỷ lệ thấp cao hơn so với nhiễm sắc thể đồ. Bằng việc có thể phân tích vài trăm đến hơn 1000 tế bào trong một lần chạy, kỹ thuật này đã mở ra cơ hội cho các nhà di truyền phát hiện ra các trường hợp thể khảm, thậm chí là thể khảm với tỷ lệ rất thấp, từ 1-2% tế bào khác loại. Thể khảm là một thuật ngữ dùng để chỉ có ít nhất 2 dòng tế bào khác nhau có trong cùng một mô hay một cơ thể. Các biểu hiện lâm sàng của thể khảm rất đa dạng, phụ thuộc vào loại đột biến, tỷ lệ phần trăm tế bào có đột biến và sự phân bố mô của sự thay đổi di truyền [3]. Trong nghiên cứu này, cả 3 dạng tam nhiễm 13, 18 và 21 đều phát hiện ra thể khảm. Đối với tam nhiễm 13, có 3 trường hợp có mang

bất thường này, ở đó có 2 trường hợp là thể khảm. Trường hợp khảm đầu tiên là khảm tam nhiễm 13 với tỷ lệ tế bào tam nhiễm là 2,5% trên một bệnh nhân 2 ngày tuổi có suy hô hấp và tim bẩm sinh. Trường hợp khảm còn lại là trường hợp khảm 3 dòng tế bào:

99% tế bào mang 2 nhiễm sắc thể số 13; 0,5% tế bào có đơn nhiễm số 13 và 0,5% tế bào có tam nhiễm số 13. Đây là bệnh nhân 30 ngày tuổi có biểu hiện phình đại tràng bẩm sinh (Bảng 1).

**Bảng 1. Các trường hợp khảm tam nhiễm 13 trong nghiên cứu này**

| Mã số PXN | Số tế bào phân tích | Số tế bào đơn nhiễm 13 | Số tế bào có 2 NST số 13 | Số tế bào tam nhiễm 13 | Tỷ lệ khảm                                                   |
|-----------|---------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------|
| FWB190413 | 1268                | 07                     | 1255                     | 06                     | 0,5% tam nhiễm 13<br>0,5% đơn nhiễm 13<br>99% có 2 NST số 13 |
| FWB200219 | 200                 |                        | 195                      | 5                      | 97,5% tam nhiễm 13                                           |

Có 15/17 trường hợp tam nhiễm 18 là thể khảm, với sự xuất hiện của 2 dòng tế bào: 1 dòng bình thường mang 2 nhiễm sắc thể số 18 và 1 dòng có 3 nhiễm sắc thể số 18 với tỷ lệ khảm rất khác nhau, từ 1% đến 98%. Phần lớn các bệnh nhân thuộc nhóm này đều là các bệnh nhân nặng với biểu hiện suy hô hấp, tim bẩm sinh, bất thường não... (Bảng 2)

**Bảng 2. Các trường hợp khảm tam nhiễm 18 trong nghiên cứu này**

| Mã số PXN | Số tế bào phân tích | Số tế bào có 2 NST số 18 | Số tế bào tam nhiễm 18 | Tỷ lệ khảm tam nhiễm 18 |
|-----------|---------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|
| FWB190808 | 183                 | 24                       | 159                    | 86,9%                   |
| FWB190820 | 200                 | 50                       | 150                    | 75%                     |
| FWB190906 | 240                 | 10                       | 230                    | 95,8%                   |
| FWB191008 | 462                 | 450                      | 12                     | 2,6%                    |
| FWB191011 | 257                 | 102                      | 155                    | 60%                     |
| FWB191017 | 111                 | 61                       | 50                     | 45%                     |
| FWB191022 | 102                 | 70                       | 32                     | 31,4%                   |
| FWB191026 | 94                  | 13                       | 81                     | 86%                     |
| FWB191116 | 156                 | 150                      | 6                      | 3,8%                    |
| FWB191118 | 195                 | 190                      | 5                      | 2,5%                    |
| FWB191229 | 200                 | 196                      | 8                      | 4%                      |
| FWB200124 | 193                 | 185                      | 8                      | 4,14%                   |
| FWB200318 | 233                 | 223                      | 10                     | 4,3%                    |
| FWB200405 | 216                 | 6                        | 210                    | 97,2%                   |
| FWB200515 | 131                 | 107                      | 24                     | 18,3%                   |

Còn đối với hội chứng Down (tam nhiễm 21), tỷ lệ xuất hiện thể khảm thấp hơn (3/10 trường hợp) với tỷ lệ khảm từ 1% đến 98%. Các bệnh nhân này, bên cạnh tim bẩm sinh, còn có một số đặc điểm lâm sàng đặc trưng như bộ mặt Down, không hậu môn/hậu môn nắp, viêm phổi... (Bảng 3)

**Bảng 3. Các trường hợp khảm tam nhiễm 21 trong nghiên cứu này**

| Mã số PXN | Số tế bào phân tích | Số tế bào có 2 NST số 21 | Số tế bào tam nhiễm 21 | Tỷ lệ khảm tam nhiễm 21 |
|-----------|---------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|
| FWB191033 | 200                 | 4                        | 196                    | 98%                     |
| FWB200204 | 200                 | 190                      | 10                     | 5%                      |
| FWB200504 | 400                 | 398                      | 2                      | 0,5%                    |

Mặc dù ý nghĩa của thể khảm với cơ thể còn chưa rõ ràng, phụ thuộc nhiều vào vị trí cũng như tỷ lệ khảm dòng bất thường [4], nhưng việc phát hiện và ghi nhận các trường hợp khảm dòng như thể này, đặc biệt là khảm dòng tỷ lệ thấp (dưới 10%) sẽ là một yếu tố góp phần vào quyết định điều trị đúng của bác sĩ lâm sàng. Cho đến thời điểm này, lai huỳnh quang tại chỗ vẫn đang là lựa chọn hàng đầu trong trường hợp cần đánh giá nhanh, chính xác các thay đổi về số lượng bản sao của nhiễm sắc thể hay gen.

Một trong số các thách thức đảm bảo chất lượng lai huỳnh quang tại chỗ là việc xử lý tốt tế bào máu không qua nuôi cấy. Khác với dịch ối, trong máu ngoại vi có nhiều thành phần tế bào và không phải tế bào giúp cơ thể hoạt động. Các thành phần này có nguy cơ gây nhiễu tín hiệu huỳnh quang và cần được loại bỏ tối đa trước khi lai tế bào với đầu dò huỳnh quang. Đối với mẫu máu không qua nuôi cấy trong nghiên cứu này, việc tối ưu quá trình thu hoạch tế bào có vai trò quyết định. Sau một thời gian nghiên cứu thử nghiệm, thể tích dung dịch nhược trương và thời gian ủ 37°C được chấp nhận lần lượt là

10 ml KCl và 30 phút ủ (trong thời gian ủ cần trộn liên tục dung dịch nhược trương với tế bào). Thể tích dung dịch Carnoy được sử dụng là 7ml và rửa cặn tế bào từ 2 đến 3 lần phụ thuộc vào chất lượng sau mỗi lần rửa. Với quy trình đã được tối ưu đó, việc đánh dấu huỳnh quang vào các vị trí đặc hiệu trên nhiễm sắc thể thông qua kỹ thuật lai tại chỗ đã cho kết quả tốt và ổn định, tín hiệu rõ ràng, không có tín hiệu nhiễu gây nhầm lẫn trong phân tích kết quả.

Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, việc kết luận bất thường di truyền thông qua đánh giá số lượng nhiễm sắc thể số 13, 18, 21 và nhiễm sắc thể giới là không đủ. Đó là khi bất thường xảy ra ở các nhiễm sắc thể khác hay là các bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể. Lúc này kết quả của xét nghiệm lai huỳnh quang tại chỗ này chỉ là bước chẩn đoán ban đầu, giúp khẳng định hoặc loại trừ nhanh hội chứng Down, Patau, Edwards hay bất thường số lượng nhiễm sắc thể giới. Bệnh nhân vẫn cần được phân tích nhiễm sắc thể đồ từ tế bào máu để xác định các bất thường khác (nếu có).

## V. KẾT LUẬN

Việc triển khai kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ trên tế bào máu ngoại vi không qua nuôi cấy đã được thực hiện thành công tại khoa Di truyền và Sinh học Phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương. Kỹ thuật này đã giúp đưa ra câu trả lời nhanh chóng (trong vòng 24 giờ) và phát hiện các dạng bất thường khó (thể khảm tỉ lệ thấp dưới 10%) về lệch bội các nhiễm sắc thể số 13, 18, 21 và nhiễm sắc thể giới, góp phần vào việc quyết định hướng điều trị phù hợp cho bệnh nhân.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Howard Cuckle, Svetlana Arbuzova (2019), “Epidemiology and Genetics of Human Aneuploidy”, chapter 24, book “Human Reproductive and Prenatal Genetics”, Elsevier publisher, 529–551.
2. David S. Cooper, Kyle W. Riggs, Farhan Zafar, Jeffrey P. Jacobs, Kevin D. Hill, Sara K. Pasquali, Sara K. Swanson, Sarah K. Gelehrter, Amelia Wallace, Marshall L. Jacobs, David L. S. Morales, Roosevelt Bryant (2019), “Cardiac Surgery in Patients With Trisomy 13 and 18: An Analysis of The Society of Thoracic Surgeons Congenital Heart Surgery Database”, Journal of the American Heart Association, 8 (13), e012349.
3. Spinner NB, Conlin LK (2014), “Mosaicism and clinical genetics”, American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars In Medical Genetics), 9999, 1–9.
4. Tyl H. Taylor, Susan A. Gitlin, Jennifer L. Patrick, Jack L. Crain, J. Michael Wilson, and Darren K. Griffin (2014), “The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans”, Human Reproduction Update, 20 (4), 571–581.

## X-LINKED ADRENOLEUKODYSTROPHY - CHẨN ĐOÁN CẦN THIẾT Ở TRẺ SUY THƯỢNG THẬN

Nguyễn Thu Hà\*, Vũ Chí Dũng\*

### TÓM TẮT

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) là bệnh lý di truyền do đột biến trên gen ABCD1. Bệnh gây tổn thương chủ yếu đến vỏ thượng thận và hệ thần kinh. **Mục tiêu:** Mô tả đặc điểm lâm sàng, xét nghiệm sinh hoá và kiểu gen của gia đình bệnh nhân suy thượng thận do X-ALD. **Đối tượng và phương pháp:** 3 trẻ trai từ một gia đình. Nghiên cứu một loạt ca bệnh. **Kết quả:** Bệnh nhân 1 là trẻ trai 14 tuổi, sạm da từ nhỏ. Xét nghiệm Cortisol thấp, ACTH tăng cao, MRI não không có tổn thương. Bệnh nhân được điều trị bằng Hydrocortisol và có đáp ứng tốt. Bệnh nhân 2 là trẻ trai 11 tuổi, chưa có biểu hiện lâm sàng. Bệnh nhân 3 là trẻ trai 9 tuổi, có biểu hiện sạm da nhẹ. Xét nghiệm Cortisol máu bình thường, ACTH tăng nhẹ. Cả 3 bệnh nhân đều được chẩn đoán xác định bằng phân tích đột biến trên gen ABCD1, tìm thấy đột biến gây bệnh c.1553G>A (p.Arg518Gln). **Kết luận:** X-ALD là một trong các nguyên nhân gây suy thượng thận nguyên phát ở trẻ trai. Chẩn đoán kịp thời X-ALD có ý nghĩa lớn trong tiên lượng, điều trị những trường hợp có tổn thương não sớm và tư vấn di truyền.

**Từ khóa:** Loạn dưỡng não chất trắng thượng thận, gen ABCD1.

### SUMMARY

#### ADRENAL INSUFFICIENCY IN PATIENTS WITH X-LINKED ADRENOLEUKODYSTROPHY

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is caused by a defect in the gene ABCD1. The disease is characterized by progressive neurologic dysfunction, occasionally associated with adrenal insufficiency. **Objective:** To describe the clinical, laboratory, mutation analysis of Addison patients due to X-ALD. **Patients & Method:** 3 boys from an unconsanguinity family. This is a case series study. **Results:** the proband is a boy of 14 years old, came to our clinic cause of hyperpigmentation. Biochemistry investigations showed low serum Cortisol, very high levels of ACTH, no white matter lesion in brain MRI. Second child is a boy of 11 years old, no clinical symptoms. Biochemistry profile showed normal serum levels of Cortisol and ACTH, brain MRI was normal. Third child is a boy of 9 years old. On first examination, he had mild hyperpigmentation. The investigations indicated normal level of serum Cortisol, mild elevation of ACTH level, no white matter lesion in brain MRI. All of these patients have pathogenic mutation in ABCD1 gene (c.1553G>A). **Conclusion:** X-ALD is one of the etiologies of primary adrenal insufficiency in boys. Early diagnosis plays an important role in prognosis, treatment of cases which have cerebral involvement and genetic counseling.

**Keywords:** X-linked adrenoleukodystrophy, ABCD1 gene

---

\*Bệnh viện Nhi Trung Ương

Chịu trách nhiệm chính: Vũ Chí Dũng

Email: dungvu@nch.org.vn

Ngày nhận bài: 1.10.2020

Ngày phản biện khoa học: 10.10.2020

Ngày duyệt bài: 18.11.2020

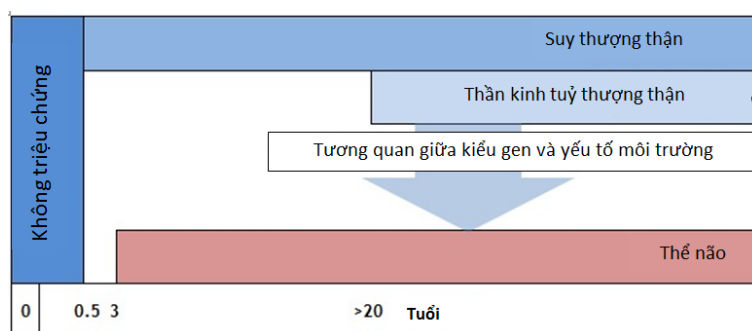
## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

X-linked Adrenoleukodystrophy là bệnh lý di truyền do đột biến gen ABCD1, gen mã hoá protein ALD. Protein ALD giúp đưa các acid béo chuỗi rất dài (VLCFA) vào trong peroxisome, có thể giống các Co-A ester. Vì thế bất cứ đột biến nào trên gen ABCD1 gây mất chức năng của protein ALD có mặt ở màng peroxisome đều dẫn tới suy giảm bất thường quá trình  $\beta$ -oxy hóa VLCFA và gây tích lũy acid béo này ở tất cả các mô. Rối loạn trên chủ yếu ảnh hưởng đến vỏ thượng thận và hệ thần kinh [1]. Ở tuyến thượng thận, nồng độ VLCFA cao bất thường có thể trực tiếp làm thay đổi chức năng tế bào bằng cách ức chế tác động của hormone vỏ thượng thận (ACTH) lên các tế bào vỏ thượng thận, hoặc gián tiếp khởi đầu phản ứng tự miễn dịch [2]. Tỷ lệ mắc bệnh khoảng 1:17000 (cả nam và nữ) [3].

Trên hình ảnh giải phẫu bệnh, VLCFA bị ứ đọng nhiều ở vỏ thượng thận của bệnh

nhân mắc X-ALD, đặc biệt là ở lớp lưới và lớp bó, và ứ đọng mức độ tương đối ở lớp cầu. Các tế bào vỏ thượng thận dưới kính hiển vi trở nên bóng và có khía do sự tích tụ của các lamellae và lamellar-lipid, bao gồm các phân tử cholesterol ester hóa cùng với VLCFA bão hòa. Những đặc điểm này cũng đã xuất hiện từ trong thời kỳ bào thai, cho thấy sự tích lũy VLCFA đã có từ trong thai kỳ [4].

Lâm sàng của X-ALD đa dạng và gồm nhiều thể bệnh khác nhau, hiện chưa tìm thấy mối liên quan nào giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh. X-ALD có thể chia thành 4 nhóm chính sau: thể não trẻ em (37%), thể thần kinh tuỷ thượng thận (32%), thể Addison đơn thuần (13%) và thể không triệu chứng (hình 1). Thể não gặp ở hơn nửa số bệnh nhân X-ALD và thường gặp vào thời thơ ấu [3].



**Hình 1. Các thể lâm sàng của X-ALD**

Tỷ lệ mắc suy thượng thận nguyên phát ở nam giới mắc X-ALD đã được báo cáo là 50-86% [3]. Tỷ lệ suy thượng thận ở CALD trẻ nhỏ cao hơn ở thể AMN. Trong khi có các bệnh nhân có cả tổn thương thần kinh hoặc suy thượng thận, một số khác có tổn thương cả 2 cơ quan. Các bệnh nhân có kiểu hình suy thượng thận đơn thuần là các bệnh nhân

không có triệu chứng thần kinh; tuy nhiên, do tính chất tiến triển của bệnh, nhiều người trong nhóm này sau đó sẽ xuất hiện thêm các triệu chứng thần kinh. Các xét nghiệm sinh hóa của suy thượng thận có thể xuất hiện hai năm trước khi xuất hiện các triệu chứng lâm sàng và bệnh nhân nam nhỏ tuổi nhất được phát hiện suy thượng thận dưới lâm sàng là 5

tháng tuổi [4]. Nồng độ ACTH tăng cao và Cortisol thấp là thường gặp nhất. Giảm aldosterol gây mất muối rất ít gặp, đáp ứng của aldosterone với ACTH bị suy yếu có thể gặp ở 1/3 nam giới bị X-ALD. Một số nam giới có đột biến gen ABCD được báo cáo là có bất thường về xét nghiệm sinh hóa nhưng không có đặc điểm lâm sàng của suy thượng thận. Hầu hết những người có suy tuyến thượng thận đơn thuần đều phát triển AMN ở tuổi trung niên.

Bệnh Addison có thể hiếm gặp ở phụ nữ dị hợp tử với X-ALD (<1%) và ít gặp hơn so với hội chứng giống AMN, gặp ở khoảng 50% phụ nữ ở độ tuổi trung niên. Mặc dù rất hiếm khi phụ nữ dị hợp tử biểu hiện suy tuyến thượng thận rõ rệt trên lâm sàng, tuy nhiên các nghiên cứu giải phẫu bệnh cho thấy những bất thường ở tuyến thượng thận cũng giống như ở nam giới bị bệnh [4].

Chẩn đoán xác định bệnh X-ALD dựa vào xét nghiệm sinh hoá và phân tích đột biến trên gen ABCD1. Để chẩn đoán bệnh ở nam giới, cần định lượng acid béo chuỗi rất dài trong máu, cho thấy nồng độ cao bất thường của C26:0 và tỷ lệ cao bất thường của C24:0 và C26:0 so với C22:0 [2].

X-ALD là bệnh di truyền hiếm gặp. Để chẩn đoán chính xác, điều trị hiệu quả thì bên cạnh phân tích lâm sàng, cận lâm sàng, xét nghiệm gen ABCD1 là quan trọng. Với thực tế trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu:

Mô tả đặc điểm lâm sàng, xét nghiệm sinh hoá và kiểu gen của gia đình bệnh nhân suy thượng thận do X-ALD.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu gồm 3 bệnh nhân trong một gia đình, được chẩn đoán suy thượng thận nguyên phát dựa trên biểu hiện

sạm da nặng, nồng độ Cortisol trong máu thấp và nồng độ ACTH tăng rất cao, đáp ứng điều trị tốt với Hydrocortisol. Nghiên cứu được tiến hành tại khoa Nội tiết – Chuyển hóa – Di truyền, bệnh viện Nhi Trung ương.

Nghiên cứu ca bệnh bao gồm khai thác phá hệ di truyền, tiền sử, bệnh sử, thăm khám lâm sàng toàn diện, theo dõi đáp ứng điều trị. Các xét nghiệm hóa sinh bao gồm: nồng độ Cortisol, ACTH, điện giải đồ, chụp cộng hưởng từ sọ não. DNA được chiết tách từ máu ngoại vi và được giải trình tự toàn bộ vùng gen biểu hiện tìm đột biến gây bệnh.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### Ca lâm sàng:

Gia đình gồm 3 con trai và 1 con gái. Bệnh nhân 1 là con thứ nhất của gia đình, trẻ 14 tuổi, đến khám vì triệu chứng sạm da. Triệu chứng sạm da xuất hiện từ khi trẻ còn nhỏ, tuy nhiên gia đình không phát hiện vì nghĩ đây là màu da bình thường. Tuy nhiên tình trạng sạm da ngày càng tăng. Gần đây trẻ hay cảm thấy mệt, và hay bị “ôm”, nên gia đình đưa trẻ đi khám tại phòng khám nội tiết nhi. Trong tiền sử, trẻ không có các đợt hôn mê, thèm muối hay các triệu chứng nôn và buồn nôn không xảy ra thường xuyên. Bệnh nhân học lớp 9, học lực trung bình, gần đây học kém tập trung do hay mệt. Không có chậm phát triển tinh thần - vận động được ghi nhận. Tiền sử gia đình bên mẹ không có có bệnh lý sạm da hay các bất thường về thần kinh.

Khám lâm sàng bệnh nhân thấy có tình trạng sạm da toàn thân và niêm mạc mức độ nặng. Trẻ phát triển chiều cao tốt: 156cm (-1,5SD WHO), thể trạng gầy BMI: 16,4kg/m<sup>2</sup> (~-2SD WHO). Đánh giá phát triển tâm thần tốt với IQ 100. Đánh giá mức độ dậy thì: Chiều dài dương vật 7cm, thể tích tinh hoàn

12 ml đều 2 bên, lông mu P3.

Các xét nghiệm sinh hoá cho thấy ACTH tăng rất cao, trong khi nồng độ Cortisol vẫn bình thường (bảng 1). Bệnh nhân không có tình trạng mất muối, điện giải đồ trong giới hạn bình thường. Các xét nghiệm khác như chức năng gan, thận trong giới hạn bình thường. Kết quả siêu âm ổ bụng đánh giá tuyến thượng thận 2 bên bình thường. Cộng hưởng từ sọ não không thấy tổn thương chất trắng 2 bên (hình 2), cộng hưởng từ cột sống không có bất thường tín hiệu. Bệnh nhân

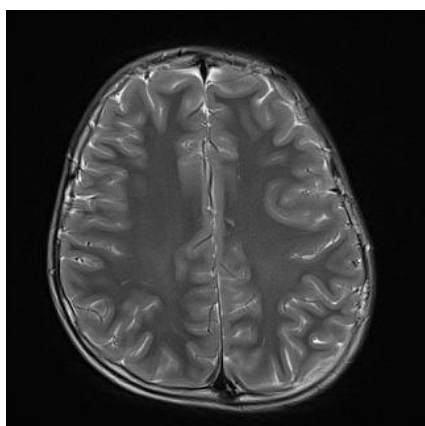
được chẩn đoán xác định X-ALD bằng xét nghiệm giải trình tự gen thế hệ mới, phát hiện được đột biến c.1553G>A (p.Arg518Gln) trên gen ABCD1. Đây là đột biến sai nghĩa làm thay đổi acid amin thứ 518, thay Arginine bằng Glutamin. Đột biến này đã được phân loại có tính chất gây bệnh (ClinVar) do làm thay đổi cấu trúc hoặc chức năng protein ALD. Bệnh nhân được điều trị bằng Hydrocortisol uống liều 15mg/m<sup>2</sup> da. Đáp ứng chức năng tuyến thượng thận của bệnh nhân được ghi nhận ở bảng 2.

**Bảng 1. Xét nghiệm chức năng vỏ thượng thận lúc chẩn đoán**

|             | Cortisol (nmol/l) | ACTH (pg/ml) |
|-------------|-------------------|--------------|
| Bệnh nhân 1 | 132,9             | 185,5        |
| Bệnh nhân 2 | 145               | 16,89        |
| Bệnh nhân 3 | 163               | 34,86        |

**Bảng 2. Theo dõi chức năng vỏ thượng thận của bệnh nhân**

|              | Cortisol (nmol/l) | ACTH (pg/ml) | Natri / Kali / Clo (mmol/l) |
|--------------|-------------------|--------------|-----------------------------|
| Sau 2 tháng  | 42,9              | 14,4         | 139/3,7/103                 |
| Sau 8 tháng  | 84                | > 440        | 140/ 3,5/106                |
| Sau 10 tháng | 12,89             | 40,14        | 141/3,3/105                 |



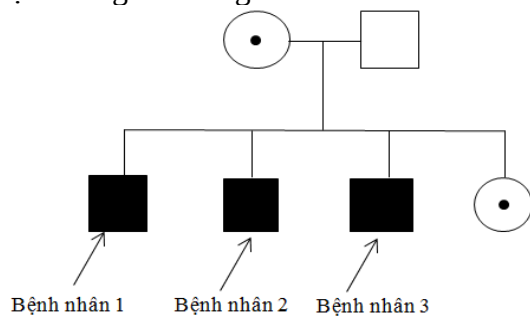
**Hình 2. MRI sọ não của bệnh nhân chưa có tổn thương chất trắng**

Sau khi bệnh nhân được chẩn đoán xác định là X-ALD, các thành viên khác trong gia đình được khám sàng lọc và chẩn đoán.

Bệnh nhân 2 là con thứ 2 trong gia đình, hiện tại 11 tuổi. Trẻ không có biểu hiện sạm da, phát triển tinh thần - vận động bình thường, học tập tốt. Hiện không có các triệu chứng thần kinh bất thường. Trẻ phát triển chiều cao tốt: 136cm (-1,1SD WHO), thể trạng gầy BMI: 16,2kg/m<sup>2</sup> (-1 → -2SD WHO). Bệnh nhân được đánh giá chức năng vỏ thượng thận thấy ACTH và Cortisol trong ngưỡng bình thường. Cộng hưởng từ sọ não chưa phát hiện bất thường. Đột biến c.1553G>A (p.Arg518Gln) trên gen ABCD1 đã được xác định trên bệnh nhân này bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới.

Bệnh nhân 3 là con trai thứ 3 trong gia đình, hiện tại 9 tuổi. Trẻ có biểu hiện sạm da nhẹ, chủ yếu ở các nếp gấp khuỷu tay, núm vú. Trẻ phát triển tâm thần - vận động bình thường. Hiện tại bệnh nhân học tập tốt, không có triệu chứng hay mệt, nôn hay thèm muối. Tại thời điểm thăm khám không phát hiện các triệu chứng thần kinh bất thường. Trẻ phát triển thể chất tốt, chiều cao: 133cm (-0,9SD), BMI: 16,4 (~ 0SD). Bệnh nhân được đánh giá chức năng vỏ thượng thận thấy ACTH tăng nhẹ và Cortisol trong ngưỡng bình thường. Cộng hưởng từ sọ não chưa phát hiện bất thường. Đột biến c.1553G>A (p.Arg518Gln) trên gen ABCD1 đã được xác định trên bệnh nhân này bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới. Bệnh nhân được bắt đầu điều trị bằng Hydrocortisol uống ngay sau khi có chẩn đoán xác định.

Ngoài ra mẹ bệnh nhân và em gái thứ 4 của bệnh nhân cũng được xác định là người nữ mang gen và hiện chưa xuất hiện bất kỳ triệu chứng lâm sàng nào.



**Hình 3. Phả hệ gia đình bệnh nhân**

#### IV. BÀN LUẬN

Suy thượng thận nguyên phát, hay còn gọi là bệnh Addison, là bệnh lý do tổn thương vỏ thượng thận đơn độc, có thể do nguyên nhân di truyền, hoặc có thể do mắc phải. Tần

suất mắc bệnh hiện chưa rõ, tuy nhiên tỉ lệ căn nguyên gây bệnh đã được xác định qua các nghiên cứu. Ở Montreal (Canada) từ 1981 - 2001, có 113 bệnh nhân suy thượng thận nguyên phát (48 nam), trong đó tăng sản thượng thận bẩm sinh (TSTTBS) là thường gặp nhất, chiếm 71,8%, nguyên nhân tự miễn chiếm 13%, bệnh lý peroxisome chiếm 5% (trong đó có X-ALD) [6]. Ở Texas (Mỹ) trong 10 năm từ 1999 -2010 có 77 bệnh nhân suy thượng thận nguyên phát, trong đó TSTTBS chiếm 45,5%, tự miễn chiếm 23,4%, riêng X-ALD chiếm khoảng 4% [7].

Gen ABCD1 nằm trên nhiễm sắc thể X, tại vị trí Xq28, được tìm ra lần đầu tiên năm 1981. Gen có 10 exon, mã hoá cho RNA thông tin dài 4,3kb và protein ALD có 745 acid amin. Kể từ khi xác định được gen ABCD1 cho đến nay, người ta đã tìm thấy 2875 đột biến khác nhau (cập nhật đến tháng 3 năm 2020). Trong số các đột biến này, 1779 (62%) là đột biến sai nghĩa, 469 (16%) đột biến dịch khung, 283 (10%) đột biến vô nghĩa, 103 (4%) đột biến làm thêm/mất acid amin và 85 (3%) đột biến mất đoạn lớn có thể chứa một hoặc nhiều exon, 120 (4%) đột biến tại vị trí ghép nối (splice site). Đột biến c.1553G>A (p.Arg518Gln) là một trong những đột biến phổ biến nhất hiện nay [8].

Jorge và cộng sự đã chẩn đoán X-ALD ở 10/37 bệnh nhân mắc bệnh Addison từ vô căn (27%) và thấy rằng 100% ở trẻ bị suy thượng thận trước 7,5 tuổi là X-ALD. Trong một nghiên cứu đa trung tâm khác, các tác giả đã công bố tỉ lệ suy thượng thận trong X-ALD lên tới 80% và nguy cơ xuất hiện suy thượng thận thay đổi trong suốt cuộc đời bệnh nhân nhưng cao nhất trong những năm

đầu đời. Điều này đặc biệt quan trọng khi theo dõi các bệnh nhân X-ALD không triệu chứng. Theo đó, nồng độ ACTH và Cortisol trong huyết tương có thể bất thường trước khi có các triệu chứng lâm sàng. Tuy nhiên khoảng thời gian đi trước đó kéo dài bao lâu thì chưa có nghiên cứu nào chỉ ra được. Nồng độ các VLCFA trong huyết tương không liên quan đến nguy cơ tiến triển thành suy thượng thận, bệnh lý thần kinh tuỷ, hay tổn thương não. Tuy nhiên, nguy cơ xuất hiện suy thượng thận có liên quan đến tuổi, sau 40 tuổi tỉ lệ này chỉ còn 5,6%. Do đó khuyến cáo nên đánh giá chức năng tuyến thượng thận từ 4 - 6 tháng /lần với trẻ dưới 10 tuổi, 1 năm/lần từ 10 tuổi đến 40 tuổi.

Ca bệnh này nêu bật lên vai trò của chẩn đoán các bệnh lý peroxisome trong đó chủ yếu là X-ALD ở những bệnh nhân có kiểu hình suy thượng thận đơn thuần, không có triệu chứng thần kinh. Việc chẩn đoán sớm có tầm quan trọng lâm sàng lớn, vì chẩn đoán kịp thời X-ALD có ý nghĩa sâu sắc đối với tiên lượng, điều trị và tư vấn di truyền. Do đó, điều quan trọng là sàng lọc X-ALD được thực hiện ở tất cả các bệnh nhân nam mắc bệnh Addison vô căn. Sự cần thiết phải làm như vậy đặc biệt có liên quan ở những bệnh nhân suy thượng thận nguyên phát được biểu hiện trước 7,5 tuổi.

Để chẩn đoán xác định X-ALD, bên cạnh định lượng các VLCFA trong huyết tương, việc phân tích gen ABCD1 để tìm các đột biến gây bệnh là điều cần thiết. Với điều kiện hiện tại ở Việt Nam, chúng tôi chưa định lượng được các VLCFA nên bệnh nhân được làm phân tích gen ngay khi được chẩn đoán Addison bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ

mới. Xét nghiệm phân tích phân tử không chỉ giúp khẳng định chẩn đoán, hơn nữa còn giúp xác định người nam chưa có triệu chứng (bệnh nhân 2) để tiếp tục theo dõi và điều trị kịp thời khi xuất hiện triệu chứng sớm và người nữ mang gen trong gia đình (như mẹ và em gái của bệnh nhân) để tư vấn di truyền.

Tất cả các bệnh nhân sau được chẩn đoán xác định X-ALD nên được kiểm tra MRI não. Các tổn thương có thể gặp ở nhóm bệnh nhân thể não như tổn thương chất trắng đối xứng hai bên ở vùng đỉnh chẩm ở giai đoạn sớm (chủ yếu ở trẻ em). Việc theo dõi tiến triển của tổn thương thần kinh trên MRI sọ não là cần thiết. Do đó với những bệnh nhân trên 12 tuổi, kiểm tra định kỳ mỗi 1 năm/lần, bệnh nhân dưới 12 tuổi, kiểm tra mỗi 6 tháng/lần để phát hiện sớm các tổn thương chất trắng tiến triển, từ đó có thể tiến hành các biện pháp can thiệp điều trị như ghép tế bào gốc tạo máu. Lưu ý rằng các triệu chứng thần kinh luôn đi sau các bất thường tín hiệu trên MRI sọ não và thời gian từ khi khởi phát suy thượng thận đến khi có triệu chứng thần kinh rất thay đổi, thậm chí có thể sau 32 năm. Cho đến nay các tác giả vẫn chưa tìm thấy mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình ở nhóm bệnh nhân này, do đó không thể chỉ dựa vào kiểu gen để nhận định diễn biến của bệnh.

Điều trị glucocorticoid thay thế là cần thiết ở các bệnh nhân X-ALD có suy thượng thận. Bệnh nhân 1 sau khi được điều trị, da đỡ sạm nhiều, trở nên nhanh nhẹn hơn, kết quả học tốt hơn, các xét nghiệm sinh hoá sau điều trị được mô tả trong bảng 2. Ở trẻ đang phát triển, Hydrocortisol được ưu tiên sử dụng, vì

nó có ít tác dụng phụ hơn đặc biệt là đối với tăng trưởng khi so sánh với dexamethasone. Liều dùng khuyến cáo là 8 - 12mg/m<sup>2</sup> da chia 3 lần/ngày. Việc theo dõi điều trị glucocorticoid luôn là một thách thức với các bác sĩ lâm sàng. Nếu chỉ dựa vào nồng độ ACTH đôi khi có thể gây hội chứng Cushing, do vậy cần phải kết hợp cả các triệu chứng lâm sàng. Thiếu hụt mineralcorticoid rất ít gặp trong X-ALD, tuy nhiên vẫn cần phải theo dõi và kiểm tra định kì (điện giải đồ, hoạt độ renin, nồng độ aldosterol máu) và điều trị khi cần.

## V. KẾT LUẬN

Hầu hết các bệnh nhân X-ALD đều có suy thượng thận. Do đó trên các bệnh nhân suy thượng thận nguyên phát cần phải sàng lọc và chẩn đoán X-ALD. Chẩn đoán sớm là yếu tố quyết định kết quả trong điều trị ghép tế bào gốc tạo máu ở bệnh nhân X-ALD thể não và thể thần kinh tuỷ. Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới cho các bệnh nhân suy thượng thận giúp tìm đột biến gây bệnh trên gen ABCD1, từ đó giúp theo dõi tiến triển, can thiệp điều trị và tư vấn di truyền.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nascimento M., Rodrigues N., Espada F. et al (2012). Adrenoleukodystrophy: a forgotten diagnosis in children with primary Addison's disease. BMJ Case Rep.
2. Engelen M., Kemp S., de Visser M. et al (2012). X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. Orphanet J Rare Dis. 7:51.
3. Kaltsas G.K.G. (2018). Adrenal Insufficiency Due to X-Linked Adrenoleukodystrophy. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278944/>.
4. Dubey P., Raymond G.V., Moser A.B. et al (2005). Adrenal insufficiency in asymptomatic adrenoleukodystrophy patients identified by very long-chain fatty acid screening. J Pediatr. 146(4):528-32.
5. Powers J.M., Moser H.W., Moser A.B. et al (1987). Pathologic findings in adrenoleukodystrophy heterozygotes. Arch Pathol Lab Med. 111(2):151-3.
6. Perry R., Kecha O., Paquette J. et al (2005). Primary adrenal insufficiency in children: twenty years experience at the Sainte-Justine Hospital, Montreal. J Clin Endocrinol Metab. 90(6):3243-50.
7. Hsieh S., White P.C. (2011). Presentation of primary adrenal insufficiency in childhood. J Clin Endocrinol Metab. 96(6):E925-8.
8. info T.A. Mutation statistics <https://adrenoleukodystrophy.info/2020>

## GIÁ TRỊ SÀNG LỌC TRƯỚC SINH HỘI CHỨNG DOWN Ở CÁC THAI PHỤ THỰC HIỆN CẢ HAI XÉT NGHIỆM DOUBLE TEST VÀ TRIPLE TEST

Hoàng Thu Lan, Lương Thị Lan Anh, Hoàng Thị Ngọc Lan,  
Trần Đức Phấn, Lã Đình Trung, Phạm Tiến Dương(\*)

### TÓM TẮT

Sàng lọc trước sinh giúp sàng lọc ra nhóm thai phụ nguy cơ cao (NCC), có rất nhiều nghiên cứu đánh giá đơn lẻ các xét nghiệm huyết thanh mẹ để sàng lọc dị tật thai nhi trong ba tháng đầu hoặc ba tháng giữa. Tuy nhiên giá trị của xét nghiệm sàng lọc từ huyết thanh mẹ ở các thai phụ làm cả hai xét nghiệm Double Test và Triple Test là như thế nào: tỷ lệ chọc ối, tỷ lệ thai thực sự bất thường là bao nhiêu còn là một câu hỏi cần giải đáp. **Mục tiêu nghiên cứu:** 1. Phân tích kết quả sàng lọc Double Test, Triple Test trong phát hiện thai nguy cơ cao hội chứng Down. 2. Đánh giá giá trị của xét nghiệm sàng lọc HC Down ở các thai phụ thực hiện cả hai xét nghiệm Double Test và Triple Test. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 556 thai phụ làm cả 2 xét nghiệm Double Test và Triple Test từ tháng 8 năm 2016 đến tháng 2 năm 2019 tại trung tâm tư vấn di truyền - Bệnh Viện Đại học Y Hà Nội. **Kết quả nghiên cứu:** Tỷ lệ thai phụ NCC cả 2 lần xét nghiệm: 8,3%. Tỷ lệ thai mắc hội chứng Down trong nhóm thai phụ NCC cả 2 lần xét nghiệm qua chọc ối và xét nghiệm NIPT: 19,6%. Tỷ lệ thai mắc hội chứng Down trong nhóm NCC cả 2 lần xét nghiệm không chọc ối: 2,2%. **Kết luận:** Các thai phụ nên xét nghiệm sàng lọc từ huyết thanh mẹ cho cả 2 giai đoạn ba tháng

đầu và ba tháng giữa. Tất cả các thai phụ có NCC sinh con bất thường nhiễm sắc thể cần phải được thực hiện các kỹ thuật xác định cho thai.

**Từ khóa:** Sàng lọc trước sinh ba tháng đầu, ba tháng giữa, chọc ối, NIPT.

### SUMMARY

#### EVALUATION OF THE VALUE OF MATERNAL SERUM TEST IN BOTH THE FIRST AND SECOND TRIMESTER FOR DOWN SYNDROME

Prenatal screening helps to screen high-risk fetal defect, there are many studies evaluating single maternal serum tests in the first or second trimester. However, How is the value of the maternal serum screening test on pregnant women in the first and the second trimester. How is ratio of amniocentesis and non-amniocentesis and how are the chromosomal abnormalities in these groups. **Objectives:** 1. To analyze the results of Double Test and Triple Test in detecting the risk of fetal abnormalities. 2. Evaluate the value of screening test on pregnant women performing both of Double Test and Triple Test. **Subjects and methods:** 556 pregnant performing both of Double Test and Triple Test from August 2016 to February 2019 at the genetic counseling center - Hanoi Medical University Hospital. **Results:** Ratio of high risk in group pregnancy tested both of Double Test and Triple Test: 8.3%. The rate of fetal with Down syndrome in these group with amniocentesis or NIPT test: 19.6%, non amniocentesis is: 2.2%. **Conclusion:** Pregnancy

\*Trường Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Hoàng Thu Lan

Email: hoangthulan@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 10.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 14.10.2020

Ngày duyệt bài: 18.11.2020

should do maternal serum screening both first and second trimester. All of pregnancy are high risk of having Down's syndrome to be followed by diagnostic techniques.

**Key words:** Prenatal screening, Amniocentesis, NIPT.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, hiện nay sàng lọc huyết thanh mẹ đã trở thành thường quy trong cộng đồng. Người dân đã có nhiều kiến thức về sàng lọc dị tật thai nhi trước khi sinh và chủ động đến các cơ sở y tế để tầm soát dị tật. Vì vậy việc tối ưu hóa các xét nghiệm sàng lọc để tăng được giá trị trong phát hiện dị tật thai nhi là vô cùng quan trọng. Có rất nhiều nghiên cứu đánh giá đơn lẻ các xét nghiệm huyết thanh mẹ để sàng lọc dị tật thai nhi trong ba tháng đầu hoặc ba tháng giữa [1], [2], [4]. Tuy nhiên cũng có lúc kết quả sàng lọc còn bỏ sót chưa sàng lọc được nhiều trường hợp và cũng có lúc kết quả lại dẫn đến tỷ lệ thai phụ phải chọc ối cao nhưng tỷ lệ dị tật thực sự của thai lại thấp. Cũng chưa có nghiên cứu nào đánh giá giá trị của xét nghiệm trên các đối tượng thai phụ làm xét nghiệm ở cả 2 giai đoạn sàng lọc ở 3 tháng đầu (Double Test) và 3 tháng giữa (Triple Test). Vì vậy chúng tôi tiến hành đề tài này với mong muốn sàng lọc được chính xác hơn những thai phụ có nguy cơ cao thực sự mang thai dị tật để chọc ối giảm nguy cơ tai biến cho thai phụ và thai nhi cũng như giảm gánh nặng cho xã hội.

Đề tài của chúng tôi là: “Giá trị sàng lọc trước sinh hội chứng Down ở các thai phụ thực hiện cả hai xét nghiệm Double test và Triple Test.” với 2 mục tiêu:

- *Phân tích kết quả sàng lọc Double Test, Triple Test trong phát hiện thai nguy cơ cao hội chứng Down.*

- *Đánh giá giá trị của xét nghiệm sàng lọc HC Down ở các thai phụ thực hiện cả hai xét nghiệm Double Test và Triple Test.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

556 thai phụ làm sàng lọc cả Double Test và Triple Test. Các thai phụ có kết quả xét nghiệm là NCC sinh con hội chứng Down (HC Down) sẽ được hồi cứu các kết quả chẩn đoán tiếp theo và theo dõi sau sinh. Các thai phụ có kết quả xét nghiệm là nguy cơ thấp (NCT) sẽ được gọi điện theo dõi sau sinh.

**Địa điểm nghiên cứu:** Trung tâm tư vấn di truyền - Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

**Thời gian nghiên cứu:** Từ tháng 8/2016 đến tháng 2/2019.

**Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng nghiên cứu**

Thai phụ tham gia nghiên cứu phải thỏa mãn tất cả các tiêu chuẩn sau:

- Tuổi thai làm xét nghiệm Double Test: 11-13 tuần 6 ngày.
- Tuổi thai làm xét nghiệm Triple Test: 15 tuần - 22 tuần 6 ngày.
- Một thai, thai sống.
- Có kết quả chọc ối hoặc NIPT hoặc theo dõi lâm sàng sau sinh.

### Tiêu chuẩn loại trừ

Các thai phụ bị loại trừ khỏi nghiên cứu khi không thỏa mãn một trong số các tiêu chuẩn trên.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chúng tôi sử dụng phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang, hồi cứu và tiền cứu.

Khảo sát thông qua các dữ liệu của thai phụ được sàng lọc trước sinh bằng xét nghiệm định lượng các dấu hiệu PAPP-A, fb-hCG, uE3, AFP và HCG trong huyết

thanh mẹ bằng máy xét nghiệm Siemens immulite.

Sử dụng phần mềm Prisca để tính nguy cơ

mang thai mắc HC Down, HC Edwards, HC Patau cho từng thai phụ dựa trên ngưỡng sàng lọc, giá trị trung vị do hãng thiết lập.

### III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Kết quả xét nghiệm sàng lọc huyết thanh mẹ

Nghiên cứu được tiến hành trên 556 thai phụ làm cả 2 xét nghiệm Double Test và Triple Test, thu được kết quả theo bảng sau:

**Bảng 3.1:** Kết quả sàng lọc HC Down của các thai phụ

| Nguy cơ sàng lọc                 | Hội chứng Down |            |
|----------------------------------|----------------|------------|
|                                  | Số lượng       | Tỷ lệ (%)  |
| NCC Double Test- NCC Triple Test | 46             | 8,3        |
| NCC Double Test- NCT Triple Test | 63             | 11,3       |
| NCT Double Test- NCC Triple Test | 24             | 4,3        |
| NCT Double Test- NCT Triple Test | 423            | 76,01      |
| <b>Tổng số:</b>                  | <b>556</b>     | <b>100</b> |

Qua bảng 3.1 có thể thấy :

- Tỷ lệ thai phụ có NCC HC Down ở cả 2 test chiếm 8,3%.

#### 3.2. Đánh giá giá trị của sàng lọc huyết thanh mẹ

##### 3.2.1. Kết quả chọc ối và theo dõi sau sinh ở nhóm thai phụ NCC

556 thai phụ được chia làm 2 nhóm:

Nhóm NCC được hỏi cứu kết quả chọc ối, kết quả NIPT (nếu NIPT NCC sẽ được chọc ối phân tích nhiễm sắc thể thai). Tất cả các trường hợp giữ thai đều được gọi điện theo dõi sau sinh.

Nhóm NCT cũng được gọi điện theo dõi sau sinh ở tất cả các thai phụ.

**Bảng 3.2:** Tỷ lệ chọc ối, làm NIPT ở những thai phụ làm cả Double Test và Triple Test

| Nguy cơ sàng lọc                         | Tổng số    | Chọc ối   |             | Làm NIPT  |             | Không chọc ối/<br>Không làm NIPT |           |
|------------------------------------------|------------|-----------|-------------|-----------|-------------|----------------------------------|-----------|
|                                          |            | Số lượng  | Tỷ lệ (%)   | Số lượng  | Tỷ lệ (%)   | Số lượng                         | Tỷ lệ (%) |
| <b>NCC Double Test - NCC Triple Test</b> | 46         | 30        | <b>65,2</b> | 15        | <b>32,6</b> | 1                                | 2,2       |
| <b>NCC Double Test - NCT Triple Test</b> | 63         | 13        | 20,6        | 2         | 3,2         | 48                               | 76,2      |
| <b>NCT Double Test - NCC Triple Test</b> | 24         | 3         | 12,5        | 2         | 8,3         | 19                               | 79,2      |
| <b>Tổng số:</b>                          | <b>133</b> | <b>46</b> |             | <b>19</b> |             | <b>68</b>                        |           |

Qua bảng 3.2 cho thấy:

- Tỷ lệ chọc ối ở nhóm NCC cả 2 test là rất cao chiếm: 65,2%.
- Tỷ lệ làm NIPT ở nhóm NCC cả 2 test là 32,6%.
- Tổng chung tỷ lệ các thai phụ có thực hiện các xét nghiệm tiếp theo để xác định bất thường nhiễm sắc thể là 97,8%.

**Bảng 3.3: Kết quả tổng hợp chọc ối/ NIPT và theo dõi sau sinh của các thai phụ**

| Kết quả theo dõi thai            | Bình thường |           | HC Down  |           | HC Edward |           | Bất thường khác |           | Tổng số |
|----------------------------------|-------------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------------|-----------|---------|
|                                  | Số lượng    | Tỷ lệ (%) | Số lượng | Tỷ lệ (%) | Số lượng  | Tỷ lệ (%) | Số lượng        | Tỷ lệ (%) |         |
| NCC Double Test- NCC Triple Test | 35          | 76,0      | 9        | 19,6      | 1         | 2,2       | 1               | 2,2       | 46      |
| NCC Double Test- NCT Triple Test | 61          | 96,8      | 0        | 0         | 0         | 0         | 2               | 3,2       | 63      |
| NCT Double Test- NCC Triple Test | 20          | 83,3      | 1        | 4,2       | 0         | 0         | 3               | 12,5      | 24      |
| NCT Double Test- NCT Triple Test | 413         | 97,6      | 0        | 0         | 0         | 0         | 10              | 2,4       | 423     |
| <b>Tổng số:</b>                  | 529         |           | 10       |           | 1         |           | 16              |           | 556     |

Qua bảng 3.3 cho thấy:

- Trong 46 thai phụ NCC cả 2 test thì có 9 thai phụ mang thai hội chứng Down chiếm tỷ lệ 19,6%.
- Trong 24 thai phụ NCT Double Test- NCC Triple Test có 1 trường hợp thai bị bất thường NST là HC Down chiếm tỷ lệ 4,2%.

**Bảng 3.4: Kết quả chọc ối/ NIPT và theo dõi sau sinh ở những thai phụ NCC HC Down ở cả 2 xét nghiệm Double Test và Triple Test**

| Kết quả theo dõi thai                | Bình thường |         | Hội chứng Down |         | Hội chứng Edward |         | Bất thường khác |         | Tổng số  |         |
|--------------------------------------|-------------|---------|----------------|---------|------------------|---------|-----------------|---------|----------|---------|
|                                      | Số lượng    | Tỷ lệ % | Số lượng       | Tỷ lệ % | Số lượng         | Tỷ lệ % | Số lượng        | Tỷ lệ % | Số lượng | Tỷ lệ % |
| <b>Chọc ối</b>                       | 24          | 52,1    | 6              | 13,0    | 0                | 0       | 0               | 0       | 30       | 65,1    |
| <b>Làm NIPT</b>                      | 11          | 23,9    | 2              | 4,4     | 1                | 2,2     | 1               | 2,2     | 15       | 32,7    |
| <b>Không chọc ối/ không làm NIPT</b> | 0           | 0       | 1              | 2,2     | 0                | 0       | 0               | 0       | 1        | 2,2     |
| <b>Tổng số:</b>                      | 35          | 76      | 9              | 19,6    | 1                | 2,2     | 1               | 2,2     | 46       | 100     |

Qua bảng 3.4 cho thấy:

- Trong số 46 thai phụ NCC đáng tiếc có 1 thai phụ chiếm tỷ lệ 2,2% sinh con HC Down do không tiến hành các xét nghiệm tiếp theo để xác định thai thực sự có bất thường hay không.

**Bảng 3.5: Phân tích nguy cơ của các thai phụ có thai mắc HC Down**

| Nguy cơ kết hợp thêm             | Số lượng | Tỷ lệ (%)  |
|----------------------------------|----------|------------|
| Sinh hóa kết hợp tuổi mẹ cao     | 3        | 33,3       |
| Theo sinh hóa                    |          |            |
| - Ngưỡng $\geq 1/50$             | 3        | 33,3       |
| - Ngưỡng $< 1/50$ và $> 1/250$   | 1        | 11,1       |
| KSSG ( $\geq 2.5$ cm) + Sinh hóa | 2        | 22,3       |
| <b>Tổng số:</b>                  | <b>9</b> | <b>100</b> |

Qua bảng 3.5 cho thấy:

Trong 10 thai được phát hiện có 9 thai mắc HC Down, trong đó 9 thai có kèm theo các chỉ số sàng lọc khác như tuổi mẹ, KSSG.

**Bảng 3.6. Giá trị của xét nghiệm trong sàng lọc trước sinh HC Down**

| Kết quả sàng lọc | Kết quả NST qua XN chẩn đoán và theo dõi sau sinh |               | Tỷ lệ phát hiện (%) | Tỷ lệ tiên đoán dương tính (%) | Tổng số    |
|------------------|---------------------------------------------------|---------------|---------------------|--------------------------------|------------|
|                  | HC Down                                           | Không HC Down |                     |                                |            |
| NCC cả 2 test    | 9                                                 | 37            | 90                  | 19,6                           | 46         |
| NCC 1 test       | 1                                                 | 86            | 10                  | 1,1                            | 87         |
| <b>Tổng số</b>   | <b>10</b>                                         | <b>123</b>    | <b>100</b>          | <b>20,7</b>                    | <b>133</b> |

Qua bảng 3.6 cho thấy:

- Tỷ lệ phát hiện thai HC Down trong số thai phụ NCC cả 2 test là rất cao:  $9/10 = 90,0\%$ .
- Giá trị tiên đoán dương tính thai HC Down trong số thai phụ NCC cả 2 test là rất cao:  $9/46 = 19,6\%$ .

#### IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành theo dõi sau sinh ở 556 thai phụ có kết quả sàng lọc cả Double Test và Triple Test. Chúng tôi thu thập từ các thai phụ đồng ý tham gia nghiên cứu và loại trừ các trường hợp chủ động đình chỉ thai vì lý do riêng của thai phụ mà không liên quan đến bất thường trong quá trình mang thai. Trong 556 thai phụ tham gia sàng lọc có 46 thai phụ có kết quả sàng lọc NCC HC Down ở cả 2 xét nghiệm Double Test và Triple Test. Chúng

tôi theo dõi được cả 46 trường hợp này phát hiện có 9 thai mắc HC Down, 1 thai mắc HC Edwards, trong đó có 6 thai được chẩn đoán xác định qua chọc ối phân tích NST, 2 thai qua làm NIPT (có chẩn đoán bằng chọc ối), 1 thai chỉ được phát hiện sau sinh do thai phụ không chọc ối, đây là trường hợp rất đáng tiếc, sẽ được bàn luận ở dưới. Như vậy trong nghiên cứu của chúng tôi tỷ lệ thai bất thường NST trong nhóm thai có kết quả sàng lọc dương tính với NCC cả 2 test sàng lọc hay là giá trị tiên đoán dương tính của test

sàng lọc là 19,6% (9/46). Đây là một tỷ lệ rất cao.

Theo Hoàng Thu Lan và cộng sự (2018) [4], tỷ lệ tiên đoán dương tính thai mắc HC Down là 8,4%, khi nghiên cứu trên những thai phụ có NCC Triple Test với ngưỡng sàng lọc HC Down  $\geq 1/50$ .

Theo nghiên cứu của Alexioly E. và cộng sự (2009) [5], tỷ lệ tiên đoán dương tính thai mắc HC Down của dấu hiệu tăng KSSG là 14,8%, nghiên cứu này tiến hành chọn ới ở những thai phụ có NCC Double Test và có tăng KSSG ngưỡng  $\geq 3,0$  mm.

Theo nghiên cứu của Lamlerkittikul S, Chandeying V (2007) [6] tỷ lệ này là 3,4% (4/119), nghiên cứu này tiến hành sàng lọc ở 999 thai phụ với ngưỡng sàng lọc là 1/250.

Nghiên cứu của Hu Z và cộng sự (2014) [7] được thực hiện trên 16000 thai phụ ở Trung Quốc có giá trị tiên đoán dương tính của test sàng lọc HC Down là 1,05% (9/885), nghiên cứu thực hiện trên phần mềm LifeCycle 3.2 với ngưỡng sàng lọc HC Down là 1/270.

Nghiên cứu của Angelova L, và cộng sự (2013) [8] được thực hiện trên 13016 thai phụ có giá trị tiên đoán dương tính của test sàng lọc HC Down là 0,46% (5/1097), nghiên cứu thực hiện trên phần mềm Prisca 3.5 với ngưỡng sàng lọc HC Down là 1/250.

Như vậy so sánh với nhiều nghiên cứu khác nhau trước đó, chúng tôi nhận thấy rằng tỷ lệ thai mắc HC Down trong nhóm thai có kết quả sàng lọc dương tính với cả hai xét nghiệm Double Test và Triple Test cao hơn hẳn so với tỷ lệ thai mắc HC Down trong các nghiên cứu đơn lẻ chỉ Double Test, chỉ Triple Test hoặc kết hợp NCC 3 tháng đầu với tăng KSSG.

Tất cả thai phụ này đều nằm trong nhóm có nguy cơ cao ở cả 2 test, điều này chứng tỏ

rằng nếu có nguy cơ cao cả 2 test thì tỷ lệ phát hiện thai bất thường NST cao hơn rất nhiều. Vì vậy trong quá trình tư vấn về sàng lọc trước sinh cho các thai phụ chúng ta có thể tư vấn cho họ về lợi ích khi làm cả 2 test sàng lọc trong quá trình mang thai, vừa kinh tế mà lại vừa mang lại hiệu quả trong phát hiện thai bất thường NST. Hơn nữa qua nghiên cứu này chúng tôi mạnh dạn đưa ra ý kiến là tư vấn cho thai phụ NCC cả Double Test và Triple Test, nếu NCC cả 2 xét nghiệm này thì có thể chỉ định xét nghiệm NIPT, giá trị phát hiện cũng rất cao. Tránh những trường hợp đáng tiếc như trong nghiên cứu này của chúng tôi có 1 trường hợp NCC cả 2 test nhưng không chọn ới do lo sợ những tai biến của chọn ới dẫn tới việc sinh ra một đứa trẻ Down.

Trong nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy nếu kết quả xét nghiệm cả 2 test NCC lại có thêm một yếu tố tuổi mẹ hay bất thường siêu âm thì nguy cơ thai đó thực sự bất thường nhiễm sắc thể là rất cao, trong số 10 thai HC Down có 9 thai có kèm theo các yếu tố như vậy. Đây cũng là một minh chứng để các bác sĩ kiên quyết hơn với thai phụ trong việc tư vấn cho họ thực hiện chẩn đoán xác định tiếp theo.

Trong 24 thai phụ NCT Double Test - NCC Triple Test có 1 trường hợp thai bị bất thường NST là HC Down, như vậy chúng ta nên tư vấn cho bệnh nhân thực hiện cả 2 xét nghiệm Double Test và Triple Test, NCT Double Test nhưng NCC Triple Test vẫn có khả năng cao thai bất thường NST để bệnh nhân có quyết định đúng trong việc lựa chọn làm tiếp xét nghiệm chẩn đoán và không bỏ sót trường hợp bất thường NST nào.

Ngoài ra, trong quá trình thực hiện nghiên cứu, qua gọi điện theo dõi sau sinh, chúng tôi thấy có khoảng 3% các thai phụ có kết quả

sàng lọc là NCC với Double Test hoặc Triple Test hoặc là NCT cả 2 test, sau khi sinh em bé có bộ NST bình thường nhưng lại có bất thường về hình thái hoặc chức năng, hoặc đột biến gen. Đây là vấn đề cần có nhiều nghiên cứu hơn nữa để có những tư vấn sâu hơn cho các thai phụ khi làm xét nghiệm sàng lọc trước sinh.

## V. KẾT LUẬN

Kết quả của các thai phụ thực hiện cả hai xét nghiệm Double Test và Triple Test:

- Double, Triple đều NCC là 8,3%; Tỷ lệ chọc ối hoặc làm NIPT: 97,8%.
- Double NCC, Triple NCT là 11,3%; Tỷ lệ chọc ối hoặc làm NIPT: 23,8%.
- Double NCT, Triple NCC là 4,3%; Tỷ lệ chọc ối hoặc làm NIPT: 20,8%.
- Double, Triple đều NCT là 76,01%; vẫn có 2,4% bất thường hình thái và chức năng khác được xác định sau sinh.

Giá trị sàng lọc HC Down trên các thai phụ được thực hiện cả hai xét nghiệm Double Test và Triple Test

- Tỷ lệ phát hiện thai HC Down trong số thai phụ NCC cả 2 test là rất cao: 9/10= 90,0%.
- Giá trị tiên đoán dương tính thai HC Down trong số thai phụ NCC cả 2 test là rất cao: 9/46= 19,6%.

Nên tư vấn cho các thai phụ thực hiện cả 2 xét nghiệm Double Test và Triple Test, khi cả 2 test này đều NCC có thể tư vấn xét nghiệm nhiễm sắc thể từ tế bào ối hoặc xét nghiệm NIPT.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ken S. (2007). “The new prenatal screening test” FACOG Obstetrics and Gynecology.

2. Manegold-Brauer G., Kang Bellin A., Hahn S. et al. (2014). “A new era in prenatal care: non-invasive prenatal testing in Switzerland”, Swiss Med Wkly, 144, w13915.
3. Wald NJ, Bestwick JP (2016). “Prenatal reflex DNA screening for Down syndrome: enhancing the screening performance of the initial first trimester test”. Prenat Diagn. 2016;36(4):328. Epub 2016 Feb 28.
4. Hoàng Thu Lan và cộng sự (2018). “Nghiên cứu đánh giá giá trị sàng lọc trước sinh từ huyết thanh mẹ ở thai ba tháng giữa trên nhóm thai phụ có nguy cơ sinh con mắc hội chứng Down  $\geq 1/50$ ”. Tạp chí Y học Việt Nam.
5. Alexioly E., Alexioly E., Trakakis E. and partner (2009). “Predictive value of increased nuchal translucency as a screening test for the detection of fetal chromosomal abnormalities”, J Matern Fetal Neonatal Med, 22(10), 857–862.
6. Hu Z, Liu X, Li L et al (2014). Predict value of abnormal second – trimester maternal serum Triple screening markers for adverse pregnancy outcomes, Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 49(10), 749-753.
7. Lamlertkittukul S, Chandeying V. (2007). “Experience on Triple markers serum screening for Down’s syndrome fetus in Hat Yai, regional Hospital” J Med Assoc Thai, 90 (10), pp. 1970-6.
8. Angelova L., Gadancheva V., Konstantinova D. et al (2013). “Maternal biochemical screening an approach for genetic prevention. Part 1. First and second trimester screening”, Akush Ginekolog, 52 (5), 8 – 13.

## MỐI LIÊN QUAN GIỮA BẤT THƯỜNG NHIỄM SẮC THỂ CỦA THAI TỪ TẾ BÀO ỒI NUÔI CẤY VÀ NHIỄM SẮC THỂ BỐ MẸ

Phan Thị Thu Giang<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hảo<sup>2</sup>, Lê Phương Thảo<sup>1</sup>,  
Ngô Thị Tuyết Nhung<sup>1</sup>, Trần Danh Cường<sup>1,2</sup>, Hoàng Thị Ngọc Lan<sup>1,2</sup>

### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** (1) Tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể (NST) của thai từ tế bào ồi nuôi cấy; (2) Tìm hiểu mối liên quan giữa bất thường cấu trúc NST của thai và NST bố mẹ. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu mô tả hồi cứu trên 143 thai có bất thường nhiễm sắc thể, trong tổng số 1619 thai phụ được phân tích NST từ tế bào ồi nuôi cấy. Nhiễm sắc thể được phân tích và lập karyotype theo tiêu chuẩn quốc tế ISCN 2016 tại Trung tâm chẩn đoán trước sinh – bệnh viện Phụ Sản Trung Ương từ 01/12/2018 đến 20/06/2019. **Kết quả:** Tỷ lệ bất thường NST của thai từ tế bào ồi nuôi cấy: 7,6%. Bất thường cấu trúc NST chiếm 1,5%: chuyển đoạn chiếm tỷ lệ 56% (14/25) (chuyển đoạn cân bằng chiếm 32%, chuyển đoạn không cân bằng chiếm 24%); đảo đoạn NST chiếm (7/25; 28%). Bất thường số lượng NST chiếm 6,1%: thai mắc hội chứng Down chiếm tỷ lệ cao nhất 68,7% (68/99), thai mắc hội chứng Edwards (17,2%; 17/99), thai mắc hội chứng Patau (4%; 4/99). Đa hình 1,2%. Thai bất thường cấu trúc NST: 77,8% có nguồn gốc từ bố hoặc mẹ, 22,2% là đột biến mới phát sinh. **Kết luận:** Cần làm xét nghiệm NST bố mẹ trong trường hợp thai mang bất thường cấu trúc NST.

**Từ khóa:** bất thường cấu trúc NST, chuyển đoạn nhiễm sắc thể, chẩn đoán trước sinh

### SUMMARY

#### RELATIONSHIP BETWEEN CHROMOSOMAL ABNORMALITIES OF FETUS AND THEIR PARENTS

**Abstract:** (1) To describe the chromosomal abnormalities from cultured amniotic cells; (2) To explore the relationship between structural chromosomal abnormalities of fetus and their parents. **Subjects and methods:** The retrospective description study of 1619 pregnancies were subjected to amniocentesis from December 2018 to June 20th 2019, at Center of Prenatal Diagnosis, National Hospital of Obstetrics and Gynecology, followed by amniotic fluid culturing and amniotic cell chromosomes analyzing by the standards of International Conference on Human genetics in 2016 (ISCN). **Results:** The rate of detected abnormalities was 7,6%, structural chromosome abnormalities accounted for 1,5%, chromosome translocation was 56%: including unbalance translocation (24%), and balance translocation (32%), inversion (28%; 7/25). The most common pattern, autosomal aneuploidy, were found in 99 pregnancies (6.1% total patient), of which the majority (68.7%) had Down Syndrome, 17 cases (17.2%) had Edwards Syndrome, and only 4 cases (4%) of Patau Syndrome. Chromosome polymorphism was 1,2%. Structural chromosome abnormalities are mostly inherited (77,8%), only 22,2% of them were de novo. **Conclusion:** Parental chromosome

<sup>1</sup>Bệnh viện Phụ sản Trung Ương,

<sup>2</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Hoàng Thị Ngọc Lan  
Email: hoangthingoclan@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 8.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 12.10.2020

Ngày duyệt bài: 19.11.2020

testing should be performed in the structural chromosomal abnormalities of fetus.

**Keywords:** Amniocentesis, Chromosomal abnormalities, Chromosomal karyotype, Prenatal diagnosis

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bất thường NST có thể xảy ra ở NST thường hay NST giới tính, có thể do đột biến về số lượng hay đột biến cấu trúc NST. Bất thường về NST có thể gây dị tật hình thái và cơ quan trong cơ thể dẫn đến tử vong sớm trước khi sinh, trong hoặc sau khi sinh. Bất thường NST có thể là nguyên nhân của các trường hợp sảy thai, thai lưu liên tiếp. Sàng lọc và chẩn đoán trước sinh sẽ giúp làm giảm tỷ lệ các trẻ mang dị tật bẩm sinh và tử vong chu sinh [1]. Việc phát hiện sớm những thai mang bất thường NST và xác định nguồn gốc NST bất thường có ý nghĩa quan trọng trong tư vấn di truyền cho lần mang thai hiện tại và các lần mang thai sau của bệnh nhân.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

**Bảng 1:** Tỷ lệ bất thường NST từ tế bào ối

Đang 1. Tỷ lệ bất thường NST tế bào ối

| Kết quả                             | NST tế bào ối |                              |      |
|-------------------------------------|---------------|------------------------------|------|
|                                     | n             | % tỷ lệ phát hiện bất thường |      |
| Bình thường                         | 1476          | 91,2%                        |      |
| Bất thường số lượng NST             | 98            | 6,1%                         |      |
| Bất thường cấu trúc NST             | 17            | 1,1                          | 1,5% |
| Đảo đoạn NST số 9                   | 7             | 0,4                          |      |
| Bất thường cấu trúc và số lượng NST | 1             | 0,06                         |      |
| Đa hình                             | 20            | 1,2%                         |      |
| Tổng                                | 1619          | 100%                         |      |

**Nhận xét:** Trong số 1619 trường hợp thai phụ có chọc ối phát hiện thấy có 123 trường hợp có bất thường NST chiếm 7,6% (có 1,5% bất thường cấu trúc NST và 6,1% bất thường số lượng NST). Ngoài ra có 1,2% thai có đa hình NST.

Chính vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu với hai mục tiêu sau:

- Mô tả bất thường NST của thai từ tế bào ối nuôi cấy
- Tìm hiểu mối liên quan giữa bất thường cấu trúc NST của thai và NST bố mẹ.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu:

123 thai có bất thường nhiễm sắc thể, trong tổng số 1619 thai phụ được phân tích NST từ tế bào ối nuôi cấy, phân tích và lập karyotype theo tiêu chuẩn quốc tế ISCN 2016, tại Trung tâm chẩn đoán trước sinh – bệnh viện Phụ Sản Trung Ương từ 01/12/2018 đến 20/06/2019.

**2.2. Phương pháp nghiên cứu:** Mô tả cắt ngang kết hợp hồi cứu.

Thu thập hồ sơ bệnh án phụ nữ mang thai có nguy cơ cao bất thường di truyền, có kết quả karyotype từ tế bào ối nuôi cấy. Số liệu được xử lý bằng phần mềm excel.

**Bảng 2:** Tỷ lệ các dạng bất thường số lượng NST tế bào ối

| Bất thường số lượng NST tế bào ối |                               | Số lượng (n) |   | % (n/) |     | Tổng |
|-----------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--------|-----|------|
| Thuần                             | Trisomy 21                    | 68           |   | 68,7%  |     | 97   |
|                                   | Trisomy 18*                   | 17           |   | 17,2%  |     |      |
|                                   | Trisomy 13                    | 4            |   | 4,0%   |     |      |
|                                   | Trisomy 22                    | 1            |   | 1,0%   |     |      |
|                                   | Tam bội                       | 1            |   | 1,0%   |     |      |
|                                   | 45,X                          | 3            | 6 | 3,0%   | 6,0 |      |
|                                   | 47,XXY                        | 2            |   | 2,0%   |     |      |
|                                   | 47,XYY                        | 1            |   | 1,0%   |     |      |
| Khảm                              | 45,X[33.6%]/46,XX[66.4%]      | 1            |   | 1,0%   |     | 2    |
|                                   | 47,XX,+9[70%]/47,XX,+mar[30%] | 1            |   | 1,0%   |     |      |
| Tổng                              |                               | 99           |   | 100%   |     | 99   |

**Nhận xét:** \* 1 trường hợp này có cả bất thường số lượng và cấu trúc.

Trong số 99 trường hợp thai bất thường số lượng NST, có 97 trường hợp bất thường dạng thuần chiếm 98 % và 2 trường hợp bất thường dạng khảm chiếm 2%. Trong đó thai hội chứng Down chiếm tỷ lệ cao nhất 68,7%, tỷ lệ liên quan đến bất thường NST giới chiếm chung là 6,0%.

**Bảng 3:** Tỷ lệ các dạng bất thường cấu trúc NST tế bào ối

| Các dạng BTCT NST |                                    | N  | %    |       |             |
|-------------------|------------------------------------|----|------|-------|-------------|
| Dạng thuần        | CD cân bằng (CĐCB)                 | 8  | 32%  | 14    | 23<br>(92%) |
|                   | CD không cân bằng (CDKCB)          | 6  | 24%  | (56%) |             |
|                   | Đảo đoạn                           | 7  | 28%  |       |             |
|                   | Chưa rõ nguồn gốc NST              | 1  | 4%   |       |             |
|                   | Cả bất thường số lượng và cấu trúc | 1  | 4%   |       |             |
| Dạng khảm         | CD cân bằng                        | 2  | 8%   |       |             |
| Tổng              |                                    | 25 | 100% |       |             |

**Nhận xét:** Trong số 25 trường hợp bất thường cấu trúc NST tế bào ối có 23 trường hợp dạng thuần và 2 trường hợp dạng khảm. Trong số trường hợp dạng thuần có 8 trường hợp chuyển đoạn cân bằng, 6 trường hợp chuyển đoạn không cân bằng, 7 trường hợp đảo đoạn, 1 trường hợp bất thường cả cấu trúc và số lượng và một trường hợp chưa rõ loại. Dạng khảm là 2 trường hợp chuyển đoạn cân bằng.

**Bảng 4:** Nguồn gốc bất thường cấu trúc NST tế bào ối

| Bất thường cấu trúc NST       | Số lượng |    |       |
|-------------------------------|----------|----|-------|
|                               | n        |    | %     |
| Bất thường có nguồn gốc bố mẹ | 14       | 18 | 77,8% |
| Bất thường mới phát sinh      | 4        |    | 22,2% |
| Bố mẹ không làm               | 7        |    |       |

**Nhận xét:** Trong số 25 trường hợp có bất thường cấu trúc chỉ có 18 trường hợp làm NST bố mẹ, trong đó có 14 (14/18) trường hợp bất thường có nguồn gốc từ bố mẹ chiếm 77,8%, chỉ có 4 (4/18) trường hợp bất thường mới phát sinh chiếm 22,2%, 7 trường hợp bố mẹ không xét nghiệm NST. Chi tiết các dạng đột biến được thể hiện ở bảng dưới đây.

**Bảng 5:** Đối chiếu kết quả NST thai bất thường cấu trúc với karyotyp của bố mẹ

| Các dạng đột biến | Karyotyp của thai                                  | Karyotyp                   |                           |
|-------------------|----------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                   |                                                    | Bố                         | Mẹ                        |
| CĐ cân bằng       | 46,XY,t(3;21)(p21.1;q22.3)                         | 46,XY,t(3;21)(p21.1;q22.3) | 46,XX                     |
|                   | 46,XX,t(8;18)(q22;q14)                             | 46,XY,t(8;18)(q22;q14)     | 46,XX                     |
|                   | 46,XY,t(1;14)(p36;q23)                             | 46,XY,t(1;14)(p36;q23)     | 46,XX                     |
|                   | 46,XY,t(4;12)(q31;q24.3)                           | 46,XY                      | 46,XX,t(4;12)(q31;q24.3)  |
|                   | 46,XX,t(7;21)(q11.1;q21)                           | 46,XY                      | 46,XX,t(7;21)(q11.1;q21)  |
|                   | 46,XX,t(5;15)(p15;q21)                             | 46,XY                      | 46,XX                     |
|                   | 45,XX,rob(13;14)(q10;q10)                          | 45,XY,rob(13;14)(q10;q10)  | 46,XX                     |
|                   | 45,XY,rob(13;14)(q10;q10)                          | 46,XY                      | 46,XX                     |
|                   | 46,XY,t(4;17)(q25;q21)[13]/46,XY[86]               | 46,XY                      | 46,XX                     |
|                   | 46,XY,t(1;5)(p32;p3)[32]/46,XY,t(1;4)(p13;p16)[10] | Không XN                   | Không XN                  |
| CĐ không cân bằng | 46,XY,rob(14;21)(q10;q10),+21                      | 46,XY                      | 45,XX,rob(14;21)(q10;q10) |
|                   | 46,XY,der(13)t(10;13)(q23.2;q12)                   | Không XN                   | Không XN                  |
|                   | 46,XY,rob(14;21)(q10;q10),+21                      | Không XN                   | Không XN                  |
|                   | 46,XY,rob(21;21)(q10;q10)+21                       | Không XN                   | Không XN                  |
|                   | 46,XX,rob(21;21)(q10;q10),+21                      | Không XN                   | Không XN                  |
|                   | 46,XX,rob(21;21)(q10;q10),+21                      | Không XN                   | Không XN                  |
| Đảo đoạn          | 46,XY,inv(9)(p11q13)                               | 46,XY,inv(9)(p11q13)       | 46,XX                     |
|                   | 46,XY,inv(9)(p11q13)                               | 46,XY,inv(9)(p11q13)       | 46,XX                     |
|                   | 46,XY,inv(9)(p11q13)                               | 46,XY                      | 46,XX,inv(9)(p11q13)      |

|                         |                               |                      |                      |
|-------------------------|-------------------------------|----------------------|----------------------|
|                         | 46,XY,inv(9)(p11q13)          | 46,XY                | 46,XX,inv(9)(p11q13) |
|                         | 46,XY,inv(9)(p11q13)          | 46,XY,inv(9)(p11q13) | 46,XX                |
|                         | 46,XY,inv(9)(p11q13)          | 46,XY                | 46,XX,inv(9)(p11q13) |
|                         | 46,XY,inv(9)(p11q13)          | 46,XY,14ps+          | 46,XX,inv(9)(p11q13) |
| BTCT phối hợp BTSL      | 46,XX,rob(14;21)(q10;q10),+18 | 46,XY                | 46,XX                |
| Nghỉ ngơi 46,XX,der(22) |                               | Không XN             | Không XN             |

**Nhận xét:** Trong 25 trường hợp bất thường cấu trúc NST thai có 7 trường hợp bố mẹ không đồng ý làm xét nghiệm NST. 14/18 (77,78%) trường hợp bất thường NST thai có nguồn gốc từ bố mẹ, trong đó có 7 trường hợp có nguồn gốc từ người bố, 7 trường hợp có nguồn gốc từ người mẹ. 4/18 (22,22%) trường hợp còn lại có karyotyp bố mẹ bình thường.

#### IV. BÀN LUẬN

Trong 1619 mẫu dịch ối được nuôi cấy làm NST từ tháng 12/2018 đến tháng 06/2019, chúng tôi đã phát hiện 123 trường hợp thai bất thường nhiễm sắc thể chiếm tỷ lệ 7,6%. Nghiên cứu của Huafeng LI và cộng sự (2019) phân tích hồi cứu trên 4206 trường hợp thai phụ nguy cơ cao, phát hiện tỷ lệ bất thường là 8,54% [1].

Tỷ lệ lệch bội NST là phổ biến nhất chiếm tỷ lệ là 6,1% (99/1619). Bất thường cấu trúc NST chiếm 1,5% (25/1619). Nghiên cứu của Huafeng LI và cộng sự cũng cho kết quả tương tự với lệch bội NST phổ biến nhất 5,51% được phát hiện trong nghiên cứu [1].

Trong số 25 trường hợp bất thường cấu trúc NST có 23 trường hợp dạng thuần và 2 trường hợp dạng khảm. Trong số trường hợp dạng thuần, bất thường chuyển đoạn NST là hay gặp nhất (chiếm 56%); đảo đoạn NST chiếm 28%, bất thường số lượng phôi hợp với bất thường cấu trúc (4%). Nghiên cứu của H T N Lan, TTT Huyền (2017) có kết quả tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi với tỷ lệ bất thường cấu trúc NST là 1,88%,

lần lượt là: chuyển đoạn (71,43%), đảo đoạn (16,67%), mất đoạn (4,76%), bất thường số lượng phôi hợp với bất thường cấu trúc (4,76%) [2].

Với những trường hợp bất thường cấu trúc, chúng tôi kiểm tra NST bố mẹ để xác định nguyên nhân bất thường có nguồn gốc từ bố mẹ hay là do đột biến mới phát sinh. Điều này là rất quan trọng để có thể tiên lượng tốt nhất cho lần mang thai này và tư vấn di truyền về khả năng sinh con dị tật ở những lần mang thai tiếp theo. Trong nghiên cứu, chúng tôi đã phát hiện 25 trường hợp bất thường cấu trúc NST. Trong đó, 7 trường hợp bố mẹ không đồng ý làm xét nghiệm, 14/18 trường hợp có nguồn gốc từ bố hoặc mẹ chiếm tỷ lệ 77,8%, 4/18 trường hợp đột biến mới phát sinh chiếm tỷ lệ 22,2%. Trong nghiên cứu của H T N Lan, TTT Huyền (2017) trên những trường hợp mang bất thường cấu trúc dạng thuần, phát hiện 18/27 thai bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể dạng thuần có nguồn gốc từ bố hoặc mẹ chiếm tỷ lệ 66,67% và 9/27 trường hợp là đột biến mới phát sinh (33,33%), 2 trường hợp bố mẹ

không đồng ý làm xét nghiệm [2]. Nghiên cứu của Lin XL và cộng sự (2013) trên những thai mang nhiễm sắc thể chuyển đoạn cân bằng cũng phát hiện 17/24 trường hợp bất thường có nguồn gốc từ bố mẹ (chiếm 70,83%) [3]. Nghiên cứu của Hoàng Thị Ngọc Lan (2013) cũng cho kết quả tương tự với 72,72% thai mang NST chuyển đoạn hòa hợp tâm di truyền từ bố mẹ [4].

Nhiều nghiên cứu cho thấy, nguy cơ di truyền cho con NST bất thường chủ yếu phụ thuộc vào việc bố hay mẹ là người mang NST bất thường đó. Trong nghiên cứu của chúng tôi, có 14 trường hợp bất thường cấu trúc có nguồn gốc từ bố mẹ, bất thường có nguồn gốc từ bố và bất thường có nguồn gốc từ mẹ có tỷ lệ ngang nhau (7/14), 7/25 trường hợp không làm xét nghiệm NST từ tế bào máu của bố mẹ. Theo Daniel và cộng sự (1989) đối với chuyển đoạn hòa hợp tâm, nếu mẹ là người mang NST chuyển đoạn thì khả năng di truyền cho thế hệ sau là 10-15%, trong khi nếu bố mang NST đó thì khả năng di truyền là 1,5-5% [5]. Nghiên cứu của Stoll C. (1998) cũng cho kết quả tương tự với nguy cơ di truyền cho con là 16% nếu mẹ là người mang NST chuyển đoạn cân bằng và dưới 8% nếu bố là người mang NST chuyển đoạn cân bằng đó [6]. Nghiên cứu của Shaffer và cs (2010), trên 30 trường hợp thai nhi được chẩn đoán mang chuyển đoạn hòa hợp tâm, 26/30 trường hợp nhận nhiễm sắc thể bất thường từ mẹ và 4/30 trường hợp nhận từ bố [7]. Trong đó, tất cả các trường hợp rob(14q;21q) đều có nguồn gốc từ mẹ. Việc xác định nguồn gốc nhiễm sắc thể bất thường rất có ý nghĩa trong tư vấn di truyền về khả năng tái mắc trong lần mang thai sau khi bố hay mẹ là người mang NST bất thường. Vì vậy, khi thai phụ hoặc chồng mang NST bất thường thì cần được làm chẩn đoán trước

sinh cho mỗi lần mang thai để phát hiện sớm những bất thường về bộ NST của thai nhi. Ngoài ra, đột biến cấu trúc NST không phải hoàn toàn do bố mẹ truyền cho thai mà có đến 22,2% là do đột biến mới phát sinh vì vậy tất cả các thai phụ cần tiến hành sàng lọc trước sinh và có chỉ định chọc ối khi nằm trong nhóm nguy cơ cao đột biến NST.

Trong nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện 99 trường hợp bất thường số lượng nhiễm sắc thể chiếm tỷ lệ 6,1% (99/1619), trong đó có 1 trường hợp bất thường cấu trúc và số lượng NST (1/99). Nghiên cứu đã phát hiện 97/99 trường hợp bất thường số lượng NST dạng thuần, 2/99 bất thường dạng khảm. Dạng bất thường số lượng NST hay gặp nhất là thai mắc hội chứng Down 68/99 (chiếm tỷ lệ 68,7%), tiếp theo là thai mắc hội chứng Edwards 17/99 (17,2%), thai mắc hội chứng thai mắc hội chứng Patau 4/99 (4,0%), các dạng bất thường khác gặp với tỷ lệ thấp hơn. Kết quả của chúng tôi cũng tương tự như nghiên cứu của nhiều tác giả khác như Huafeng LI và cộng sự (2019) tỷ lệ phát hiện lệch bội NST là 5,51% [1], thai mắc hội chứng Down chiếm tỷ lệ cao nhất là 48,32%; TTT Huyền (2017), Hoàng T N Lan và cs (2013), An N. (2015), tỷ lệ thai mắc hội chứng Down cao nhất, tương ứng là 61,6%, 47,5%, 60,29% các trường hợp thai bất thường NST [2, 3, 8]. Điều này rất có ý nghĩa trong chẩn đoán trước sinh vì hội chứng Down là hội chứng hay gặp với tỷ lệ khoảng 1/700 với biểu hiện chậm phát triển trí tuệ, tinh thần, tổn thương nhiều cơ quan nhưng lại có tuổi thọ khá cao, là gánh nặng lớn cho gia đình và xã hội.

Qua nghiên cứu này chúng tôi thấy, đột biến số lượng NST phần lớn là do đột biến mới phát sinh thì đột biến cấu trúc NST có đến 77,8% do bố/ mẹ truyền cho con chỉ có

22,2% là do đột biến mới phát sinh. Vì vậy, tất cả thai phụ cần tiến hành làm sàng lọc trước sinh và có chỉ định chọc ối khi nằm trong nhóm nguy cơ cao bất thường NST để có thể sinh ra những đứa trẻ khỏe mạnh. Những trường hợp thai có bất thường cấu trúc NST thì cần phải kiểm tra NST của bố mẹ, để tìm nguyên nhân gây ra bất thường cấu trúc NST từ đó giúp tư vấn di truyền có hiệu quả nhằm giúp gia đình sinh ra những em bé khỏe mạnh, không bị mắc các bất thường NST.

## V. KẾT LUẬN

1. Tỷ lệ bất thường NST là 7,6%: bất thường số lượng NST là 6,1%, cấu trúc 1,5%; đa hình 1,2%. Trong 1,5% bất thường cấu trúc thì chuyển đoạn NST thuần là 68% bất thường cấu trúc và số lượng là 4%; đảo đoạn NST số 9 là 28%.

2. Các dạng bất thường cấu trúc NST của thai.

- 56% thai có bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể dạng chuyển đoạn trong đó chuyển đoạn tương hỗ chiếm 32%, chuyển đoạn không tương hỗ chiếm 24%.

- 77,8% thai bất thường cấu trúc NST có nguồn gốc từ bố hoặc mẹ, 22,2% là đột biến mới phát sinh.

## KIẾN NGHỊ

Cần làm xét nghiệm NST bố mẹ trong trường hợp thai mang bất thường cấu trúc NST.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Huafeng LI, Yongli LI, Rui ZHAO et al (2019). **Cytogenetic Analysis of Amniotic Fluid Cells in 4206 Cases of High-Risk**

**Pregnant Women.** Iran J Public Health. 2019 Jan;48(1):126-131.

2. **Trần Thị Thanh Huyền, Hoàng Thị Ngọc Lan, Trần Thị Vân Quỳnh, Đoàn Thị Kim Phụng (2017).** Phân tích bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể của thai từ tế bào ối nuôi cấy. Tạp chí Y học Dược học Quân sự, số chuyên đề Hội hình thái học 2017. Tr 276-281.

3. **N. An, L. L. Li, R. X. Wang et al (2015).** Clinical and cytogenetic results of a series of amniocentesis cases from Northeast China: a report of 2500 cases. Genet Mol Res, 14(4), 15660-15667.

4. **X. L. Lin, F. N. Xie, S. H. Tang et al (2013).** Prenatal diagnosis and clinical counseling for fetal chromosomal reciprocal translocations. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 30(5), 612-615.

5. **Hoàng Thị Ngọc Lan (2013).** Chẩn đoán thai mang nhiễm sắc thể chuyển đoạn hòa hợp tâm. Tạp chí Y học Việt Nam, 407(2), 18-22.

6. **Daniel A., Hook E. B., Wulf G. (1989).** Risks of unbalanced progeny at amniocentesis to carriers of chromosome rearrangements: data from United States and Canadian laboratories. Am J Med Genet, 33 (1), pp. 14-53.

7. **Stoll C., Alembik Y., Dott B. (1998).** Study of Down syndrome in 238942 consecutive births. Ann. Genet, 41 (1), 44-51.

8. **Shaffer L. G., Jackson-Cook C. K., Stasiowski B. A. et al. (1992).** "Parental origin determination in thirty de novo Robertsonian translocations", Am J Med Genet, 43 (6), pp. 957-63.

9. **Hoàng Thị Ngọc Lan, Trần Danh Cường, Nguyễn Thị Hoàng Trang (2013).** Tìm hiểu mối liên quan giữa các chỉ định chọc ối với các loại bất thường nhiễm sắc thể của thai. Tạp chí Y học Việt Nam số 408 (2) tr56- 60.

## NGHIÊN CỨU ĐA HÌNH rs671 TRÊN GEN ALDH2 LIÊN QUAN CHUYỂN HÓA RƯỢU Ở NAM GIỚI NGƯỜI VIỆT

Trần Văn Khoa<sup>1</sup>, Nguyễn Hà Hương Ly<sup>1</sup>, Đinh Nam Đạt<sup>1</sup>,  
Nguyễn Minh Đức<sup>1</sup>, Chu Đức Anh<sup>1</sup>, Lê Mậu Nghĩa<sup>1</sup>, Trần Văn Tuấn<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Hoàn thiện được quy trình ARMS-PCR phân tích đa hình rs671 trên gen ALDH2 và khảo sát tần suất đa hình rs671 ở nam giới người Việt. **Đối tượng và phương pháp:** Mẫu máu tĩnh mạch của 70 nam giới bình thường; áp dụng phương pháp ARMS-PCR xác định đa hình rs671 trên gen ALDH2 và xác định tần suất alen, tần suất kiểu gen ở nam giới người Việt. **Kết quả và kết luận:** Đã hoàn thiện được quy trình ARMS-PCR và ứng dụng thành công kỹ thuật trong xác định phân tích đa hình rs671 trên gen ALDH2; Phát hiện thấy tần suất alen G và A tương ứng là 67,51% và 32,86%. Tần suất người mang kiểu gen GG và GA tương ứng là 34,29% và 65,71%, chưa ghi nhận được kiểu gen AA.

**Từ khóa:** rượu ethanol, ARMS-PCR, đa hình ALDH2rs671

### SUMMARY

#### STUDY ON ALDH2 rs671 POLYMORPHISM RELATES TO ALCOHOL METABOLISM IN VIETNAMESE MAN

**Objectives:** To complete the ARMS-PCR protocol to identify rs671 polymorphic on ALDH2 gene and frequency of rs671 polymorphism in Vietnamese men. **Subjects and**

**methods:** Venous blood samples from 70 normal males; ARMS-PCR was applied to identify rs671 polymorphism in ALDH2 gene and to determine allele and genotype frequencies in Vietnamese men. **Results and conclusion:** Completed the ARMS-PCR protocol and successfully applied the technique in determining the polymorphic analysis rs671 on the ALDH2 gene; The frequency of allele G and A was found to be 67.51% and 32.86%, respectively. The prevalence of GG and GA genotypes was 34.29% and 65.71%, respectively, and AA genotypes were not recorded.

**Key words:** ethanol, ARMS-PCR, ALDH2rs671 polymorphism

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rượu ethanol là một trong những đồ uống có cồn phổ biến. Nếu dùng một lượng thích hợp có thể có tác dụng có lợi hoặc ít nhất là không gây độc hại cho cơ thể. Song, nếu dùng quá liều có thể gây ra các hậu quả khôn lường. Ethanol khi được uống vào cơ thể sẽ được chuyển hóa chủ yếu tại gan và thải trừ bằng một số con đường. Gen ALDH2, là một trong các gen chính mã hóa các enzym tham gia chuyển hóa thải trừ ethanol. Một số đa hình gen có tính cá thể của các gen này ảnh hưởng đến khả năng chuyển hóa, khử độc, thải trừ ethanol. Mỗi người nên kiểm soát liều lượng rượu trên cơ sở khả năng chuyển hóa, khử độc, thải trừ ethanol của chính bản thân mình. Xét nghiệm đa hình gen là một công cụ mang lại thông tin về điều đó.

\*Học viện Quân Y

Chịu trách nhiệm chính: Trần Văn Khoa

Email: tvkhoabio@gmail.com

Ngày nhận bài: 10.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 13.10.2020

Ngày duyệt bài: 19.11.2020

Nhiều cảnh báo cũng cho thấy, Việt Nam là một trong số các nước có lượng tiêu thụ rượu bia cao nhất. Trong khi đó, nhiều tài liệu cho thấy người châu Á có khiếm khuyết di truyền liên quan đến gen chuyển hóa ethanol với tần suất cao hơn nhiều người châu Âu da trắng và một số chủng tộc khác trên thế giới. Tuy nhiên, cho đến nay còn rất ít các nghiên cứu về tần suất đa hình các gen liên quan chuyển hóa ethanol trên đối tượng nam giới người Việt- đối tượng thường hay uống rượu, bia và có thể bị nghiện rượu cao hơn so với nữ giới; cũng là đối tượng dễ bị các tổn thương ảnh hưởng đến sức khỏe do rượu bia gây ra.

Vì những lí do trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục đích:

- *Xây dựng quy trình phát hiện đa hình rs671 trên ALDH2 liên quan đến chuyển hóa rượu bằng kỹ thuật sinh học phân tử để áp dụng tại Việt Nam.*

- *Khảo sát tần suất đa hình gen rs671 ở nam giới người Việt.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu.

Mẫu bệnh: 3ml mẫu máu tĩnh mạch, chống đông bằng EDTA của 70 nam giới người Việt. Lấy mẫu ngẫu nhiên, kiểu thuận tiện.

Địa điểm nghiên cứu tại Bộ môn Sinh học và Di truyền Y học, Học viện quân y.

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 5/2019 đến tháng 5/2020.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu.

\* Tách chiết DNA tổng số từ mẫu máu (mẫu chứng và mẫu bệnh) thu thập được: tách chiết bằng kit tách chiết DNA từ máu toàn phần của Favorgen.

\* Khuếch đại đoạn gen bằng phương pháp ARMS-PCR với các trình tự môi được tham khảo theo Shupeng Jiang và cộng sự, 2017, có một số thay đổi [6].

**Bảng 1:** Trình tự các môi sử dụng cho đa hình gen ALDH2

| Môi                                                       | Trình tự môi (5'-3')                  | Kích thước sản phẩm (bp) |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Môi xuôi trong (alen A, hoạt tính enzym giảm) (1)         | 5'-GAGTACGGGCTGCAGGCATACAATA-3'       | (1+4) 290                |
| Môi ngược trong (alen G, hoạt tính enzym bình thường) (2) | 5'-GGTCCCACACTCACAGTTTTTCACGTC-3'     | (2+3) 221                |
| Môi xuôi ngoài (3)                                        | 5'-AAAATAAAGACTTTGGGGCAATACAGGGTGT-3' | (3+4) 463                |
| Môi ngược ngoài (4)                                       | 5'-ATTAGTAGGAAACACTGATGGCCTCCAG-3'    |                          |

Kỹ thuật này dựa trên nguyên tắc của PCR cơ bản: các mồi liên kết bổ sung đặc hiệu với mạch gốc ở đầu 5' và 3' và khuếch đại tạo thành nhiều nhân bản gen mong muốn. Sự khác biệt, đó là trong kỹ thuật ARMS 2 cặp mồi được sử dụng: 1 cặp mồi cho gen bình thường và một cặp mồi cho gen bị đột biến. Các cặp mồi này sẽ cho các sản phẩm khuếch đại có kích thước khác nhau và từ đó có thể xác định được kiểu gen của đối tượng nghiên cứu. Trường hợp nếu sản phẩm xuất hiện 1 băng có kích thước tương ứng với kích thước khuếch đại của cặp mồi bình thường, đồng nghĩa với việc mẫu nghiên cứu âm tính với đột biến; tương tự như vậy, nếu xuất hiện 1 băng có kích thước bằng kích thước sản phẩm khuếch đại của cặp mồi đột biến, đồng nghĩa với việc mẫu nghiên cứu dương tính với đột biến và 2 băng bằng kích thước của cả 2 cặp mồi thì có thể kết luận tương ứng mẫu đó bị đồng hợp và mang gen đột biến [2]. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 3%, phân tích kết quả. Kết quả được kiểm chứng bằng phương pháp giải trình tự Sanger sản phẩm PCR đơn mồi từ cặp mồi chung.

**\*Xử lý số liệu thống kê:** Sử dụng phần mềm MedCalc, xác định tần suất alen, kiểu gen.

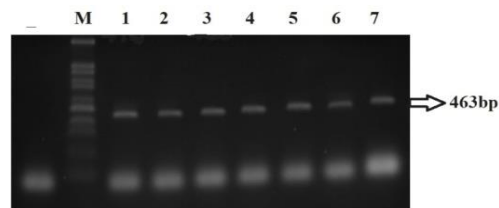
### III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Hoàn thiện quy trình ARMS-PCR phát hiện đa hình gen rs671

Quá trình được chuẩn hóa theo thứ tự:

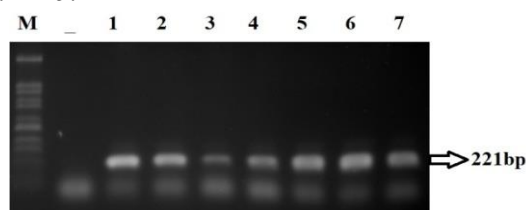
- 1) Chạy gradient nhiệt cho từng cặp mồi riêng - chạy PCR đơn mồi để chọn ra nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho từng cặp mồi.
- 2) Chạy PCR đa mồi dựa trên nhiệt độ gắn mồi thỏa mãn cho các cặp mồi.
- 3) Điều chỉnh tỉ lệ thành phần, chu trình nhiệt phản ứng PCR để thu được tất cả các

băng tương ứng với từng alen thuộc đa hình phân tích.



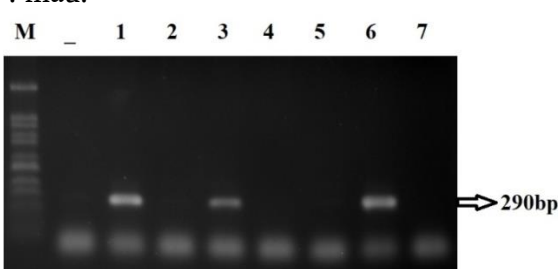
**Hình 1: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR đơn mồi với cặp mồi ngoài (3+4).**

(-): Chứng âm; M: Marker ladder 100bp; 1-7: mẫu.



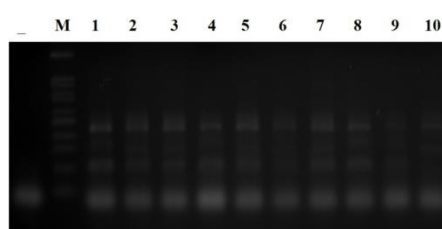
**Hình 2: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR đơn mồi với cặp mồi cho kiểu đại (2+3).**

(-): Chứng âm; M: Marker ladder 100bp; 1-7: mẫu.



**Hình 3: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR đơn mồi với cặp mồi cho đột biến (1+4).**

(-): Chứng âm; M: Marker ladder 100bp; 1-7: mẫu.



**Hình 4: Kết quả điện di sản phẩm AMS-PCR một số mẫu khi chưa chuẩn hóa.**

(-): Chứng âm; M: Marker ladder 100bp; 1-10: mẫu.

Theo kết quả điện di ban đầu, nhận thấy đối với đa hình rs671, các băng lên mờ, không rõ kích thước. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành điều chỉnh nồng độ môi, nồng độ

DNA mẫu và chu trình nhiệt để cho các băng điện di rõ.

Kỹ thuật ARMS-PCR đã được chuẩn hóa với các thành phần như bảng 3.1:

**Bảng 2:** Thành phần phản ứng ARMS-PCR

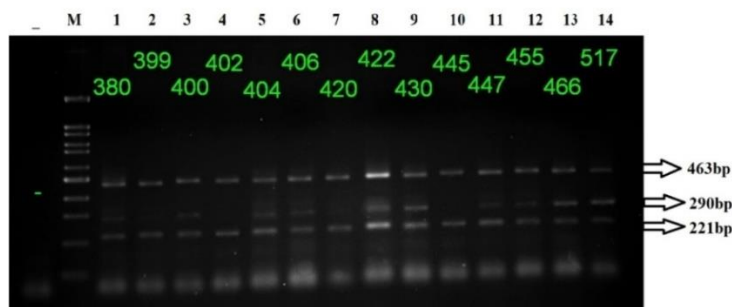
| Thành phần               | Thể tích (μl) |
|--------------------------|---------------|
| Môi xuôi trong (alen A)  | 0,5           |
| Môi ngược trong (alen G) | 0,5           |
| Môi xuôi ngoài (3)       | 0,75          |
| Môi ngược ngoài (4)      | 0,75          |
| H <sub>2</sub> O         | 2,5μl         |
| DNA mẫu                  | 5μl           |
| <b>Tổng</b>              | <b>20μl</b>   |

Chu trình nhiệt sau khi đã được tối ưu được trình bày ở bảng 3.2:

**Bảng 3:** Chu trình nhiệt phản ứng ARMS-PCR

| Nhiệt độ | Thời gian | Số chu kỳ |
|----------|-----------|-----------|
| 95°C     | 5 phút    | 1 chu kỳ  |
| 94°C     | 40 giây   | 40 chu kỳ |
| 64°C     | 40 giây   |           |
| 72°C     | 40 giây   |           |

Kết quả điện di sản phẩm ARMS – PCR



**Hình 5:** Kết quả điện di sản phẩm ARMS- PCR của đa hình rs671 ở một số mẫu.

(-): Chứng âm; M: Marker 100 bp; 1-14: Sản phẩm PCR của nhóm nam giới

Kiểu gen GG: mẫu 399, 402, 420 và 445; Kiểu gen AG: mẫu 380, 400, 404, 406, 422, 430, 447, 455, 466 và 517.

Ở người mang đa hình rs671 ở dạng dị hợp tử (AG), kết quả điện di sẽ có xuất hiện

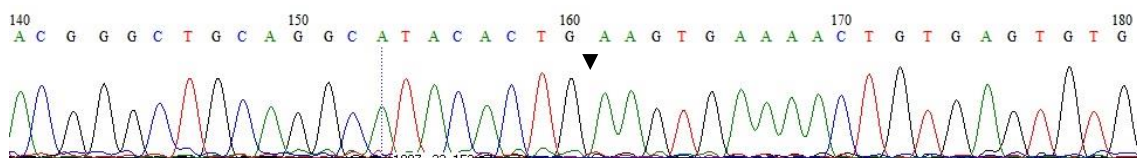
2 băng có kích thước 221bp và 290bp; người không mang đột biến (GG), sẽ xuất hiện băng có kích thước 221bp; người mang đột biến (AA), sẽ xuất hiện băng có kích thước 290bp và đối chứng âm (H<sub>2</sub>O) không xuất hiện băng nào (Hình 5). Sau khi thực hiện tối ưu nồng độ môi và chu trình nhiệt, sản phẩm

khuếch đại gen có các băng sản phẩm lên rõ ràng, kích thước của sản phẩm khuếch đại của đa hình rs671 phù hợp với dự kiến theo thiết kế; tất cả các mẫu tách DNA đều lên băng sản phẩm khuếch đại của gen nội chứng có kích thước 463bp. Kết quả cho thấy băng xuất hiện khi điện di sản phẩm PCR đều rõ ràng, đúng kích thước thiết kế và không xuất hiện băng phụ. Như vậy, đã tối ưu hóa được phản ứng ARMS-PCR đối với đa hình rs671.

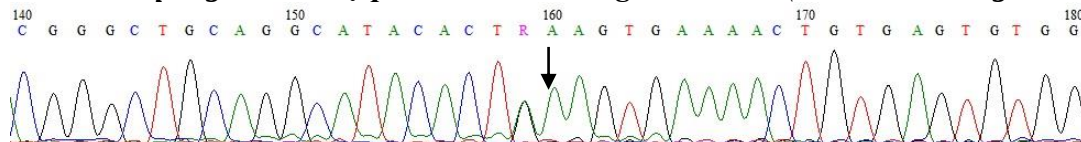
#### So sánh kết quả giữa phương pháp

#### ARMS-PCR và các phương pháp giải trình tự gen.

Khi kiểm chứng quy trình bằng giải trình tự Sanger ngẫu nhiên 10% trong số mẫu của nghiên cứu, chúng tôi thu được kết quả hoàn toàn đồng nhất giữa phương pháp ARMS-PCR và giải trình tự Sanger. Trong đó, phương pháp giải trình tự Sanger được coi là tiêu chuẩn vàng với độ tin cậy cao. Điều đó chứng tỏ kết quả phương pháp chạy ARMS – PCR hoàn toàn đáng tin cậy.



Hình 6: Kết quả giải trình tự phân tích đa hình gen ALDH2 (mẫu 505, kiểu gen GG).



Hình 7: Kết quả giải trình tự phân tích đa hình gen ALDH2 (mẫu 416, kiểu gen GA).

Kết quả ARMS-PCR và giải trình tự Sanger phù hợp với nhau.

#### 3.2. Xác định tần suất đa hình RS671 trên gen ALDH2

Sau khi chuẩn hóa được quy trình, chúng tôi tiến hành phân tích các mẫu còn lại.

Bảng 4: Kết quả phân tích tần suất alen thuộc đa hình s671

| Alen                | Số lượng   | Tần suất (%) | p      |
|---------------------|------------|--------------|--------|
| Alen G              | 94         | 67,14        | <0,001 |
| Alen A              | 46         | 32,86        |        |
| <b>Tổng số alen</b> | <b>140</b> | <b>100</b>   |        |

Bảng 5: So sánh tần suất kiểu gen đa hình rs671 của một số nghiên cứu

| Kiểu gen    | Số lượng  | Tỷ lệ (%)  | $\chi^2$ (p) |
|-------------|-----------|------------|--------------|
| GG          | 24        | 34,29      | 16,7632      |
| GA          | 46        | 65,71      |              |
| AA          | 0         | 0          |              |
| <b>Tổng</b> | <b>70</b> | <b>100</b> |              |

Kết quả cho thấy: SNP rs671 có 2 alen A và G, alen G có tần số cao (67,14%) trong quần thể, do đó, tỉ lệ người mang kiểu gen GG chiếm phần lớn 34,29%, tỉ lệ kiểu gen GA đứng thứ 2 với 65,71%, không ghi nhận được kiểu gen AA. Kiểm định Hardy-Weinberg,  $\chi^2 > 3,84$ , cho thấy kiểu gen chưa ở trạng thái cân bằng, có thể do chưa đại diện cho quần thể lớn cả nam, nữ.

#### IV. BÀN LUẬN

##### 4.1. Về hoàn thiện quy trình kỹ thuật ARMS-PCR.

ARMS-PCR là một kỹ thuật có nhiều ưu điểm. Nguyên liệu, vật tư tương tự như PCR chuẩn thông thường nên mang tính phổ thông có thể áp dụng được tại nhiều cơ phòng thí nghiệm sinh học phân tử thông thường. Khó khăn nhất của kỹ thuật là phải chuẩn hóa được tỷ lệ, thành phần phản ứng, nhiệt độ gắn môi, chu trình nhiệt để đảm bảo khuếch đại được tất cả các sản phẩm theo thiết kế trong một phản ứng. Kết quả này của chúng tôi cũng cho thấy, kỹ thuật ARMS-PCR có độ tin cậy cao. Một số nghiên cứu

khác cũng cho kết quả tương tự như Shupeng Jiang và cộng sự, 2017 [6], Lili Zhang, Limei Dong, Qian Ma, Guocai Yang [4]. Kỹ thuật này có đặc điểm tiện lợi, chỉ cần một phản ứng multiplex PCR có thể phát hiện đồng thời hai loại alen, chi phí thấp hơn so với các kỹ thuật khác như PCR-RFLP, Realtime-PCR, giải trình tự gen...[5].

##### 4.2. Về tần suất alen và tần suất kiểu gen đa hình rs671.

So sánh kết quả tần số alen và tần suất kiểu gen đa hình rs671 với một số nghiên cứu khác, chúng tôi thấy như sau:

**Bảng 6:** Một số kết quả phân tích đa hình rs671.

| Tác giả                       | Nước       | Tần kiểu gen và alen |       |       |       |       |
|-------------------------------|------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|
|                               |            | GG                   | GA    | AA    | G     | A     |
| Chao, và cộng sự, 2003 [1]    | Trung quốc | 50,00                | 40,00 | 10,00 | 70,0  | 30,00 |
| Kim và cộng sự, 2004 [3]      | Hàn quốc   | 53,19                | 30,85 | 15,96 | 68,61 | 31,39 |
| Yokoyama và cộng sự, 2013 [7] | Nhật Bản   | 50,00                | 41,74 | 8,26  | 70,86 | 29,14 |
| Nghiên cứu này                | Việt nam   | 34,29                | 65,71 | 0,00  | 67,14 | 32,86 |

Số liệu ở Bảng 6 cho thấy: về tần số alen, kết quả của chúng tôi cũng tương đương với kết quả của một số tác giả khác ở châu Á. Tuy nhiên tần suất kiểu gen lại có sự khác biệt. Kiểu gen GA ở nam giới người Việt lại có tần suất cao hơn kiểu gen GG. Đây cũng có thể là một điểm khác biệt cần có nghiên cứu quy mô lớn hơn để khẳng định

#### V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu tiến hành phân tích đa hình rs671 gen ALDH2 bằng kỹ thuật ARMS-PCR trên 70 nam giới Việt Nam, chúng tôi thu được một số kết quả sau:

- Đã hoàn thiện được quy trình ARMS-PCR để phân tích đa hình rs671 trên gen ALDH2.

- Kết quả khảo sát bước đầu về tần suất đa hình rs671 trên 70 nam giới người Việt Nam: alen G có tần số cao (67,14%), alen A (32,86); kiểu gen GA chiếm tỷ lệ cao (65,71%), kiểu gen GG chiếm 34,29, chưa phát hiện thấy kiểu gen AA.

#### KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục ứng dụng quy trình ARMS –

PCR trong phân tích đa hình gen ALDH2 với cỡ mẫu lớn hơn cùng với phát hiện nguy cơ một số bệnh lý khác trên thực tế lâm sàng: ung thư vảy thực quản, tăng huyết áp...

- Áp dụng ARMS – PCR phân tích đa hình ALDH2 với cỡ mẫu lớn hơn và một số đa hình gen khác ADH1B, ANKK1 liên quan với chuyển hóa đào thải rượu trong cơ thể người để dự phòng và điều trị các bệnh lý liên quan đến rượu một cách có hiệu quả.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Chao YC, Wang SJ, Chu HC. et al. (2003).** “Investigation of alcohol metabolizing enzyme genes in Chinese alcoholics with avascular necrosis of hip joint, pancreatitis and cirrhosis of the liver”. *Alcohol Alcohol*; 38: 431-6.
2. **Hamzeh Mesrian Tanha et al. (2015).** “Modified Tetra-Primer ARMS PCR as a Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping Tool”. *Genet Test Mol Biomarkers*. Mar;19 (3):156-61.
3. **Kim MS, Lee DH, Kang HS, et al. (2004).** “Genetic polymorphisms of alcohol-metabolizing enzymes and cytokines in patients with alcohol induced pancreatitis and alcoholic liver cirrhosis”. *Korean J Gastroenterol*; 43:355-63.
4. **Lili Zhang, Limei Dong, Qian Ma, et al. (2018).** “Association of ALDH2 rs671 polymorphism with essential hypertension: a case-control study in non-drinking Han Chinese”. *Int J Clin Exp Med*; 11(6):6222-6227.
5. **Lina Zhang, Jinzhao Zhao, Guanglin Cui, et al. (2015).** “Genotyping on ALDH2: Comparison of Four Different Technologies”. *PLoS One*; 10(3): e0122745.
6. **Shupeng Jiang, Yongqing Tong, Bin Qiao, et al. (2017).** “Simple and reliable genotyping of ALDH2 rs671 in the patients with acute alcoholism intoxication using Tetra-Primer ARMS PCR”, *Int J Clin Exp Med*;10(3):5649-5655.
7. **Yokoyama A, Mizukami T, Matsui T, et al. (2013).** “Genetic polymorphisms of alcohol dehydrogenase-1B and aldehyde dehydrogenase-2 and liver cirrhosis, chronic calcific pancreatitis, diabetes mellitus, and hypertension among Japanese alcoholic men. *Alcohol Clin Exp Res*; 37:1391-401.

(Xuất xứ công trình: Đề tài cấp cơ sở HVQY, 2020; Tiến hành tại Bộ môn Sinh học và Di truyền Y học, thời gian từ 5/2019 đến tháng 5/2020; Chịu trách nhiệm chính: Trần Văn Khoa; tel. 0384552737; email: tvkhoabiomed@gmail.com)

## ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, CẬN LÂM SÀNG SỐT GIẢM BẠCH CẦU HẠT TRUNG TÍNH Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ

Phan Tuấn Hưng<sup>1,2</sup>, Trần Đức Hậu<sup>1</sup>, Bùi Ngọc Lan<sup>1</sup>  
Nguyễn Thị Hoài Anh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Huyền<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Trang<sup>2</sup>

### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng sốt giảm bạch cầu hạt trung tính ở bệnh nhân u đặc ác tính tại bệnh viện Nhi Trung ương từ tháng 07/2019 đến 05/2020. **Đối tượng, phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang. Từ 07/2019 - 05/2020, chúng tôi nghiên cứu trên 69 đợt bệnh của 49 bệnh nhi đã được chẩn đoán u đặc ác tính, xuất hiện sốt giảm bạch cầu hạt sau đợt điều trị hóa chất tại bệnh viện Nhi Trung ương. Tiến hành đánh giá đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng tại thời điểm vào viện và trong quá trình điều trị tại bệnh viện. **Kết quả nghiên cứu:** Sốt giảm bạch cầu hạt chủ yếu xảy ra trong 7 ngày kể từ đợt điều trị hóa chất, chiếm tỉ lệ 65,2% số đợt. Loại ung thư hay gặp sốt giảm bạch cầu hạt nhất là u lympho, chiếm 42% số đợt. Triệu chứng hay gặp nhất là ở hệ tiêu hóa và đường hô hấp trên, trong đó loét miệng phổ biến nhất chiếm 55,1% đợt bệnh. Số lượng trung bình bạch cầu hạt trung tính là 0,12 G/l, với 63,2% đợt bệnh có bạch cầu hạt trung tính <0,1 G/l. Tỉ lệ đợt bệnh tìm được căn nguyên là 15,9%. **Kết luận:** Mô tả được đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của sốt giảm bạch cầu hạt ở bệnh nhi u đặc nhằm định hướng điều trị.

**Từ khóa:** sốt giảm bạch cầu hạt, u đặc, nhi khoa.

### SUMMARY

#### CLINICAL AND PARACLINICAL CHARACTERIZATION OF FEBRILE NEUTROPENIA EPISODES IN PATIENTS WITH SOLID TUMOR

**Objective:** To describe clinical, paraclinical characterization of patients diagnosed with solid tumor who had neutropenic fever episodes at National Children's Hospital from 07/2019 to 05/2020. **Methods:** Descriptive cross-sectional study. From 07/2019 to 05/2020, we collected 69 neutropenic fever episodes of 49 patients who were diagnosed with solid tumor. We evaluated the clinical and paraclinical features at admission and throughout the episodes. **Result:** Neutropenic fever mostly happens in the first week after chemotherapy. Type of solid tumor with the most number of neutropenic fever episodes is lymphoma, which accounted for 42% episodes. The most common symptom is in gastrointestinal and upper respiratory tract, with 55,1% episodes that have oral mucositis. The mean neutrophils was 0,12 G/l, the episodes have neutrophils < 0,1 G/l account for 63,2%. Cause was found in only 15.9% episodes.

**Keywords:** neutropenic fever, solid tumor, pediatric.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

U đặc ác tính là các ung thư thường do các bất thường trong di truyền gây nên. Sốt giảm bạch cầu hạt là một cấp cứu thường gặp trong ung thư ở trẻ em. Tác động của một số hóa chất gây giảm đáng kể dòng bạch cầu hạt trung tính trong máu ngoại vi, khi đó khả năng phòng thủ của cơ thể với các tác nhân

<sup>1</sup>Bệnh viện Nhi Trung Ương

<sup>2</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Phan Tuấn Hưng

Email: dr.tuanhung@gmail.com

Ngày nhận bài: 9.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 18.9.2020

Ngày duyệt bài: 19.11.2020

gây bệnh giảm sút, có thể dẫn đến nhiễm trùng nặng, ảnh hưởng tính mạng của bệnh nhân và làm kéo dài thời gian điều trị.

Hệ thống tạo máu ở trẻ em chưa trưởng thành và dễ gặp các rối loạn khi bị tác động bởi các yếu tố cả bên trong lẫn bên ngoài [1]. Sốt giảm bạch cầu hạt trung tính ở bệnh nhi do điều trị hóa chất là phổ biến nhất [2]. Sốt giảm bạch cầu hạt trung tính làm gián đoạn quá trình điều trị hóa chất, tăng nguy cơ gặp các biến chứng. Do đó, sốt giảm bạch cầu hạt trung tính ở bệnh nhi ung thư ảnh hưởng lớn đến quá trình điều trị bệnh nên cũng như giải quyết các biến chứng thứ phát.

Hiện nay, các phương pháp điều trị sốt giảm bạch cầu hạt trung tính có nhiều tiến bộ vượt bậc: kháng sinh phổ rộng, kích bạch cầu hạt trung tính, truyền bạch cầu hạt,... Tuy nhiên, chiến lược điều trị chưa thực sự nhất quán. Vì vậy, với mong muốn đóng góp cho quá trình điều trị và tiên lượng sốt giảm bạch cầu hạt trung tính ở bệnh nhi ung thư, chúng tôi thực hiện nghiên cứu “*Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng sốt giảm bạch cầu hạt trung tính ở bệnh nhân ung thư*” với mục tiêu: “Mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng sốt giảm bạch cầu hạt trung tính ở bệnh nhân u đặc ác tính tại bệnh viện Nhi Trung ương”.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Đối tượng nghiên cứu.** Các bệnh nhi có chẩn đoán xác định là u đặc ác tính được điều trị tại bệnh viện Nhi Trung ương từ tháng 07/2019 đến tháng 05/2020

**Bảng 1.** Phân bố bệnh nhân theo tuổi

| Nhóm tuổi   | Lượt bệnh nhân | Tỉ lệ (%)  |
|-------------|----------------|------------|
| <2 tuổi     | 17             | 24,6       |
| 2-5 tuổi    | 27             | 39,1       |
| >5 tuổi     | 25             | 36,2       |
| <b>Tổng</b> | <b>69</b>      | <b>100</b> |

**Nhận xét:** Nhóm tuổi hay mắc bệnh cao nhất là nhóm 2-5 tuổi chiếm 39,1%.

**2.1.1. Tiêu chuẩn chọn đối tượng nghiên cứu.**

- Bệnh nhi điều trị nội trú tại Khoa Ung thư Bệnh viện Nhi Trung ương, đã được chẩn đoán xác định bị mắc một trong các bệnh u đặc ác tính và đã điều trị hóa chất.

- Bạch cầu đa nhân trung tính < 1000 tế bào/ $\mu$ L.

- Nhiệt độ đo ở nách  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  đo một lần hoặc  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$  kéo dài hơn một giờ.

- Không đang mắc các bệnh như: HIV, viêm gan A, B, cúm A, B, tự miễn, suy dinh dưỡng

- Người nhà bệnh nhi đồng ý tham gia nghiên cứu.

**2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ:** Không thỏa mãn các điều kiện trên, bệnh nhi có thời gian nằm viện dưới 3 ngày.

**2.2. Phương pháp nghiên cứu:** Mô tả, cắt ngang

**2.2.1. Cỡ mẫu:** Mẫu ngẫu nhiên thuận tiện.

**2.2.2. Xử lý số liệu**

Số liệu được nhập và quản lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Số liệu được xử lý bằng lập trình SPSS v.20.0 với các phép kiểm định, so sánh có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  hoặc  $p < 0,01$ .

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Từ 07/2019 đến 05/2020 chúng tôi thu thập được 69 đợt bệnh sốt giảm bạch cầu hạt trên 49 bệnh nhân u đặc sau điều trị hóa chất tại bệnh viện Nhi trung ương.

### 3.1. Đặc điểm lâm sàng

#### 3.1.1. Tuổi

**3.1.2. Giới****Bảng 2. Phân bố bệnh nhân theo giới**

| Giới        | Lượt bệnh nhân | Tỉ lệ (%)  |
|-------------|----------------|------------|
| Nam         | 51             | 73,9       |
| Nữ          | 18             | 26,1       |
| <b>Tổng</b> | <b>69</b>      | <b>100</b> |

**Nhận xét:** Nam nhiều hơn nữ 2,8 lần.

**3.1.3. Loại ung thư****Bảng 3. Loại ung thư**

| Loại ung thư      | Lượt bệnh nhân | Tỷ lệ (%)    |
|-------------------|----------------|--------------|
| Medulloblast      | 2              | 2,9          |
| Neuroblastoma     | 11             | 15,9         |
| Rhabdoid          | 6              | 8,7          |
| Sarcoma cơ vân    | 11             | 15,9         |
| Sarcoma Ewing     | 1              | 1,4          |
| Sarcoma xương     | 4              | 5,8          |
| U lympho          | 29             | 42,0         |
| U nguyên bào gan  | 1              | 1,4          |
| U nguyên bào phổi | 1              | 1,4          |
| U thận            | 3              | 4,3          |
| <b>Tổng</b>       | <b>69</b>      | <b>100,0</b> |

**Nhận xét:** Loại ung thư hay gặp nhất trong sốt giảm bạch cầu hạt ở bệnh nhi u đặc là U lympho chiếm 42,0%.

**3.1.4. Thời gian từ khi kết thúc lần tiêm/ truyền hóa chất gần nhất****Bảng 4. Thời gian từ khi kết thúc lần tiêm/truyền hóa chất gần nhất**

| Thời gian từ khi kết thúc lần tiêm/truyền hóa chất gần nhất | Số lượt   | Tỉ lệ (%)  |
|-------------------------------------------------------------|-----------|------------|
| ≤7 ngày                                                     | 45        | 65,2       |
| >7 ngày                                                     | 24        | 34,8       |
| <b>Tổng</b>                                                 | <b>69</b> | <b>100</b> |

**Nhận xét:** Thời gian trung bình mắc là 6,4 ngày kể từ ngày truyền hóa chất cuối cùng. Nhóm bệnh nhân mắc trong vòng 7 ngày kể từ ngày truyền hóa chất cuối chiếm tỉ lệ cao nhất là: 65,2%.

**3.1.5. Biểu hiện nhiễm trùng****Bảng 5. Biểu hiện nhiễm trùng**

| Biểu hiện nhiễm trùng        | Số lượt | Tỉ lệ (%) |
|------------------------------|---------|-----------|
| Có biểu hiện nhiễm trùng     | 61      | 88,4      |
| Biểu hiện tại đường tiêu hóa | 43      | 62,3      |
| Loét miệng                   | 38      | 55,1      |
| Tiêu chảy                    | 18      | 26,1      |

**CHUYÊN ĐỀ SÀNG LỌC VÀ CHẨN ĐOÁN BỆNH DI TRUYỀN**

|                                    |          |             |
|------------------------------------|----------|-------------|
| Vừa tiêu chảy vừa loét miệng       | 13       | 18,8        |
| Biểu hiện tại đường hô hấp         | 34       | 49,3        |
| Viêm đường hô hấp trên             | 33       | 47,8        |
| Viêm đường hô hấp dưới             | 6        | 8,7         |
| Suy hô hấp                         | 2        | 2,9         |
| Biểu hiện tại cơ quan khác         | 12       | 17,4        |
| Da                                 | 6        | 8,7         |
| Hậu môn                            | 1        | 1,4         |
| Tiết niệu                          | 5        | 7,2         |
| <b>Không biểu hiện nhiễm trùng</b> | <b>8</b> | <b>11,6</b> |

**Nhận xét:** Biểu hiện nhiễm trùng tại đường tiêu hóa chiếm tỉ lệ cao nhất là: 62,3%. Trong đó, loét miệng thường gặp nhất chiếm 55,1% đợt bệnh.

### **3.2. Đặc điểm cận lâm sàng**

#### **3.2.1. Bạch cầu**

**Bảng 6. Số lượng bạch cầu**

| Lượng bạch cầu (G/l) | Số lượt   | Tỉ lệ (%)    |
|----------------------|-----------|--------------|
| ≥3,0 G/l             | 5         | 7,2          |
| 2,0-2,9 G/l          | 4         | 5,8          |
| 1,0-1,9 G/l          | 11        | 15,9         |
| <1,0 G/l             | 49        | 71,0         |
| <b>Tổng</b>          | <b>69</b> | <b>100,0</b> |

**Nhận xét:** Các đợt bệnh có bạch cầu dưới 1,0 G/l chiếm tỉ lệ nhiều nhất là 71,0%.

#### **3.2.2. Bạch cầu hạt trung tính**

**Bảng 7. Số lượng bạch cầu hạt trung tính**

| Lượng bạch cầu hạt trung tính (G/l) | Số lượt   | Tỉ lệ (%)  |
|-------------------------------------|-----------|------------|
| <0,1 G/l                            | 43        | 62,3       |
| 0,1-0,49 G/l                        | 23        | 33,3       |
| 0,5-1 G/l                           | 3         | 4,3        |
| <b>Tổng</b>                         | <b>69</b> | <b>100</b> |

**Nhận xét:** Đợt bệnh có số lượng bạch cầu hạt trung tính thấp nhất là 0,00 G/l, chiếm tỉ lệ 5,8%. Số lượng bạch cầu hạt trung tính trung bình của các đợt bệnh là 0,12 G/l. Các đợt bệnh có bạch cầu hạt trung tính <0,1 G/l chiếm tỉ lệ nhiều nhất là 62,3%.

#### **3.2.3. Bạch cầu mono**

**Bảng 8. Số lượng bạch cầu mono**

| Lượng bạch cầu Mono (G/l) | Số lượt   | Tỉ lệ (%)  |
|---------------------------|-----------|------------|
| <0,1 g/l                  | 36        | 52,2       |
| 0,1-0,49 G/l              | 23        | 33,3       |
| >0,5G/l                   | 10        | 14,5       |
| <b>Tổng</b>               | <b>69</b> | <b>100</b> |

**Nhận xét:** Các đợt bệnh có số lượng bạch cầu Mono trung bình là 0,23 G/l. Các đợt bệnh nhân có bạch cầu Mono <0,1 G/l chiếm tỉ lệ nhiều nhất là 52,2%.

### 3.2.4. CRP

**Bảng 9. Giá trị CRP**

| CRP (mg/L)  | Số lượt   | Tỉ lệ (%)    |
|-------------|-----------|--------------|
| <6          | 7         | 10,1         |
| 6-50        | 33        | 47,8         |
| 51-89       | 10        | 14,5         |
| ≥90         | 19        | 27,5         |
| <b>Tổng</b> | <b>69</b> | <b>100,0</b> |

**Nhận xét:** Giá trị CRP cao nhất của các đợt bệnh là 285,4 mg/dL. Các đợt bệnh có giá trị CRP trong khoảng 6-50 mg/dL chiếm tỉ lệ nhiều nhất là 47,8%.

### 3.2.5. Nuôi cấy, định danh

**Bảng 10. Kết quả nuôi cấy, định danh**

| Kết quả nuôi cấy định danh | Số lượt   | Vi khuẩn | Vi rút | Nấm | Tỉ lệ (%)  |
|----------------------------|-----------|----------|--------|-----|------------|
| Có                         | 11        |          |        |     | 15,9       |
| Nước tiểu                  | 4         | 4        | 0      | 0   | 5,8        |
| Máu                        | 3         | 2        | 0      | 1   | 4,3        |
| Loét miệng                 | 3         | 1        | 3      | 0   | 4,3        |
| Phân                       | 1         | 1        | 0      | 0   | 1,4        |
| Không                      | 58        |          |        |     | 84,1       |
| <b>Tổng</b>                | <b>69</b> |          |        |     | <b>100</b> |

**Nhận xét:** Tỉ lệ tìm được căn nguyên trong các đợt bệnh là 15,9%.

### 3.2.6. Mô hình hồi quy logistic dự báo xác suất nuôi cấy dương tính

**Bảng 11.** Mô hình hồi quy Logistic tối ưu dự báo xác suất nuôi cấy ở bệnh nhân sốt giảm bạch cầu hạt trung tính. (Kiểm định Wald, CI95% của Odds-ratio được xác định bằng phương pháp Bootstrap với 1000 lần lấy mẫu ngẫu nhiên lặp lại.)

| Biến độc lập                               | Hệ số B | Ý nghĩa thống kê (Wald) | Odds-ratio | CI95% của Odds-ratio |
|--------------------------------------------|---------|-------------------------|------------|----------------------|
| Thời gian từ tiêm/truyền hóa chất gần nhất | -0,333  | 0,17                    | 0,717      | 0-0,928              |
| Nhóm tuổi(<2 tuổi) so với nhóm >5 tuổi     | 2,38    | 0,006                   | 10,81      | 1,489-Exp(199,6)     |
| Nhóm tuổi 2-5 tuổi so với nhóm >5 tuổi     | -0,714  | 0,457                   | 0,489      |                      |
| CRP                                        | 0,013   | 0,04                    | 1,013      | 1,002-3,564          |

**Nhận xét:** Mô hình cho phép dự báo chính xác trong 88,4% trường hợp và giải thích được 37,9% thay đổi phân phối tần suất cấy dương tính trong mẫu khảo sát ( $R^2$  Nagelkerke).

## IV. BÀN LUẬN

### 4.1. Đặc điểm lâm sàng

#### 4.1.1. Tuổi

Trong nghiên cứu này, tuổi của các bệnh nhân trong khoảng từ 3 tháng đến 11 tuổi, tuổi trung bình của bệnh nhân là 4,5 tuổi. Nhóm tuổi hay mắc sốt giảm bạch cầu hạt nhất là nhóm 2-5 tuổi, chiếm 46,4%. Trong nghiên cứu của Ülker Koçak và cs, tuổi trung bình là  $9,4 \pm 5,1$  tuổi (tuổi nằm trong khoảng 0-18) [3]. Còn trong nghiên cứu của Mathilde Delebarre và cs, tuổi trung bình là  $8,2 \pm 5,4$  [4]. Như vậy trong nghiên cứu của chúng tôi độ tuổi thấp hơn các nghiên cứu trên. Sự khác biệt là do mô hình bệnh tật tại khoa ung thư bệnh viện Nhi trung ương có sự khác biệt so với các trung tâm khác trên thế giới.

#### 4.1.2. Giới

Tỉ lệ Nam/Nữ trong nghiên cứu của chúng tôi là 2,8/1. Tỉ lệ này cũng có sự khác biệt so với nghiên cứu của Mathilde Delebarre là 1,05/1 [4]. Sự khác biệt do một phần do bệnh nhân sốt giảm bạch cầu hạt tại khoa ung thư bệnh viện Nhi trung ương mắc u lympho Burkitt và sarcoma cơ vân, và 2 mặt bệnh này có xu hướng xuất hiện ở trẻ nam nhiều hơn so với trẻ nữ.

#### 4.1.3. Loại ung thư

Loại ung thư thường gặp nhất là u lympho, chiếm tỉ lệ 42%. Trong nghiên cứu của Mathilde, tỉ lệ u lympho cũng chiếm tỉ lệ cao 27,3% và chỉ xếp sau u xương (32,8%) [4]. Do đó, kết quả của chúng tôi gần như tương đương nghiên cứu trên.

#### 4.1.4. Thời gian từ kết thúc lần tiêm/truyền hóa chất gần nhất

Các bệnh nhi xuất hiện sốt giảm bạch cầu hạt sau trung bình 6,4 ngày kể từ khi kết thúc

lần tiêm/truyền hóa chất cuối cùng. Nhóm bệnh nhi mắc trong vòng 7 ngày chiếm tỉ lệ cao nhất là 65,2%. Kết quả này tương đương với nghiên cứu của Rondinelli và cs khi xác định thời gian trung bình xuất hiện sốt giảm bạch cầu hạt là 7,3 ngày sau đợt hóa trị liệu [5].

#### 4.1.5. Biểu hiện nhiễm trùng

Số lượng bệnh nhân có triệu chứng nhiễm trùng đường tiêu hóa và hô hấp có tỉ lệ cao nhất, lần lượt là 62,3% và 49,3%. Số lượng bệnh nhân không biểu hiện triệu chứng trên lâm sàng là 10,1%. Biểu hiện thường gặp nhất là loét miệng nhưng lại không đặc hiệu và giá trị gợi ý chưa cao.

### 4.2. Đặc điểm cận lâm sàng

#### 4.2.1. Số lượng bạch cầu

Số lượng tuyệt đối bạch cầu dưới 1,0 G/l trong nghiên cứu của Ammann và cs chiếm 76,0% [6]. Kết quả nghiên cứu này cũng tương đương với nghiên cứu của chúng tôi với số lượng tuyệt đối bạch cầu dưới 1,0 G/l chiếm tỉ lệ nhiều nhất là 71,0%. Điều này có thể lý giải là các hóa chất sử dụng trong điều trị không chỉ tác động đơn độc trên dòng bạch cầu hạt trung tính.

Số lượng bạch cầu hạt trung tính ở các bệnh nhân trung bình là 0,12 G/l, đa số bệnh nhân có lượng bạch cầu hạt trung tính dưới 0,1 G/l (chiếm 62,3%). Kết quả tương đương với nghiên cứu của Hakim và cs năm 2010 [7].

Bạch cầu mono có khả năng thực bào mạnh mẽ. Dòng bạch cầu mono cũng bị tác động mạnh của hóa trị liệu trong điều trị ung thư. Trong nhiều nghiên cứu về sốt giảm bạch cầu hạt ở trẻ em, số lượng bạch cầu mono cũng được coi là một yếu tố tiên lượng

điền hình như trong nghiên cứu của Klaassen và cs [8]. Còn trong nghiên cứu của chúng tôi, số lượng trung bình dòng bạch cầu mono là  $0,23 \pm 0,35$  G/l, với 52,2% số lượt có lượng bạch cầu mono  $<0,1$  G/l. Kết quả nghiên cứu đều cho thấy dòng bạch cầu mono giảm nặng ở trẻ sốt giảm bạch cầu hạt.

#### 4.2.2. CRP

CRP là một dấu ấn nhạy và đặc hiệu, không phụ thuộc vào số lượng bạch cầu và bệnh nền, cần thiết để chẩn đoán sớm tình trạng nhiễm trùng trong sốt giảm bạch cầu hạt trung tính. Trong nghiên cứu của chúng tôi, giá trị CRP trung bình là  $63,8 \pm 68,1$  mg/L, giá trị CRP trong khoảng 6-50 mg/dL chiếm tỉ lệ nhiều nhất là 47,8%. Kết quả này là tương đương với nghiên cứu của Ammann: số lượt bệnh nhân có giá trị CRP nằm trong khoảng 6-50 cũng chiếm tỉ lệ nhiều nhất là 52,0% [6].

#### 4.2.3. Nuôi cấy, định danh

Trong sốt giảm bạch cầu hạt, việc tìm căn nguyên có ý nghĩa rất quan trọng, ảnh hưởng tới lựa chọn kháng sinh và là bằng chứng xác đáng để thay đổi kháng sinh trong quá trình điều trị. Tuy nhiên, việc phát hiện căn nguyên gặp rất nhiều khó khăn, thách thức và tỉ lệ phát hiện còn chưa cao. Theo tác giả Agyeman và cs tiến hành trên 423 đợt sốt giảm bạch cầu hạt, số lượt định danh được vi khuẩn chỉ chiếm 15,8% [9]. Nghiên cứu của chúng tôi cũng ủng hộ cho nhận định trên khi số lượt sốt giảm bạch cầu hạt chỉ tìm được căn nguyên của 15,9% lượt bệnh, trong đó có 72,7% đợt bệnh tìm ra là vi khuẩn.

#### 4.2.4. Mô hình hồi quy logistic dự báo xác suất nuôi cấy dương tính

Nuôi cấy và định danh vi khuẩn đóng vai trò thiết yếu trong quản lý và điều trị bệnh nhi sốt giảm bạch cầu hạt. Mô hình hồi quy logistic cho thấy các yếu tố như bệnh nhi  $<2$  tuổi, CRP tăng cao, sốt khởi phát sớm sau kết thúc tiêm truyền hóa chất là các yếu tố dự báo xác suất nuôi cấy dương tính. Do đó với nhóm bệnh nhi này cần chú ý đánh giá các ổ nhiễm khuẩn từ thời điểm ban đầu nhằm đưa ra các chỉ định nuôi cấy phù hợp, giúp nâng cao chất lượng điều trị cho bệnh nhi.

### V. KẾT LUẬN

- **Đặc điểm lâm sàng:** Sốt giảm bạch cầu hạt xảy ra trong vòng 7 ngày đầu kể từ kết thúc tiêm/truyền hóa chất gần nhất với tỉ lệ 65,2%. Triệu chứng thường gặp nhất là nhiễm trùng ở đường tiêu hóa và đường hô hấp trên, trong đó loét miệng là triệu chứng phổ biến nhất.

- **Đặc điểm cận lâm sàng:** Dòng bạch cầu hạt trung tính trong các đợt giảm nặng, số lượng bạch cầu hạt trung tính  $< 0,1$  G/l chiếm 62,3%. Dòng bạch cầu Mono cũng giảm nặng, số lượng bạch cầu Mono  $<0,1$  G/l chiếm 52,2%. CRP trong các đợt bệnh chủ yếu tăng nhẹ, đợt bệnh có CRP  $<50$  mg/l chiếm 57,9%. Căn nguyên nhiễm trùng chỉ tìm thấy trong 15,9% đợt bệnh, chủ yếu tìm thấy là căn nguyên vi khuẩn.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fernández K.S. and Alarcón P.A. de (2013). Development of the Hematopoietic System and Disorders of Hematopoiesis that Present During Infancy and Early Childhood. *Pediatric Clinics*, 60(6), 1273–1289.
2. Bhatt V. and Saleem A. Review: Drug-Induced Neutropenia – Pathophysiology,

- Clinical Features, and Management. 7.
3. **Koçak Ü., Rolston K.V., and Mullen C.A. (2002).** Fever and neutropenia in children with solid tumors is similar in severity and outcome to that in children with leukemia. *Support Care Cancer*, **10**(1), 58–64.
  4. **Delebarre M., Dessein R., Lagrée M., et al. (2019).** Differential risk of severe infection in febrile neutropenia among children with blood cancer or solid tumor. *Journal of Infection*, **79**(2), 95–100.
  5. **Rondinelli P.I.P., Ribeiro K. de C.B., and de Camargo B. (2006).** A proposed score for predicting severe infection complications in children with chemotherapy-induced febrile neutropenia. *J Pediatr Hematol Oncol*, **28**(10), 665–670.
  6. **Ammann R.A., Hirt A., Lüthy A.R., et al. (2003).** Identification of children presenting with fever in chemotherapy-induced neutropenia at low risk for severe bacterial infection. *Med Pediatr Oncol*, **41**(5), 436–443.
  7. **Hakim H., Flynn P.M., Srivastava D.K., et al. (2010).** Risk Prediction in Pediatric Cancer Patients With Fever and Neutropenia: The Pediatric Infectious Disease Journal, **29**(1), 53–59.
  8. **Klaassen R.J., Goodman T.R., Pham B., et al. (2000).** “Low-risk” prediction rule for pediatric oncology patients presenting with fever and neutropenia. *J Clin Oncol*, **18**(5), 1012–1019.
  9. **Agyeman P., Aebi C., Hirt A., et al. (2011).** Predicting Bacteremia in Children With Cancer and Fever in Chemotherapy-induced Neutropenia: Results of the Prospective Multicenter SPOG 2003 FN Study. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **30**(7), e114–e119.

## HOÀN THIỆN KỸ THUẬT LAI SO SÁNH HỆ GEN aCGH TRONG PHÂN TÍCH BẤT THƯỜNG NHIỄM SẮC THỂ

Vũ Thị Hà<sup>1,2</sup>, Hoàng Thị Hải<sup>1</sup>, Hà Phương Nhung<sup>1</sup>,  
Luyện Thị Thanh Nga<sup>1</sup>, Đoàn Thị Kim Phụng<sup>1,2</sup>

### TÓM TẮT<sup>17</sup>

Ngày nay, kỹ thuật lai so sánh hệ gen (aCGH) đã trở thành một công cụ hữu hiệu để phát hiện sự mất cân bằng bộ gen với độ phân giải cao hơn nhiều (vài trăm base pair) so với phân tích nhiễm sắc thể đồ truyền thống. **Mục tiêu:** hoàn thiện kỹ thuật lai so sánh hệ gen trong phân tích bất thường nhiễm sắc thể từ mẫu máu và mẫu dịch ối. **Đối tượng và phương pháp:** 24 mẫu máu ngoại vi và 24 mẫu dịch ối được tách chiết DNA và tiến hành kỹ thuật lai so sánh hệ gen tại Trung tâm Tư vấn Di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. **Kết quả:** 24/24 (100%) mẫu máu và 22/24 (91,7%) mẫu dịch ối đạt nồng độ chuẩn, 2/24 (8,3%) có nồng độ dưới chuẩn, nhưng lượng DNA tổng số vẫn đủ để thực hiện quy trình kỹ thuật. 100% mẫu đều phân tích được kết quả với tỷ lệ phát hiện bất thường nhiễm sắc thể là 29,2%. **Kết luận:** Hoàn thiện thành công quy trình kỹ thuật của aCGH với nhiều giai đoạn khác nhau, mỗi giai đoạn đều có các tiêu chuẩn để đối chứng, đảm bảo cho quy trình được thành công và kết quả phân tích được rõ ràng và cho phép phát hiện bất thường nhiễm sắc thể với tỷ lệ cao hơn so với phương pháp karyotyping.

**Từ khóa:** lai so sánh hệ gen, nhiễm sắc thể đồ, bất thường nhiễm sắc thể.

### SUMMARY

#### THE COMPLETION OF MICROARRAY-BASED COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (aCGH) IN DETECTION OF CHROMOSOMAL ABNORMALITIES

Recently, the Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH) technique has become an effective tool for detecting genomic mutation with higher resolution (several hundred base pairs) than karyotyping. **Objectives:** The aim of our study was to complete the aCGH technique in chromosome abnormal analysis from blood and amniotic fluid samples. **Methods:** 24 samples from peripheral blood and 24 samples from amniotic fluid were DNA extracted and conducted to aCGH technique at Genetic consulting Center, Hanoi Medical Hospital University. **Results:** 24/24 (100%) blood samples and 22/24 (91,7%) amniotic fluid samples had DNA concentration in standard ranges, 2/24 (8.3%) had sub-standard concentrations, but the total amount of DNA was still sufficient to process. 100% samples could be analysis, and showed 29,2% chromosome abnormality. **Conclusions:** aCGH has many different stages, each stage has standards to control, to ensure that the process is successful and the analysis results are clearly identified and could detect chromosomal abnormalities at a higher ratio than the karyotyping.

**Key words:** Comparative Genomic Hybridization, karyotyping, chromosome abnormality.

<sup>1</sup>Bệnh viện ĐHY Hà Nội,

<sup>2</sup>Trường ĐHY Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Đoàn Thị Kim Phụng  
Email: doankimphuong@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 1.10.2020

Ngày phản biện khoa học: 16.10.2020

Ngày duyệt bài: 19.11.2020

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bất thường nhiễm sắc thể (NST) là những rối loạn về cấu trúc hoặc số lượng của một hay nhiều NST có thể xảy ra trên NST thường hay NST giới tính hoặc cả hai. Nhiều bất thường NST để lại hậu quả nặng nề như sảy thai, thai lưu, tử vong sơ sinh hoặc gây ra các bệnh lý di truyền [1]. Tuy nhiên cũng có những bất thường NST không biểu hiện triệu chứng lâm sàng nhưng lại truyền cho các thế hệ sau NST bất thường đó và có biểu hiện kiểu hình ở thế hệ sau.

Việc xác định các bất thường di truyền liên quan đến nhiều trường hợp bệnh lý là rất cần thiết để bác sĩ có thể tư vấn di truyền cho bệnh nhân hay gia đình bệnh nhân, cũng như hỗ trợ tinh thần để giảm thiểu gánh nặng về mặt tâm lý và có những can thiệp về mặt y tế kịp thời, hiệu quả. Để đáp ứng nhu cầu này, các kỹ thuật phát hiện bất thường di truyền không ngừng phát triển để có thể phát hiện các bất thường với độ phân giải ngày càng cao.

Kỹ thuật lai so sánh hệ gen (Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH)) là một kỹ thuật di truyền tế bào - phân tử, cho phép phát hiện số lượng các bản sao của các biến thể di truyền trong mẫu DNA bệnh nhân mà không cần nuôi cấy tế bào. Nguyên lý của kỹ thuật này là lai so sánh hai mẫu DNA từ mẫu của bệnh nhân và mẫu chứng để phát hiện sự khác biệt về mức độ tăng hoặc giảm của toàn bộ bộ nhiễm sắc thể. Việc chẩn đoán bất thường nhiễm sắc thể vẫn được thực hiện thường quy bằng phương pháp phân tích nhiễm sắc thể (karyotyping). Tuy nhiên, xét nghiệm này chỉ có thể phát hiện được các bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể lớn từ 5 Mb trở lên [1], [2], [3]. Ngoài ra, các kỹ thuật di truyền phân tử khác như PCR, RT-PCR có thể xác định

được một số các biến thể di truyền, hay tính đa hình về kiểu gen cho người bệnh mang bất thường bẩm sinh nhưng chỉ hạn chế một số gen xác định trước. Kỹ thuật lai so sánh hệ gen - Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) đã khắc phục được nhược điểm này của các phương pháp trên. Vì vậy, kỹ thuật lai so sánh hệ gen (aCGH) đã trở thành một công cụ hữu hiệu để phát hiện sự mất cân bằng bộ gen với độ phân giải cao hơn nhiều (vài trăm base pair) so với phân tích nhiễm sắc thể đồ [4].

Trên thế giới, kỹ thuật aCGH đã và đang được áp dụng rộng rãi. Năm 2012, một nghiên cứu phối hợp nhiều trung tâm chăm sóc sức khỏe sinh sản tại Mỹ đã báo cáo rằng aCGH đã phát hiện thêm 6% các thai nhi được chẩn đoán trước sinh có bất thường di truyền mà karyotyping không phát hiện được; khả năng phát hiện bất thường dị bội nhiễm sắc thể của aCGH là tương đương với karyotyping [5]. Nghiên cứu của Marketa W. và cộng sự năm 2019 cho thấy aCGH phát hiện 5,9% đột biến trên trẻ chậm PTTTVD mà có karyotype bình thường [6]. Ngày nay, cộng đồng khoa học ngày càng thảo luận nhiều về dự kiến trong tương lai gần, aCGH có khả năng sẽ thay thế karyotype trong chẩn đoán bất thường di truyền ở mức độ tế bào. Nghiên cứu của Kan và cộng sự năm 2014 tại Hongkong đã khuyến cáo dùng aCGH như một xét nghiệm ưu tiên thay thế karyotyping vì hiệu quả chẩn đoán và các ưu điểm của aCGH [7].

Ở Việt Nam, áp dụng kỹ thuật aCGH cho chẩn đoán di truyền vẫn còn khá mới mẻ, kỹ thuật này đòi hỏi thực hiện quy trình phức tạp, nghiêm ngặt, đòi hỏi nhân lực được đào tạo chuyên sâu trong phân tích, giải thích và tư vấn kết quả di truyền. Cùng với công cuộc triển khai áp dụng các kỹ thuật mới để nâng

cao hiệu quả chẩn đoán bất thường di truyền ở Việt Nam, chúng tôi thực hiện đề tài này với mục tiêu nghiên cứu:

Hoàn thiện kỹ thuật lai so sánh hệ gen trong phân tích bất thường nhiễm sắc thể từ mẫu máu và mẫu dịch ối.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

+ Được chia làm 2 nhóm

- Nhóm I: từ 24 mẫu máu ngoại vi, được thu thập từ bệnh nhân có 1 hoặc phối hợp các đặc điểm sau: chậm phát triển tâm thần, chậm phát triển thể chất, bất thường hình thái bẩm sinh, đã phát hiện bất thường trên NST đồ... Các dị tật đều được khẳng định bởi các bác sĩ lâm sàng.

- Nhóm II: từ 24 mẫu dịch ối, được thu thập từ thai phụ có chỉ định chọc ối do thai có bất thường hình thái như bất thường hệ tim mạch, tiết niệu, tiêu hóa, não...

+ Thời gian nghiên cứu từ tháng 9/2019 đến tháng 9/2020.

+ Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm tư vấn di truyền, Bệnh viện ĐH Y Hà Nội.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp mô tả cắt ngang

2.2.1. Tách chiết DNA: DNA từ mẫu máu

tĩnh mạch hoặc từ mẫu dịch ối được tách chiết bằng bộ kit Qiagen.

2.2.2. Kỹ thuật lai tín hiệu huỳnh quang: DNA đạt tiêu chuẩn về nồng độ và độ tinh sạch sẽ được tiến hành phân đoạn bằng bộ enzym cắt tạo thư viện các đoạn DNA kích thước từ 200-500 bp (tên bộ kit), Sau đó đánh dấu huỳnh quang lên DNA (màu huỳnh quang Cy3 lai với mẫu chứng, Cy5 lai với mẫu bệnh). Mẫu sau đánh dấu huỳnh quang được tinh sạch và đưa vào buồng lai của Agilent 8x60K CGH. Kết quả lai được scan và phân tích bằng phần mềm của Cytogenomic của Agilent.

### 2.3. Đạo đức nghiên cứu

Các số liệu và thông tin nghiên cứu là chính xác, trung thực, khách quan và được chấp thuận bởi cơ sở nghiên cứu. Bệnh nhân hoặc người giám hộ hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu. Bệnh nhân và người nhà bệnh nhân sẽ được thông báo về kết quả xét nghiệm gen để giúp cho các bác sĩ tư vấn di truyền hoặc lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp. Các thông tin cá nhân sẽ được đảm bảo bí mật và chỉ phục vụ công tác nghiên cứu.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Kết quả tách chiết DNA

**Bảng 3.1.** Kết quả đo nồng độ và độ tinh sạch DNA của 24 mẫu máu

|    | Nồng độ DNA<br>>20ng/ul | Nồng độ DNA<br><20ng/ul | OD 260/230nm<br>>1,8 | OD 260/280nm<br>1,8-2,0 |
|----|-------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| n  | 24                      | 0                       | 25                   | 25                      |
| %  | 100%                    | 0                       | 100%                 | 100%                    |
| TB | 72,7±40,2               | 0                       | 1,84±0,07            | 1,88±0,08               |

**Nhận xét:** Kết quả tách chiết bằng bộ kit Qiagen cho nồng độ DNA >20 ng/μl ở tất cả các mẫu; và 100% độ tinh sạch DNA đối với RNA, protein và các chất dư thừa đều đạt chuẩn

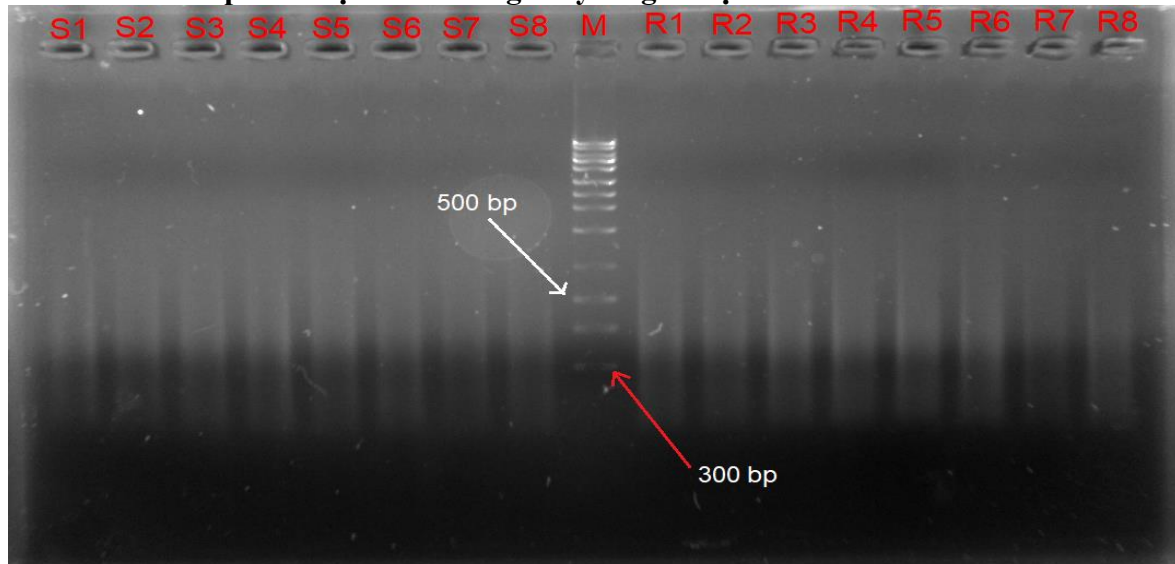
>1,8. Nồng độ DNA thấp nhất là 27,5 ng/ul, cao nhất là 202,5 ng/ul phù hợp với yêu cầu của kỹ thuật aCGH cần nồng độ DNA tối thiểu là 20 ng/ul.

**Bảng 3.2.** Kết quả đo nồng độ và độ DNA của 24 mẫu dịch ối

|    | Nồng độ DNA<br>>20ng/ul | Nồng độ DNA<br><20ng/ul | OD 260/230nm<br>>1,8 | OD 260/280nm<br>1,8-2,0 |
|----|-------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| n  | 22                      | 2                       | 25                   | 25                      |
| %  | 91,7%                   | 8,3%                    | 100%                 | 100%                    |
| TB | 30,7±15,2               | 15,7±2,2                | 1,87±0,06            | 1,86±0,04               |

**Nhận xét:** Kết quả tách chiết bằng bộ kit Qiagen có 22 mẫu đạt nồng độ DNA >20 ng/ul (91,7%) và 2 mẫu có nồng độ <20ng/ul (8,3%). Tất cả các mẫu có độ tinh sạch DNA đối với RNA, protein và các chất dư thừa đều đạt chuẩn >1,8.

### 3.2. Hình ảnh phân đoạn DNA bằng enzyme giới hạn



**Hình 3.1.** Hình ảnh điện di sản phẩm phân đoạn DNA bằng điện di trên gel agarose 0,8%

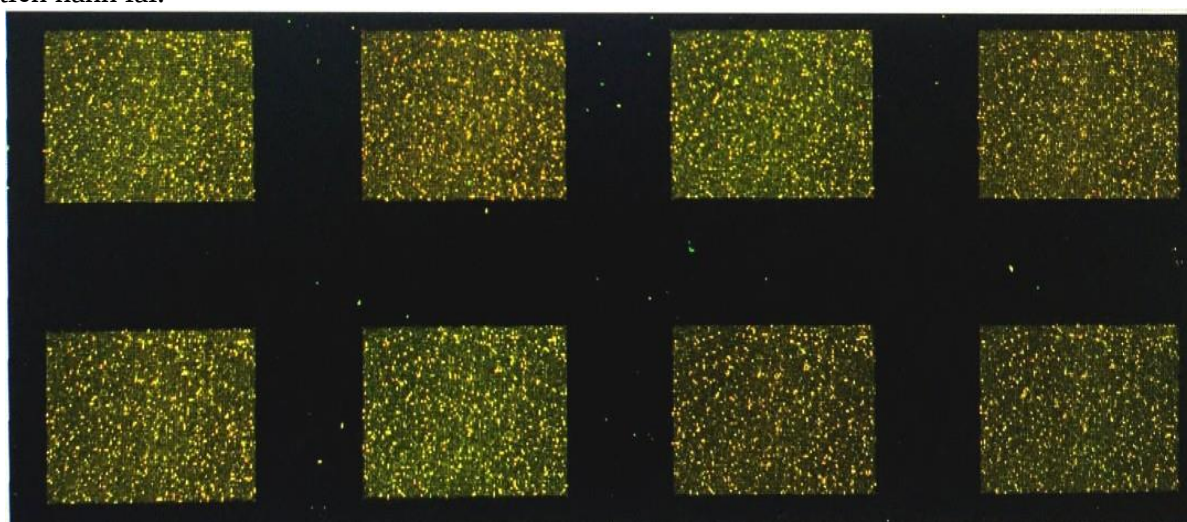
Thang DNA của hãng Norgen Biotek Corporation, Canada : Thang DNA với band nhỏ nhất là 100bp; Các giếng từ S1 đến S8 là các mẫu nghiên cứu. Các giếng từ R1 đến R8 là các mẫu chứng lần lượt tương ứng với S1-S8.

**Nhận xét:** Các band của thang DNA chuẩn đều xuất hiện rõ nét. Các mẫu nghiên cứu từ S1 đến mẫu số S8 và các mẫu chứng từ R1 đến mẫu số R8 đều cho thấy kích thước sản phẩm cắt của các mẫu tập trung ở khoảng từ 200 bp đến 500 bp là kích thước đạt yêu cầu để thực hiện tiếp các bước đánh dấu.

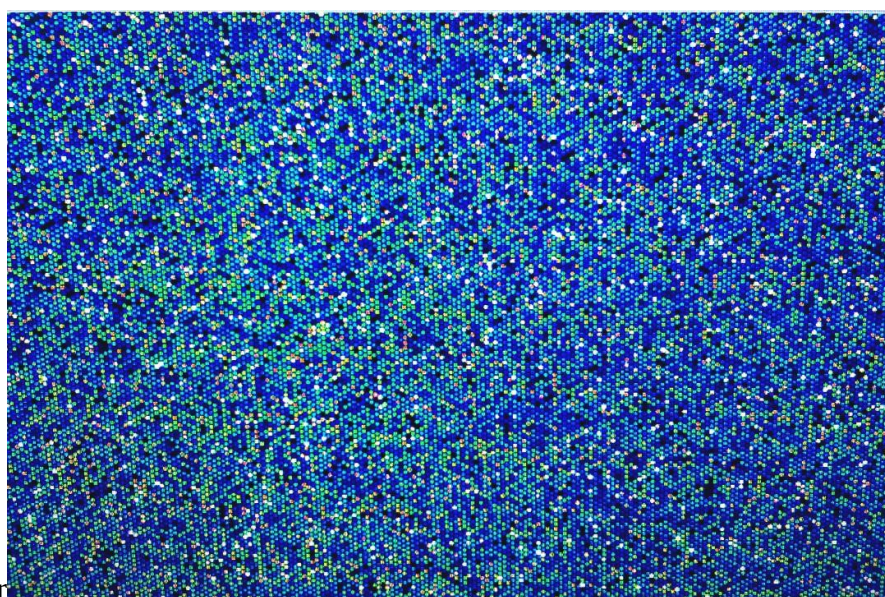
**Bảng 3.3.** Bảng đánh giá chất lượng gắn huỳnh quang

|               | Nồng độ DNA được<br>gắn huỳnh quang<br>(ng/μl) | Nồng độ huỳnh<br>quang được gắn<br>(pmol/μl) | Sản lượng<br>đánh dấu (μg) | Hoạt tính<br>đặc hiệu<br>(pmol/μg) |
|---------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Giá trị TB±SD | 320,4 ± 30,1                                   | 19,2 ± 2,2                                   | 3,5 ± 0,3                  | 43 ± 1,3                           |

**Nhận xét:** Nồng độ DNA được gắn huỳnh quang là  $320,4 \pm 30,1$  ng/ $\mu$ l, nồng độ huỳnh quang được gắn là  $19,2 \pm 2,2$  pmol/ $\mu$ l, từ đó chúng tôi tính toán được sản lượng đánh dấu (Yield) và hoạt tính đặc hiệu (Specific Activity) của từng loại huỳnh quang lần lượt là  $3,5 \pm 0,3$   $\mu$ g,  $43 \pm 1,3$  pmol/ $\mu$ g tương ứng với khuyến cáo khi sản lượng đánh dấu từ 3-6  $\mu$ g thì hoạt tính đặc hiệu từ 15-50 pmol/ $\mu$ g, từ đó chúng tôi lựa chọn mẫu bệnh và mẫu chứng phù hợp để tiến hành lai.



**Hình 3.2.** Hình ảnh quét slide bằng phần mềm Agilent SureScan Microarray



Scanner

**Hình 3.3.** Hình ảnh tín hiệu lai của 1 array được phóng đại lên 20x

**Nhận xét:** Hình ảnh thu được sau khi quét slide bằng phần mềm Agilent SureScan Microarray Scanner, 1 slide gồm 8 array có tín hiệu rõ nét, viền gọn gàng, phổ màu tín hiệu đồng đều, các tín hiệu huỳnh quang nền yếu hoặc không xuất hiện, đảm bảo việc lai đã không bị tạp nhiễm và các chất huỳnh quang dư thừa đã được rửa sạch.

### 3.3. Phân tích kết quả bất thường nhiễm sắc thể

**Bảng 3.4.** Tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể được phát hiện bằng kỹ thuật aCGH

|             | Kết quả aCGH |            | Kết quả nhiễm sắc thể |            |
|-------------|--------------|------------|-----------------------|------------|
|             | n            | %          | n                     | %          |
| Bất thường  | 14           | 29,2       | 6                     | 12,5       |
| Bình thường | 34           | 70,8       | 42                    | 87,5       |
| <b>Tổng</b> | <b>48</b>    | <b>100</b> | <b>48</b>             | <b>100</b> |

**Nhận xét:** Trong 48 mẫu nghiên cứu, kỹ thuật aCGH phát hiện 14 mẫu bất thường (29,2%), NST đồ phát hiện 6 mẫu bất thường (12,5%).

## IV. BÀN LUẬN

Kỹ thuật lai so sánh hệ gen thực hiện với quy trình phức tạp, nghiêm ngặt; giá thành cao; đòi hỏi nhân lực được đào tạo chuyên môn sâu trong phân tích, giải thích và tư vấn kết quả, vì vậy dễ hạn chế sai sót tối đa trong quá trình thực hiện thì sau mỗi bước đều cần có tiêu chuẩn để kiểm chứng chất lượng trước khi chuyển sang bước tiếp theo.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tất cả 24 mẫu DNA tách chiết từ máu ngoại vi bằng bộ kit Qiagen cho nồng độ DNA tối thiểu là 27,5 ng/ul với độ tinh sạch từ 1,8 - 2,0. Đây là nồng độ đạt tiêu chuẩn > 20 ng/ul, đảm bảo lượng DNA tổng số trong khoảng 200 - 500ng để thực hiện phản ứng cắt đoạn DNA. Tuy nhiên, với 24 mẫu tách chiết từ dịch ối, chỉ có 22 mẫu đạt nồng độ chuẩn trên 20 ng/ul, còn 2 mẫu thấp hơn 20 ng/ul, chúng tôi đã tiến hành cô DNA bằng phương pháp cồn thông thường, và thu được nồng độ cao hơn, đảm bảo đủ lượng DNA tổng số cho phản ứng tiếp theo. Vì vậy ở các bước đánh dấu huỳnh quang và lai với mẫu chứng, hai mẫu này vẫn đảm bảo đạt chuẩn kỹ thuật. Sản phẩm phân đoạn DNA trong nghiên cứu đều nằm trong dải ngưỡng tiêu chuẩn từ 200 - 500 bp để có thể thực hiện phản ứng gắn huỳnh quang và lai tiếp theo.

Sản lượng đánh dấu (Yield) và hoạt tính đặc hiệu (Specific Activity) của từng loại

màu huỳnh quang được lựa chọn giữa mẫu bệnh và mẫu chứng phù hợp để tiến hành lai chứng với nhau, sao cho mẫu bệnh và mẫu chứng có giá trị sản lượng đánh dấu và hoạt tính đặc hiệu càng tương thích thì khả năng lai thành công càng cao. Bên cạnh đó, các thông số độ áp lưới, độ nhiễu và cường độ tín hiệu lai của từng kênh màu đều nằm trong giới hạn yêu cầu. Với bộ kiểm soát chất lượng của kỹ thuật aCGH gồm nhiều thông số như phân tích ở trên đã đảm bảo cho sự thành công và tin cậy của kết quả xét nghiệm. Ở mỗi giai đoạn kỹ thuật đều có thông số kiểm soát chất lượng tương ứng giúp cho việc phát hiện lỗi kỹ thuật kịp thời, tránh lãng phí hóa chất và nguyên liệu xét nghiệm ở các giai đoạn tiếp theo [8].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, nhiễm sắc thể đồ phát hiện 12,5% bất thường, trong khi đó aCGH phát hiện được 29,2%. Như vậy, kỹ thuật aCGH giúp tăng khả năng phát hiện bất thường di truyền thêm 16,7% so với kỹ thuật nhiễm sắc thể đồ truyền thống, tỉ lệ này cao hơn hẳn các nghiên cứu đã có như nghiên cứu của Ronald J Wapner và cộng sự năm 2012 [5], nghiên cứu của Anita SY Kan và cộng sự năm 2014 cùng là 6% [7]. Nguyên nhân gây ra sự khác biệt này giữa các nghiên cứu là do trong tiêu chuẩn chọn mẫu nghiên cứu và cỡ mẫu. Nghiên cứu của chúng tôi có cỡ mẫu nghiên cứu nhỏ và tập

trung vào đối tượng có bất thường bẩm sinh, chậm PTTT, chậm PTVĐ, là các đối tượng có nguyên nhân bất thường di truyền cao, hay các thai phụ có kết quả siêu âm thai bất thường về hình thái...

## V. KẾT LUẬN

Trong 48 mẫu thu được kết quả aCGH, nồng độ DNA tối thiểu là 20 ng/μl đảm bảo lượng DNA tổng số từ 200 - 500ng. Điện di sản phẩm phân đoạn DNA có kích thước từ 200-500 bp thì khả năng đánh dấu huỳnh quang đạt yêu cầu. Sản lượng sau gắn huỳnh quang của 48 mẫu nghiên cứu từ 3-6 μg tương ứng với hoạt tính đặc hiệu từ 15-50 pmol/μg. Như vậy quy trình kỹ thuật của aCGH có nhiều giai đoạn khác nhau. Mỗi giai đoạn đều có các tiêu chuẩn để đối chứng, đảm bảo cho quy trình được thành công và kết quả phân tích được rõ ràng.

Kỹ thuật aCGH cho phép phát hiện bất thường nhiễm sắc thể với tỷ lệ cao hơn so với phương pháp karyotyping truyền thống. Điều này khẳng định thêm ưu điểm vượt trội của kỹ thuật aCGH trong việc phát hiện bất thường di truyền ở mức độ nhiễm sắc thể.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Redon R., Ishikawa S., Fitch K. R. et al (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 444(7118):444-54
2. Carreira I.M., Ferreira S.I., Matoso E. et al (2015). Copy number variants prioritization after array-CGH analysis-a cohort of 1000 patients. *Mol Cytogenet*.
3. Callaway J.L., Shaffer L.G., Chitty L.S. et al (2013). The clinical utility of microarray technologies applied to prenatal cytogenetics in the presence of a normal conventional karyotype: a review of the literature. *Prenat Diagn*.
4. Sagoo G.S., Butterworth A.S., Sanderson S., Shaw-Smith C., Higgins J.P., Burton H. (2009). Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med*. 11(3):139-46.
5. Wapner R.J., Martin C.L., Levy B. et al (2012). Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med*.
6. Marketa Wayhelova et al (2019). The clinical benefit of array-based comparative genomic hybridization for detection of copy number variants in Czech children with intellectual disability and developmental delay, *BMC Medical Genomics*. 12:111
7. Kan Anita S. Y., Lau Elizabeth T., Tang W. F. et al (2014). Whole-genome array CGH evaluation for replacing prenatal karyotyping in Hong Kong. *PloS one*. 9(2):e87988-e87988.
8. Bryan Ronald, J. deLeeuw Coe et al (2004). SeeGH—a software tool for visualization of whole genome array comparative genomic hybridization data. *BMC bioinformatics*. 5(1):13

# NGHIÊN CỨU HOÀN THIỆN KỸ THUẬT ONE STEP T-ARMS-PCR VÀ TOUCHDOWN PCR TRONG PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN PKD1 GÂY BỆNH THẬN ĐA NANG DI TRUYỀN TRỘI

Nguyễn Thị Việt Hà\*, Trần Văn Khoa\*, Nguyễn Thị Hồng Vân\*\*

## TÓM TẮT

Bệnh thận đa nang di truyền trội (ADPKD) có những triệu chứng chủ yếu là hình thành các nang làm giãn nở các ống thận và các cơ quan khác như gan, lách, tuyến tụy và là nguyên nhân dẫn đến suy thận giai đoạn cuối. Việc phát hiện sớm ADPKD có ý nghĩa lớn với các gia đình có người bị bệnh. **Mục tiêu:** Nghiên cứu của chúng tôi nhằm xây dựng và áp dụng quy trình phát hiện đột biến trên gen PKD1 trên mẫu máu ngoại vi và mẫu phôi ở từng gia đình cụ thể có bệnh thận đa nang di truyền trội. Nghiên cứu tiến hành trên một số mẫu máu ngoại vi và mẫu phôi ngày 5 của gia đình tình nguyện tham gia nghiên cứu. **Đối tượng và phương pháp:** Tiến hành sàng lọc phát hiện đột biến từ một thành viên bị bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới - NGS (Next generation sequencing). Hoàn thiện quy trình One Step T-ARMS-PCR và Touchdown PCR để kiểm tra đột biến trên mẫu máu và mẫu phôi. **Kết quả:** Quy trình sử dụng kết hợp T-ARMS-PCR và Touchdown PCR đã cho kết quả chính xác trong việc xác định người mang gen đột biến gây bệnh, ít tốn kém hơn so với NGS. Có thể áp dụng quy trình này để áp dụng cho các gia đình mang đột biến tương tự.

**Từ khóa:** PKD1, Bệnh thận đa nang di truyền trội, chẩn đoán di truyền chuyển phôi, T-ARMS-PCR, Touchdown PCR.

## SUMMARY

### STUDY ON ONE STEP T-ARMS-PCR AND TOUCHDOWN PCR FOR PKD1 MUTATION DETECTION IN AUTOSOMAL-DOMINANT POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE

Autosomal dominant polycystic kidney disease (APKD) is mainly characterized by progressive cystic dilatation of the renal tubules and other organs like liver, spleen, pancreas, and accounting for the end-stage renal disease population. Early detection and pre-implantation genetic diagnosis (PGD) of ADPKD have a great meaning for members in families of patient. Our research aims to develop and apply a mutant detection process on PKD1 gene in peripheral blood samples and embryos in each specific family with polycystic kidney disease. The research was conducted on a number of peripheral blood samples and embryos on the 5<sup>th</sup> day of voluntarily family. One patient in this family was screened to detect exact mutations by using NGS. The process of T-ARMS-PCR and Touchdown PCR were completed to check mutations in peripheral blood samples and embryos. The process of using T-ARMS-PCR and Touchdown PCR has resulted in accurate identification of the carriers having the mutant gene. This process is less expensive than NGS and we can be used for other ADPKD families with the same mutation.

\*Học viện quân y

\*\*Đại học KHTN, ĐHQG Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Trần Văn Khoa

Email: tvkhoabiomed@gmail.com

Ngày nhận bài: 10.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 24.9.2020

Ngày duyệt bài: 19.11.2020

**Key words:** PKD1, Autosomal-dominant polycystic kidney disease, T-ARMS-PCR, Touchdown PCR.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh thận đa nang di truyền theo gen trội nằm trên NST thường (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease = ADPKD) là rối loạn di truyền phổ biến nhất của thận. Tỷ lệ ước tính khoảng 1/1000-1/500 ở các nước phương tây [9]. Theo đặc điểm giải phẫu bệnh, thận đa nang thường có nang ở cả hai bên. Thận tăng kích thước dần, có nhiều nang lớn nhỏ không đều nhau, đường kính từ 0,3- 0,5 cm và dẫn đến hậu quả cuối cùng thường là suy thận. Nguyên nhân gây ADPKD là do đột biến trên gen PKD1, PKD2, trong đó 85% nguyên nhân là do đột biến trên gen PKD1.

Đối với bệnh thận đa nang di truyền trội liên quan tới đột biến trên gen PKD1, PKD2 có đặc điểm của gen trội gây bệnh và bệnh thường khởi phát muộn khi người mang gen khoảng 30 tuổi. Đối với các bệnh nhân PKD1 (các bệnh nhân mang đột biến trên gen PKD1) khi chuyển sang suy thận giai đoạn cuối có độ tuổi trung bình 54 tuổi, sớm hơn khoảng 20 năm và thường có biểu hiện nguy hiểm hơn so với các bệnh nhân PKD2 [4], [5]. Do vậy, việc chẩn đoán sớm bệnh là hết sức cần thiết nhất là đối với các gia đình có người bị bệnh thận đa nang di truyền trội. Việc chẩn đoán sớm bệnh có ý nghĩa trong việc thực hiện tốt công tác tư vấn di truyền đối với những người mang gen bệnh nhưng chưa có triệu chứng biểu hiện bệnh, giúp chuẩn bị tâm lý cũng như có các biện pháp điều trị sớm hoặc ngăn các biến chứng có thể xảy ra, giúp trì hoãn việc khởi phát suy thận giai đoạn cuối. Bên cạnh đó, việc chẩn đoán sớm là không thể thiếu đối với các cá nhân

tham gia thực hiện hiến thận để cấy ghép, tránh trường hợp những người tham gia hiến thận là những người mang gen gây bệnh làm cho thận ghép sớm bị suy. Ngoài ra, việc thực hiện chẩn đoán sớm trước khi chuyển phôi giúp cho các cặp vợ chồng mang gen bệnh tiến hành thụ tinh nhân tạo có cơ hội sinh được những em bé không mang gen trội gây bệnh. Từ đó, giúp giảm việc phát tán và lưu hành gen đột biến gây bệnh PKD1, PKD2 trong quần thể, giảm áp lực lên xã hội.

Với sự phát triển của nhiều kỹ thuật nhằm xác định các đột biến trên gen PKD1 và PKD2, kết quả các nghiên cứu đã cho thấy có nhiều đột biến trên cả hai gen, đặc biệt trên gen PKD1 có tới hàng ngàn đột biến gây bệnh [7], [8] với nhiều dạng đột biến khác nhau. Tuy nhiên, cùng trên nhiễm sắc thể 16, có 6 vùng gen giả của PKD1 có độ tương đồng cao (97,7%) với trình tự từ 5'UTR cho đến exon 32 [2], [7]. Do sự tương đồng cao này nên việc xác định đột biến của gen PKD1 gặp nhiều khó khăn. Hơn nữa, PKD1 là một gen lớn có nhiều exon, việc sử dụng Long range PCR có thể áp dụng được với mẫu thông thường, nhưng không khả thi với mẫu phôi. T-ARMS-PCR sử dụng 4 trình tự mỗi trong một phản ứng phát hiện được đồng thời alen bình thường và đột biến, có khả năng phát hiện đột biến trong các mẫu trộn (bình thường lẫn đột biến). Trong khi Touchdown PCR cho phép tăng độ nhạy và độ đặc hiệu [1]. Hiện nay ở Việt Nam các nghiên cứu di truyền về bệnh thận đa nang di truyền trội do đột biến trên gen PKD1 và PKD2 và đặc biệt nghiên cứu trên các mẫu phôi chưa được thực hiện. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài: “Nghiên cứu hoàn thiện quy trình one step T-ARMS-PCR và Touchdown PCR trong phát hiện đột biến PKD1 gây bệnh thận đa nang di truyền trội” trên một

gia hệ ở Việt Nam mang đột biến trên gen PKD1.

Đề tài tiến hành với hai mục tiêu:

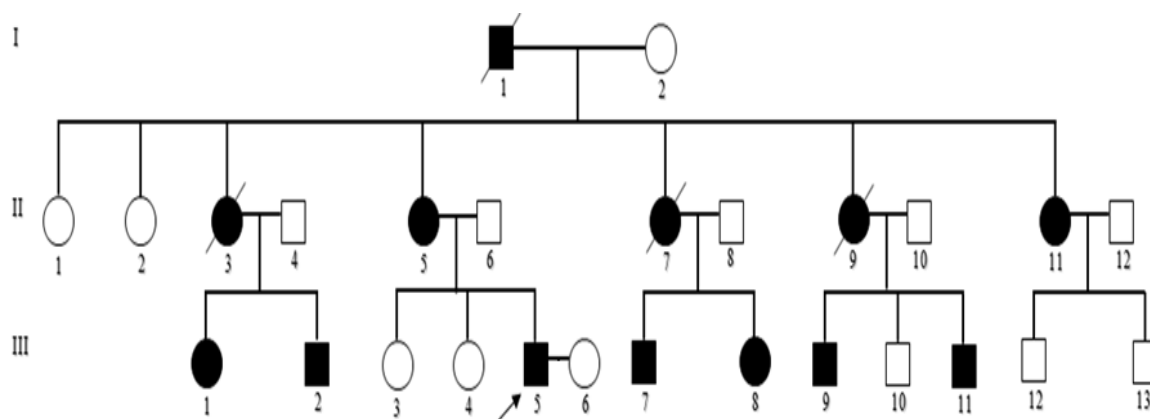
- *Mục tiêu 1: Hoàn thiện kỹ thuật T-ARMS-PCR và Touchdown PCR để phát hiện đột biến trên gen PKD1 ở người bị bệnh thận đa nang di truyền trội.*

- *Mục tiêu 2: Ứng dụng hai kỹ thuật T-ARMS-PCR và Touchdown PCR để phát hiện sớm đột biến gen PKD1 ở mẫu máu và mẫu phôi của các thành viên trong phả hệ bệnh ADPKD.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu để hoàn thiện hai kỹ thuật T-ARMS-PCR và Touchdown PCR là mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân đã được chẩn đoán bị bệnh thận đa nang di truyền trội đã được xác định có đột biến mất 3 nucleotid c.9859-9861delCTC trên gen PKD1 bằng giải trình tự gen thể hệ mới và mẫu máu ngoại vi của các đối tượng có quan hệ huyết thống với bệnh nhân.

Đối tượng áp dụng quy trình là các mẫu phôi của gia đình người bệnh và mẫu máu ngoại vi của các thành viên trong gia hệ.

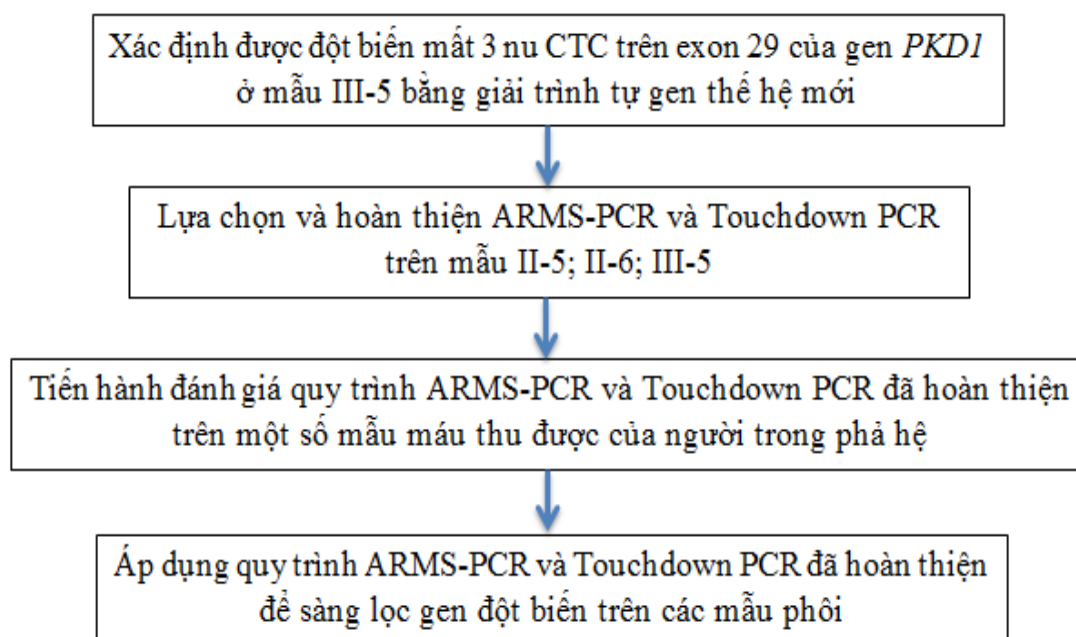


**Hình 1:** Phả hệ gia đình bị bệnh ADPKD (III-5)

Do trong dòng họ có nhiều người đã được chẩn đoán mắc bệnh thận đa nang và mất ở độ tuổi khá sớm, bản thân III-5 cũng là người bị bệnh. Cặp vợ chồng III-5, III-6 mong muốn sinh được những người con khỏe mạnh không mang bệnh giống III-5. Gia đình đã thực hiện IVF và có được 4 phôi và muốn kiểm tra để có phôi tốt nhất để thực hiện chuyển phôi.

Đối với trường hợp gia đình bệnh nhân III-5, do đột biến nằm trên exon 29 gen PKD1 nên nhóm nghiên cứu đã tiến hành thiết kế mỗi nhân exon 29 và tiến hành giải trình tự theo phương pháp Sanger, tuy nhiên

phương pháp này không phát hiện được được đột biến trên mẫu máu của bệnh nhân. Chúng tôi cũng đã sử dụng kỹ thuật Long range PCR nhân đoạn gen dài từ exon 1 đến exon 34 và kết hợp với Nested PCR và giải trình tự đã phát hiện được đột biến trên mẫu máu III-5. Tuy nhiên quy trình này không thể áp dụng trên các mẫu phôi do đặc điểm của sản phẩm nhân toàn bộ hệ gen. Do vậy, nhóm nghiên cứu tiến hành nghiên cứu với trường hợp gia đình bị bệnh ADPKD có đột biến mất 3 Nu CTC ở exon 29 trên gen PKD1 như sau:



**Hình 2:** Sơ đồ tiến hành nghiên cứu trường hợp gia đình bị ADPKD có đột biến mất 3 Nu CTC ở exon 29 trên gen PKD1

Với trường hợp bệnh nhân ADPKD có đột biến mất 3 Nu CTC ở exon 29 trên gen PKD1 nêu trên, chúng tôi tự thiết kế mỗi phản ứng T-ARMS-PCR để nhận các sản phẩm: 1 sản phẩm cho alen control (371bp); 1 sản phẩm cho alen bình thường (227bp); 1 sản phẩm cho alen đột biến (200bp).

**Bảng 1:** Trình tự mỗi cho T-ARMS-PCR

| Mỗi | Trình tự                           | Kích thước sản phẩm |
|-----|------------------------------------|---------------------|
| AFm | 5'-GTTGGCGCCCAGGAAGAGGCAGATACGA-3' | AFm + ARo: 200bp    |
| ARw | 5'-TCGCATCCAGAGGGCCACCTGCTGATTC-3' | AFo + ARw: 227bp    |
| AFo | 5'-CTGTGTCGACGCTCAGCGGGCTCAACCT-3' | AFo + ARo: 371bp    |
| ARo | 5'-CCTGCAGTGCGGCCCTCCCTGCCTACTA-3' |                     |

Song song với kỹ thuật T-ARMS-PCR, chúng tôi cũng hoàn thiện kỹ thuật Touchdown PCR.

**Bảng 2:** Trình tự mỗi cho Touchdown PCR

| Mỗi | Trình tự                      | Kích thước sản phẩm |
|-----|-------------------------------|---------------------|
| TFw | 5'-AGGAAGAGGCAGATAATG-3'      | TFw + TRo: 116bp    |
| TFm | 5'-GTTGGCGCCCAGGAAGAGGAAGA-3' | TFm + TRo: 123bp    |
| TRo | 5'-CGTGGCTTCTTTCGAAG-3'       |                     |

Với trình tự mỗi trên, sản phẩm sau khi nhân lên sẽ gồm 1 sản phẩm cho alen bình thường (116bp) và 1 sản phẩm cho alen đột biến (123bp).

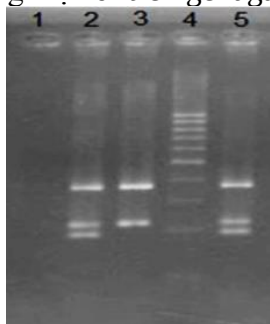
### III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 1. Hoàn thiện kỹ thuật T-ARMS-PCR phát hiện đột biến gen PKD1 ở người bệnh ADPKD

Qua quá trình thiết kế mồi và kiểm tra hoàn thiện kỹ thuật nhóm nghiên cứu đưa ra trình tự mồi của phản ứng T-ARMS-PCR nhằm phát hiện trường hợp đột biến mất 3 nucleotid trên exon 29 của gen PKD1 của bệnh nhân III-3 và hai thành viên khác trong gia đình như sau:

Sau khi tiến hành chạy gradient với dải nhiệt độ gắn mồi khác nhau chúng tôi đã tối ưu được nhiệt độ phản ứng T-ARMS-PCR: 95°C trong 5 phút; (95°C trong 45 giây, 60°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút) 30 chu kỳ; 72°C trong 5 phút.

Thể tích thành phần phản ứng PCR bao gồm 3µl ADN tổng số; 0,5µl mồi Fm; 0,25µl mồi Rw; 0,25µl mồi Fo; 0,5µl mồi Ro; 12,5µl Mastermix trong tổng thể tích 1 phản ứng là 25µl. Sản phẩm nhân gen bằng T-ARMS-PCR sau khi thực hiện xong sẽ được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 3%.



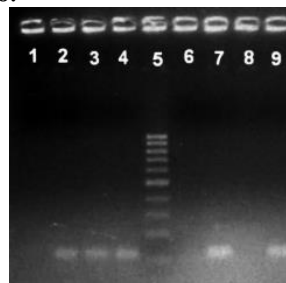
**Hình 3:** Kết quả điện di sản phẩm của phản ứng T-ARMS-PCR. Giếng 1: Chứng âm, Giếng 2: Mẫu III-5, Giếng 3: Mẫu II-6, Giếng 5: Mẫu II-5, Giếng 4: Marker 100bp

Theo như kết quả phản ứng T-ARMS-PCR cho thấy, mẫu III-5 và II-5 đều lên 3 băng với kích thước lần lượt là 200bp, 227bp và 371bp. Mẫu II-6 chỉ thấy xuất hiện 2 băng với kích thước 227bp và 371bp. Theo đặc

điểm thiết kế mồi của chúng tôi đã đưa ra ở trên chúng tôi cả 2 mẫu II-5 và III-5 đều mang gen đột biến gây bệnh và mẫu II-6 không mang gen gây bệnh. Đối chiếu với thông tin thực tế thu thập được từ chồng của III5, nhận thấy kết quả chẩn đoán nhờ T-ARMS-PCR đúng với thực tế biểu hiện của bệnh.

**2. Hoàn thiện kỹ thuật Touchdown PCR phát hiện đột biến gen PKD1 ở người bệnh ADPKD.** Touchdown PCR được tiến hành với đặc điểm cơ bản là đặt nhiệt độ gắn mồi cao, sau đó giảm dần qua một số chu kỳ đến một nhiệt độ gắn mồi phù hợp. Tiếp theo các chu kỳ khuếch đại gen được tiến hành như PCR thường. Trong quá trình hoàn thiện kỹ thuật, sau khi tiến hành chạy gradient với dải nhiệt độ gắn mồi khác nhau chúng tôi đã tối ưu được nhiệt độ phản ứng Touchdown PCR: 95°C trong 5 phút; (95°C trong 10 giây, 66°C trong 45 giây, 72°C trong 30 giây) 10 chu kỳ với mỗi chu kỳ giảm 1°C ở giai đoạn gắn mồi; (95°C trong 10 giây, 56°C trong 45 giây, 72°C trong 30 giây) 25 chu kỳ; 72°C trong 5 phút.

Thể tích thành phần phản ứng PCR đơn mồi bao gồm 3µl ADN tổng số; 0,25µl mồi Fm hoặc 0,25µl mồi Fm; 0,25µl mồi Ro; 12,5µl Mastermix trong tổng thể tích 1 phản ứng là 25µl. Kiểm tra sản phẩm phản ứng chạy Touchdown PCR bằng điện di trên gel agarose 2%.



**Hình 4:** Kết quả điện di sản phẩm phản ứng Touchdown PCR. Giếng 1, 6: chứng âm;

*Giếng 2, 7 mẫu III-5; giếng 3, 8: mẫu II-6; giếng 4, 9: mẫu II-5; giếng 5: Marker 100bp.*

Theo kết quả điện di có thể nhận thấy với mẫu III-5 và II-5 đều lên cả 2 đoạn có kích thước 116bp và 123bp chứng tỏ 2 mẫu này có mang gen đột biến gây bệnh. Với mẫu II-6 chỉ lên 1 băng có kích thước 116bp chứng tỏ mẫu không mang gen bệnh. Đối chiếu với thông tin thực tế thu thập được từ bệnh nhân, nhận thấy kết quả phù hợp với kết quả của T-ARMS-PCR và đúng với thực tế biểu hiện của bệnh.

### **3. Kết quả chạy kiểm chứng kỹ thuật T-ARMS-PCR và Touchdown PCR trên các mẫu máu thành viên có quan hệ huyết thống và mẫu phôi.**

Sau khi hoàn thiện quy trình phát hiện đột biến bằng cả hai kỹ thuật T-ARMS-PCR và Touchdown PCR trên 3 mẫu II-5, II-6 và III-5, chúng tôi tiến hành chạy trên 8 mẫu máu thu thập được trong phả hệ bao gồm: II-11; III-1; III-2; III-3; III-4; III-9; III-11; III-12. Kết quả thu được cho thấy rằng kết quả chẩn đoán của cả 2 kỹ thuật là trùng khớp với nhau và đúng với thông tin thực tế về biểu hiện bệnh mà chúng tôi thu thập được. Như vậy, cả 2 kỹ thuật đều đã đưa ra được kết quả đáng tin cậy trong việc chẩn đoán đột biến mất 3 nucleotid CTC trên gen PKD1 từ vị trí 9859 đến 9861 ở 5/8 thành viên được xét nghiệm trong phả hệ, đó là: II-11, III-1, III-2, III-9, III-11; 3/8 thành viên không bị bệnh là III-3, III-4, III-12.

Kết quả cho thấy có thể áp dụng 2 kỹ thuật này để chẩn đoán đối với mẫu phôi của cặp vợ chồng III-5 với III-6 trên cơ sở đã phát hiện đột biến gen gây ADPKD ở III-5, còn người vợ III-6 không bị đột biến gen. Đối với các gia đình khác mang đột biến giống III-5, có thể sử dụng luôn hai kỹ thuật đã hoàn thiện trên.

Bằng việc áp dụng 2 kỹ thuật đã hoàn thiện trên mẫu máu ngoại vi, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra phát hiện đột biến gen PKD1 trên 4 mẫu phôi của cặp vợ chồng này. Trong đó 1 mẫu phôi mang đột biến và 3 mẫu không mang đột biến gen PKD1. Một phôi không mang đột biến gen PKD1 đã được chuyển và thành công.

## **IV. BÀN LUẬN**

Kết quả phát hiện đột biến ở bệnh nhân mất 3 nucleotid CTC trên gen PKD1 từ vị trí 9859 đến 9861. Đây là đột biến đã được xác định gây bệnh. Các tác giả trước thường sử dụng các phương pháp như Long range PCR hoặc giải trình tự gen thế hệ mới để phát hiện đột biến, nhưng các phương pháp này không áp dụng được trên mẫu phôi [6, 9]. Với kỹ thuật T-ARMS-PCR và Touchdown PCR trong nghiên cứu của chúng tôi có thể áp dụng để chẩn đoán trên cả mẫu máu ngoại vi và trên cả mẫu phôi. Toàn bộ môi của cả hai kỹ thuật T-ARMS-PCR và Touchdown PCR đều được nhóm nghiên cứu tìm hiểu và tự thiết kế. Sau khi chạy song song cả hai kỹ thuật trên mẫu máu ngoại vi, chúng tôi thấy rằng các sản phẩm tạo ra không có sản phẩm phụ, chạy điện di bằng sáng, rõ nét và đúng kích thước đoạn cần nhận lên. Điều quan trọng là kết quả chẩn đoán của cả hai kỹ thuật là trùng khớp nhau. Dùng hai kỹ thuật này phù hợp với dữ liệu lâm sàng thực tế về người mang gen bệnh và người không mang gen bệnh. Như vậy kết quả chẩn đoán của hai phương pháp là đáng tin cậy.

Với hai kỹ thuật được sử dụng trên chúng ta hoàn toàn có thể sàng lọc cho các bệnh nhân bị bệnh thận đa nang di truyền trội mang đột biến mất 3 nucleotid CTC trên gen PKD1 từ vị trí 9859 đến 9861 giống như trường hợp trong nghiên cứu này. Với các

thành viên còn lại trong gia hệ sẽ phát hiện được sớm bệnh thận đa nang di truyền trội nếu mang gen bệnh. Điều này góp phần vào việc phát hiện và hạn chế sự phát triển của bệnh.

## V. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu hoàn thiện hai kỹ thuật T-ARMS-PCR và Touchdown PCR trên mẫu máu ngoại vi và ứng dụng các kỹ thuật trên mẫu máu ngoại vi và 4 phôi của gia đình tự nguyện tham gia nghiên cứu chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

- Đã hoàn thiện được hai kỹ thuật T-ARMS-PCR và Touchdown PCR để phát hiện đột biến mất 3 nucleotid CTC ở exon 29 trên gen PKD1 của người bệnh ADPKD.

- Đã ứng dụng thành công hai kỹ thuật T-ARMS-PCR và Touchdown PCR để phát hiện đột biến mất 3 nucleotid CTC ở exon 29 trên gen PKD1 trên mẫu phôi và mẫu máu ngoại vi của các thành viên trong gia đình bị bệnh ADPKD.

## VI. KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục áp dụng kỹ thuật xây dựng được theo nguyên lý tương tự trên các gia đình bệnh thận đa nang mang các đột biến điểm khác.

- Tiến hành sàng lọc phát hiện đột biến gen gây bệnh thận đa nang đối với người hiến thận và chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi cho các cặp vợ chồng có nguyện vọng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Darren J Korbie & John S Mattick (2008)**, "Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification". *Nature Protocols* volume 3, pages1452–1456.
2. **Loftus, Brendan J, et al. (1999)**, "Genome duplications and other features in 12 Mb of DNA sequence from human chromosome 16p and 16q", *Genomics*. 60(3), pp. 295-308.
3. **Mohammad Mehdi Heidari, Mehdi Hadadzadeh and Hossein Fallahzadeh, (2019)**, "Development of One-Step Tetra-primer ARMS-PCR for Simultaneous Detection of the Angiotensin Converting Enzyme (ACE) I/D and rs4343 Gene Polymorphisms and the Correlation with CAD Patients". *Avicenna J Med Biotechnol*. Jan-Mar; 11(1): 118–123.
4. **Olivier Devuyst and York Pei. (2020)**, "Next-generation sequencing for detection of somatic mosaicism in autosomal dominant polycystic kidney disease". *Kidney International*, 97, 261–263.
5. **Ravine, David, et al. (1992)**, "Phenotype and genotype heterogeneity in autosomal dominant polycystic kidney disease", *The Lancet*. 340(8831), pp. 1330-1333.
6. **Rossetti, Sandro, et al. (2012)**, "Identification of gene mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease through targeted resequencing", *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(5), pp 915–933.
7. **Symmons, Orsolya, Váradi, András, and Arányi, Tamás (2008)**, "How segmental duplications shape our genome: recent evolution of ABCC6 and PKD1 Mendelian disease genes", *Molecular biology and evolution*. 25(12), pp. 2601-2613.
8. **Tafti, Fatemeh Hajizadeh, et al. (2017)**, "Linkage Analysis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease in Iranian Families through PKD1 and PKD2 DNA Microsatellite Markers", *Nephro-Urology Monthly*. 9(4), e59996.
9. **Torres, Vicente E, Harris, Peter C, and Pirson, Yves (2007)**, "Autosomal dominant polycystic kidney disease", *The Lancet*. 369(9569), pp. 1287-1301.

## ĐẶC ĐIỂM KIỂU HÌNH VÀ DI TRUYỀN PHÂN TỬ CỦA BỆNH NHÂN ĐÁI THÁO ĐƯỜNG SƠ SINH TẠI BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG

Cần Thị Bích Ngọc\*, Vũ Chí Dũng\*

### TÓM TẮT

Đái tháo đường sơ sinh (ĐTĐSS) là bệnh hiếm với tỷ lệ 1/300000-1/400000 trẻ sơ sinh để sống là tình trạng tăng glucose máu trong vòng 6 tháng đầu sau đẻ, phải điều trị bằng insulin. Nguyên nhân của ĐTĐSS là do đột biến gen. Chẩn đoán phân tử trong ĐTĐSS đóng vai trò quan trọng thực hành lâm sàng. **Mục tiêu:** 1/ Phát hiện đột biến của các gen ở các bệnh nhân đái tháo đường sơ sinh. 2/ Mô tả kiểu hình lâm sàng và hóa sinh ở bệnh nhân đái tháo đường sơ sinh. **Đối tượng và phương pháp:** 51 bệnh nhân được mô tả triệu chứng lâm sàng, sinh hóa và đột biến gen. Bệnh nhân và bố mẹ được phân tích gen theo phương pháp PCR, giải trình tự gen thế hệ mới, PCR-methylation, cho các gen đã được xác định gây ĐTĐSS. **Kết quả:** 51 bệnh nhân được chẩn đoán 7-357 ngày tuổi (Trung vị: 44,5) tuổi thai  $39,0 \pm 1,7$  tuần, cân nặng lúc sinh  $2698,0 \pm 527,0$ g, cân nặng lúc sinh thấp  $< 10^{\text{th}}$  chiếm 64,7% các trường hợp. Tỷ lệ nhập viện có biểu hiện nhiễm toan xê tôn là 60,8% với pH  $7,14 \pm 0,2$ , glucose máu  $37,1 \pm 12,9$  mmol/l, HbA1C  $7,26 \pm 2,9$  %. Phân tích gen có 14 bệnh nhân đột biến sai nghĩa dị hợp tử KCNJ11, 13 bệnh nhân có đột biến ABCC8, 10 bệnh nhân có bất thường vùng in dấu di truyền trên nhiễm sắc thể số 6 (6q24), 9 bệnh nhân có đột biến gen INS, 2 bệnh nhân có đột biến gen EIF2AK3, 1

bệnh nhân có đột biến gen FOXP3, 1 bệnh nhân có đột biến gen EIF2B1 và 1 bệnh nhân có đột biến gen IL2RA. **Kết luận:** phân tích gen cho bệnh nhân ĐTĐSS giúp chẩn đoán xác định bệnh, hiểu rõ về cơ chế bệnh sinh và lựa chọn phương pháp điều trị phù hợp.

**Từ khóa:** neonatal diabetes mellitus, Đái tháo đường sơ sinh tạm thời, Đái tháo đường sơ sinh vĩnh viễn

### SUMMARY

#### PHENOTYPE AND MOLECULAR GENETICS OF PATIENTS WITH NEONATAL DIABETES MELLITUS IN VIETNAM NATIONAL CHILDREN'S HOSPITAL

Neonatal diabetes mellitus (NDM) is a rare (1:300,000-400,000 newborns) but potentially devastating metabolic disorder characterized by hyperglycemia combined with low levels of insulin. The major causes of neonatal diabetic mellitus are gene mutation. Molecular diagnosis of patients with NDM is important in clinical practice. **Objective:** 1/ To identify gene mutations in the patients with neonatal diabetes. 2/ To describe clinical and biochemistry phenotypes of patient with NDM. **Subject and methods:** clinical features, biochemical finding, mutation analysis of 51 cases from 51 unrelated families were study. DNA from patients and parents was mutation analysis by PCR or sequencing, PCR-methylation method for genes identified to cause diabetes. **Results:** 51 cases onset at 7-357 days of age (median: 44.5) with gestation age of  $39.0 \pm 1.7$  weeks and birth

\*Bệnh viện Nhi Trung Ương

Chịu trách nhiệm chính: Cần Thị Bích Ngọc

Email: ngocctb@nhp.org.vn

Ngày nhận bài: 26.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 10.10.2020

Ngày duyệt bài: 19.11.2020

weight of  $2698.0 \pm 527.0\text{g}$ , low birth weight under  $10^{\text{th}}$  in 64.7% cases. The rate of cases admitted with the feature of diabetes keton acidosis is 60.8% with pH of  $7.14 \pm 0.2$ , blood glucose of  $37.1 \pm 12.9\text{mmol/L}$ , HbA1C of  $7.26 \pm 2.9\%$ . Mutation analysis showed 14 patients with heterozygous for a KCNJ11 missense mutation, 13 patients with ABCC8 mutations, 10 patients with abnormal of imprinting on chromosom 6 (6q24), and 9 patients with INS mutation, two patients with EIF2AK3, one patient with FOXP3, one patient with EIF2B1 and one patient with IL2RA gene mutation. **Conclusions:** Determine gene mutations for neonatal diabetic mellitus help to confirm diagnosis, understand the pathology, diagnosis and chose a suitable therapy

**Key word:** neonatal diabetes mellitus, Transient neonatal diabetes, Permanent neonatal diabetes.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đái tháo đường (ĐTĐ) sơ sinh là tình trạng tăng glucose máu xuất hiện trong 6 tháng đầu sau đẻ. Đây là bệnh lý bẩm sinh hiếm gặp với tỷ lệ mới mắc là  $1/215000 - 1/500000$  trẻ sơ sinh đẻ sống và khoảng 50% biểu hiện bệnh trong 4 tuần đầu sau đẻ. Diễn biến của bệnh có thể là tạm thời và đôi khi tái phát sau đó hoặc vĩnh viễn suốt đời. Nguyên nhân của ĐTĐ sơ sinh là do di truyền, đột biến các gen dẫn đến mất chức năng của tuyến tụy hay đảo tụy, giảm số lượng tế bào beta thứ phát, tăng phá huỷ tế bào beta hoặc rối loạn chức năng tế bào beta của tụy nội tiết gây giảm bài tiết insulin.

ĐTĐ ở giai đoạn sơ sinh thường biểu hiện triệu chứng kích thích, nôn, thở nhanh và mất nước. Các triệu chứng điển hình như đái nhiều, uống nhiều khó nhận biết. Trẻ dễ được chẩn đoán nhầm là viêm dạ dày, nhiễm khuẩn hô hấp và nhiễm khuẩn huyết trước

khi được chẩn đoán nhiễm toan xê tôn. Bệnh ĐTĐ sơ sinh nếu không được chẩn đoán và điều trị kịp thời sẽ tử vong hoặc di chứng tâm thần kinh.

Nhờ những tiến bộ của di truyền phân tử, hiện nay, chúng ta có thể phát hiện đột biến gây ĐTĐ sơ sinh, giúp khẳng định chẩn đoán, quyết định phương pháp điều trị, tiên lượng bệnh đối với bệnh nhân cũng như các thành viên khác trong gia đình và tư vấn di truyền. Đặc biệt, phát hiện được các đột biến gen gây ĐTĐ sơ sinh đã làm thay đổi chiến lược điều trị. Chính vì vậy, nghiên cứu được tiến hành với các mục tiêu:

1. Phát hiện đột biến của các gen ở các bệnh nhân đái tháo đường sơ sinh.
2. Mô tả kiểu hình lâm sàng và hóa sinh ở bệnh nhân đái tháo đường sơ sinh.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu bao gồm 51 bệnh nhân nhỏ hơn 12 tháng tuổi được chẩn đoán ĐTĐ tại Khoa Nội tiết - Chuyển hóa - Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương từ 1/2000 ÷ 1/2019.

- **Tiêu chuẩn lựa chọn:** những bệnh nhân có đủ các tiêu chuẩn sau sẽ được chọn vào nghiên cứu:

- + Tăng glucose máu xuất hiện trước 12 tháng tuổi [1];
  - + Glucose máu đói  $\geq 126 \text{ mg/dl}$  ( $7,0 \text{ mmol/l}$ ) (đói là không ăn ít nhất 4 giờ ở trẻ 0 ÷ 1 tuổi) hoặc glucose máu bất kỳ  $> 200 \text{ mg/dl}$  ( $>11,1 \text{ mmol/l}$ );
  - + Tình trạng tăng glucose máu đói kéo dài trên 2 tuần phải điều trị bằng insulin;
  - + Bệnh nhân và gia đình chấp thuận tham gia nghiên cứu
- **Tiêu chuẩn loại trừ:**
- + Những trường hợp tăng glucose máu do

truyền dung dịch có glucose, do nhiễm trùng hoặc stress khác.

+ Bệnh nhân và gia đình không đồng ý tham gia nghiên cứu.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu một loạt các ca bệnh bao gồm: phát hiện đột biến một số gen và xét nghiệm hóa sinh. Chọn mẫu theo phương thức chọn mẫu thuận tiện.

Các thông tin lâm sàng được thu thập: tiền sử sản khoa, cân nặng lúc sinh các triệu chứng lâm sàng, các xét nghiệm: glucose máu, HbA1C, C-peptid, khí máu, xê tôn niệu, điện giải đồ giúp chẩn đoán xác định bệnh đái tháo đường và tình trạng bệnh.

ADN của bệnh nhân và bố mẹ được chiết tách theo quy trình chuẩn từ bạch cầu lympho máu ngoại vi, được phân tích gen tại Phòng xét nghiệm di truyền phân tử, Đại học Y, Đại học Exeter theo phương pháp PCR, giải trình tự gen thế hệ mới, đối với các gen: ABCC8, AGPAT2, BSCL2, CISD2, CNOT,

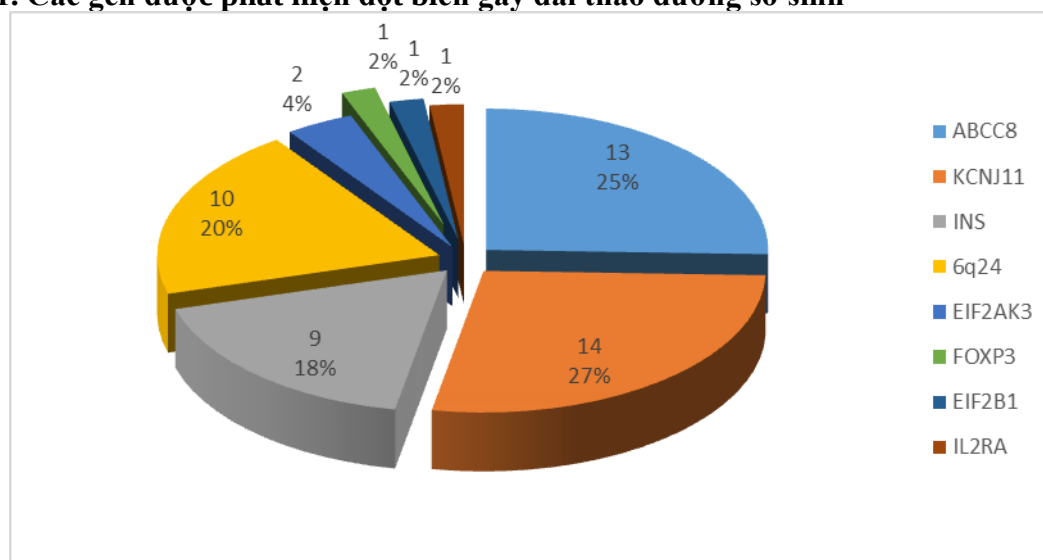
COQ2, COQ9, EIF2S3, EIF2AK3, FOXP3, GATA4, GATA6, GCK, GLIS3, HN F1B, IER3IP1, IL2RA, INS, INSR, KCNJ11, LPL, LRBA, MNX1, NEUROD1, NEUROG 3, NKX2-2, PDX1, PTF1A, RFX6, SLC2A2, SLC19A2, STAT3, WFS1 và ZFP57 và PCR-methylation với nhiễm sắc thể 6q24.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trong nghiên cứu này, 60 bệnh nhân đủ tiêu chuẩn chẩn đoán ĐTD sơ sinh trong 18 năm (2000-2019) tại Khoa Nội tiết - Chuyển hóa - Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương. Trong đó, 37 bệnh nhân nam (61,6%) và 23 bệnh nhân nữ (38,3%). Tất cả 60 bệnh nhân được phân tích để phát hiện đột biến của các gen có liên quan, kết quả có 51 (85,0%) bệnh nhân phát hiện được đột biến.

Trong 51 bệnh nhân có đột biến gen, có 21 nữ, 30 nam. Tuổi chẩn đoán từ 7 ngày tuổi - 357 ngày tuổi (trung vị: 45).

### 3.1. Các gen được phát hiện đột biến gây đái tháo đường sơ sinh



**Biểu đồ 1. Tỷ lệ các gen bị đột biến gây đái tháo đường sơ sinh**

**Nhận xét:** Đột biến gen ABCC8 và KCNJ11 là hai nguyên nhân phổ biến nhất gây đái tháo đường sơ sinh

### 3.2. Các biến đổi sinh hóa ở bệnh nhân đái tháo đường sơ sinh có đột biến gen

Trong 51 bệnh nhân có đột biến gen, 34 bệnh nhân có cân nặng lúc sinh thấp  $\leq 10^{\text{th}}$  chiếm 66,6%, 32 bệnh nhân nhập viện trong bệnh cảnh nhiễm toan xê tôn chiếm 62,7%.

**Bảng 1. Kết quả sinh hóa của bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh có đột biến gen khi chẩn đoán**

| STT | Xét nghiệm hóa sinh                    | Kết quả                           | Giá trị bình thường |
|-----|----------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| 1.  | Glucose (mmol/L)                       | 37,1 $\pm$ 12,9                   | 3,9-5,8             |
| 2.  | HbA1C (%)                              | 7,26 $\pm$ 2,9                    | 4,6 - 6,2           |
| 3.  | C-peptide (nmol/L)                     | 0,00003 - 0,52<br>(trung vị 0,08) | 1,1-4,4             |
| 4.  | pH                                     | 7,14 $\pm$ 0,2                    | 7,35-7,45           |
| 5.  | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L) | 10,9 $\pm$ 8,8                    | 13-28               |
| 6.  | BE                                     | -16,5 $\pm$ 10,4                  | -3 - +3             |

**Nhận xét:** Bệnh nhân nhập viện trong bệnh cảnh nhiễm toan chuyển hóa nặng với glucose máu và HbA1C tăng cao

**Bảng 2. Đặc điểm lâm sàng và sinh hóa của các thể ĐTĐ sơ sinh**

| Đặc điểm lâm sàng                               | ABCC8 (n=13)                | KCNJ11 (n=14)                 | INS (n=9)               | 6q24 (n=10)                 | P (test Kruskal-Wallis) |
|-------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Tuổi thai (tuần)                                | 39,8 $\pm$ 0,5              | 38,9 $\pm$ 1,3                | 37,3 $\pm$ 3,0          | 38,4 $\pm$ 2,6              | 0,076                   |
| Cân nặng lúc sinh (kg)                          | 2,8 $\pm$ 0,34              | 2,7 $\pm$ 0,5                 | 2,8 $\pm$ 0,76          | 2,1 $\pm$ 0,3               | 0,226                   |
| Cân nặng lúc sinh $\leq 10^{\text{th}}$ (n) (%) | 9/13 (69,2)                 | 8/14 (57,1)                   | 4/9 (44,4)              | 8/10 (80)                   |                         |
| Tuổi chẩn đoán (ngày)                           | 50,6 $\pm$ 23,1             | 62,1 $\pm$ 39,7               | 129 $\pm$ 128           | 25,4 $\pm$ 12,1             | 0,076                   |
| Toan xê tôn (n (%))                             | 10 (76,9)                   | 11(78,5)                      | 5 (55,5)                | 3 (30)                      |                         |
| Triệu chứng thần kinh (n)                       | 1/13                        | 1/14                          | 0/6                     | 0/9                         |                         |
| pH                                              | 7,16 $\pm$ 0,2              | 7,1 $\pm$ 0,17                | 7,04 $\pm$ 0,22         | 7,02 $\pm$ 0,25             | 0,618                   |
| HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)          | 8,9 $\pm$ 6,9               | 1-28,9<br>Trung vị 3,85       | 2-22,4<br>Trung vị 2,65 | 12,8 $\pm$ 10,5             | 0,216                   |
| BE                                              | -16,8 $\pm$ 8,9             | -20,3 $\pm$ 11,0              | -19,6 $\pm$ 11,2        | -11,3 $\pm$ 0,49            | 0,296                   |
| Glucose (mmol/L)                                | 32,6 $\pm$ 11,4             | 38,8 $\pm$ 11,6               | 34,2 $\pm$ 12,7         | 41,3 $\pm$ 10,9             | 0,462                   |
| HbA1C (%)                                       | 7,46 $\pm$ 2,5              | 8,1 $\pm$ 3,3                 | 9,8 $\pm$ 3,6           | 5,7 $\pm$ 1,7               | 0,206                   |
| C-peptide (nmol/L)                              | 0,01 -0,52<br>Trung vị 0,08 | 0,0002-0,27<br>Trung vị 0,085 | 0,088 $\pm$ 0,082       | 0,03 -0,17<br>Trung vị 0,41 | 0,913                   |
| Xê tôn niệu (+) (n)                             | 9/9                         | 8/10                          | 5/6                     | 3/9                         |                         |

**Nhận xét:** không có sự khác biệt có ý nghĩa lâm sàng về các biểu hiện lâm sàng (cân nặng lúc sinh, tuổi thai, tuổi chẩn đoán) các biểu hiện hóa sinh (glucose, HbA1c, c-peptide, pH,  $\text{HCO}_3^-$ , BE) giữa các thể đái tháo đường sơ sinh do các đột biến gen khác nhau.

#### IV. BÀN LUẬN

##### 4.1. Đột biến gen ở bệnh nhân đái tháo đường sơ sinh

Trong 19 năm (từ 1/2000 đến 1/2019), có 60 bệnh nhân đủ tiêu chuẩn ĐTĐ sơ sinh và chiếm 8,9% các trường hợp ĐTĐ ở trẻ dưới 15 tuổi tại bệnh viện Nhi Trung ương. Chúng tôi tiến hành phân tích gen cho 60 bệnh nhân này và phát hiện được 51 bệnh nhân có đột biến gen chiếm 85,0%. Các gen phát hiện được đột biến là ABCC8, KCNJ11, INS, EIF2AK3, FOXP3, IEF2B1, IL2RA và bất thường vùng in dấu di truyền trên nhiễm sắc thể số 6. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả của nghiên cứu quốc tế đa trung tâm có số lượng bệnh nhân lớn nhất là 1020 từ 79 quốc gia [2]. Trong nghiên cứu này tỷ lệ phát hiện được đột biến gen là 82% (840/1020), phổ biến nhất là đột biến các gen mã hóa cho kênh  $K_{ATP}$ .

Nghiên cứu ở Ukraina [3] tiến hành trên 24 bệnh nhân ĐTĐ trong vòng 6 tháng đầu sau sinh, tỷ lệ phát hiện được đột biến gen là 19/24 (84,6%) cũng tương tự như trong nghiên cứu của chúng tôi. Phân bố đột biến gen hay gặp lại là KCNJ11 (7/19; 36,8%), tiếp theo đến các gen ABCC8 (4/19; 21%), INS (4/19; 21%), 6q24 (3/19; 15,7%), EIF2AK3 (2/19; 10,5%), và các gen khác GLIS3 và GCK (1/19; 5,2%).

Nghiên cứu của Cao Bingyan và cs [4] ở Trung Quốc thì không có sự khác biệt về tỷ lệ phát hiện các gen đột biến, tuy nhiên lại có

sự khác biệt về tuổi chẩn đoán và tỷ lệ đột biến của từng gen so với nghiên cứu trên các bệnh nhân Việt Nam.

Một nghiên cứu ở Slovakia [9] trong 23 năm (1981-2004), 8 bệnh nhân được chẩn đoán ĐTĐ trước 6 tháng tuổi, trong đó 6/8 bệnh nhân được chẩn đoán trước 3 tháng tuổi. Tỷ lệ phát hiện được đột biến gen là 6/8 (75%) thấp hơn trong nghiên cứu của chúng tôi. Các đột biến gen phát hiện được là KCNJ11 4/6 (66,8%), ABCC8 1/6 (16,6%), EIF2AK3 1/6 (16,6%).

Như vậy tỷ lệ phát hiện được đột biến trong nghiên cứu của chúng tôi tương tự như trong nghiên cứu ở Ukraina và Trung Quốc nhưng cao hơn trong nghiên cứu tại Slovakia. Trong đó đột biến gen mã hóa cho kênh  $K_{ATP}$  trong các nghiên cứu đều là nguyên nhân phổ biến gây ĐTĐ sơ sinh và KCNJ11 chiếm tỷ lệ cao nhất. Sự khác biệt này có thể do yếu tố chủng tộc hoặc do cỡ mẫu nghiên cứu chưa đủ lớn, chưa cân bằng giữa các nghiên cứu và chưa đại diện được cho quần thể.

##### 4.2. Đặc điểm lâm sàng và biến đổi hóa sinh ở bệnh nhân đái tháo đường sơ sinh

Kết quả từ bảng 1 cho thấy bệnh nhân nhập viện trong bệnh cảnh nhiễm toan xê tôn nặng với glucose máu rất cao, toan chuyển hóa nặng, trong khi HbA1c tăng không tương xứng với chỉ số glucose máu. Điều này có thể do trong máu trẻ sơ sinh hemoglobin bào thai HbF còn chiếm tỷ lệ cao, trong khi HbA chỉ chiếm 10 - 20%. Trong 6 tháng đầu sau đẻ, HbF dần dần được thay thế bởi HbA. Thông thường HbA1C không phù hợp để chẩn đoán ĐTĐ ở trẻ < 6 tháng tuổi, tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi, chỉ số HbA1C tăng có ý nghĩa. Điều này có thể do, glucose máu tăng rất cao không chỉ ở thời điểm chẩn đoán mà có thể

đã tăng một thời gian trước đó nhưng chưa được phát hiện ngay.

Kết quả từ bảng 2 cho thấy toàn bộ bệnh nhân có các đột biến gen ở các nhóm khác nhau đều có tuổi thai > 37 tuần, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh tuổi thai của bệnh nhân ở các nhóm này với nhau. Điều này cho thấy đột biến gen không gây ảnh hưởng đến tuổi thai của bệnh nhân.

Về cân nặng lúc sinh, kết quả từ bảng 2 cho thấy cân nặng lúc sinh trung bình của các nhóm bệnh nhân có đột biến KCNJ11, ABCC8 và bất thường NST số 6 ở khoảng 10 bách phân vị so với cân nặng có cùng tuổi thai, còn của nhóm có đột biến INS gần như trong giới hạn bình thường. Trong 4 nhóm này, cân nặng lúc sinh của nhóm có đột biến NST số 6 là thấp nhất. Tuy nhiên không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh cân nặng lúc sinh của các nhóm với nhau.

Chậm phát triển trong tử cung gặp ở 95% các bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh tạm thời, đặc biệt trong quá trình phát triển từ quý thứ 3 của thai kỳ, cân nặng lúc sinh thường là 1,5 - 2,5 kg. Trong thực tế, cân nặng lúc sinh thấp có thể coi như bằng chứng cho sự giảm bài tiết insulin trong tử cung, và vai trò của insulin như là một yếu tố tăng trưởng đóng vai trò quan trọng trong sự tăng trưởng và phát triển của thai. Điều chú ý quan trọng là insulin từ mẹ không qua được rau thai và vì vậy chậm phát triển trong tử cung do giảm bài tiết insulin sẽ ảnh hưởng đến nhiều thông số như cân nặng, chiều dài và vòng đầu.

Ngược lại, tỷ lệ chậm phát triển trong tử cung ở bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh vĩnh viễn lại thấp hơn. Một nghiên cứu thuần tập năm 2002 tại Pháp cho thấy tỷ lệ chậm phát triển trong tử cung trong nhóm trẻ ĐTĐ sơ sinh tạm thời là 74% còn ở nhóm trẻ ĐTĐ sơ sinh

vĩnh viễn là 36%. Hơn nữa bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh tạm thời được chẩn đoán sớm hơn (trung bình là 6 ngày, từ 1-81 ngày) so với ĐTĐ sơ sinh vĩnh viễn (trung bình là 27 ngày, từ 1-127 ngày). Cân nặng lúc sinh thấp hơn có ý nghĩa ở bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh tạm thời ( $1987 \pm 510$  gram) so với bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh vĩnh viễn ( $2497 \pm 610$  gram). Mặc dù lý do chưa rõ ràng nhưng giả thiết cho rằng ảnh hưởng đến chức năng của tế bào  $\beta$  và tăng trưởng biểu hiện sớm sau sinh ở những bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh tạm thời, trong khi khả năng đáp ứng cho sự tăng trưởng của tế bào  $\beta$  đối với sự phát triển của bào thai giảm nhanh sau sinh ở những bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh vĩnh viễn. Nghiên cứu của Flanagan (2007) và cs [6] cho thấy cân nặng lúc sinh giảm có ý nghĩa ở những bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh tạm thời do bất thường NST số 6 so với bệnh nhân ĐTĐ sơ sinh tạm thời do đột biến kênh  $K_{ATP}$ . Các tác giả cũng nhận thấy không có sự khác biệt về cân nặng lúc sinh giữa hai nhóm bệnh nhân có đột biến ABCC8 và KCNJ11.

Trong nghiên cứu của chúng tôi cân nặng lúc sinh của bệnh nhân cao hơn so với các nghiên cứu trên: đối với nhóm có đột biến gen ABCC8 là từ 2500-3500 gram, nhóm có đột biến KCNJ11 là từ 2300-3900 gram, nhóm đột biến INS là 1500-3600 gram và nhóm có đột biến NST số 6 là 2000-3200 gram. Tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm. Sự khác biệt này có thể là do cỡ mẫu của chúng tôi còn nhỏ, cân nặng lúc sinh giữa các bệnh nhân dao động lớn và không đồng đều giữa các bệnh nhân.

Về tuổi chẩn đoán, kết quả trong bảng 2 cho thấy tuổi chẩn đoán của nhóm bệnh nhân có đột biến NST số 6 là thấp nhất phù hợp với kết quả trong nghiên cứu đã đề cập trên

đây. Tuy nhiên bệnh nhân của chúng tôi được chẩn đoán muộn hơn. Điều này có thể do triệu chứng của bệnh thường không rõ ràng, bệnh nhân thường có biểu hiện với triệu chứng của nhiễm khuẩn đường hô hấp trên, nhiễm khuẩn tiêu hóa hoặc thậm chí là bệnh nhân chỉ có biểu hiện quấy khóc, ngủ ít và không tăng cân hoặc giảm cân. Do vậy bệnh nhân có thể được chẩn đoán nhầm là bệnh nhiễm trùng trước khi được chẩn đoán là ĐTĐ. Kết quả từ bảng 1 và bảng 2 cho thấy tình trạng toan chuyển hóa nặng với pH,  $\text{HCO}_3^-$ , BE rất thấp phù hợp với tình trạng chẩn đoán muộn của bệnh nhân. Bệnh nhân nhập viện trong bệnh cảnh nhiễm toan xê tôn nặng.

Theo nghiên cứu của Flanagan và cs [8] thì 86% bệnh nhân được chẩn đoán từ 0-8 tuần tuổi và tất cả các trường hợp đều được chẩn đoán trước 17 tuần tuổi. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nhóm bệnh nhân được chẩn đoán sớm nhất là nhóm có đột biến NST số 6 ở độ tuổi 17-40 ngày, bệnh nhân ABCC8 chẩn đoán ở độ tuổi 15-96 ngày, bệnh nhân KCNJ11 được chẩn đoán từ 7-160 ngày, còn nhóm bệnh nhân có đột biến insulin thì tuổi chẩn đoán từ 14-357 ngày. Như vậy tuổi chẩn đoán cũng rất khác nhau giữa các bệnh nhân, giữa các nhóm, tuy nhiên sự khác biệt này cũng không có ý nghĩa thống kê. Điều này có thể do số lượng bệnh nhân còn hạn chế.

Về triệu chứng lâm sàng và sinh hóa khi chẩn đoán, bảng 2 cho thấy, bệnh nhân có đột biến KCNJ11 có tỷ lệ nhập viện vì toan xê tôn cao nhất (8/9 bệnh nhân), trong khi chỉ có 1/5 bệnh nhân bất thường nhiễm sắc thể số 6 có biểu hiện toan xê tôn. Điều này phù hợp với tuổi chẩn đoán của bệnh nhân có đột biến KCNJ11 muộn nhất. Do chẩn đoán muộn nên dễ có biến chứng toan xê tôn. Tình

trạng toan xê tôn nặng với pH,  $\text{HCO}_3^-$  và BE rất thấp.

Trong nghiên cứu của chúng tôi có 2 bệnh nhân có biểu hiện triệu chứng thần kinh: 1 bệnh nhân có đột biến ABCC8, 1 bệnh nhân có đột biến KCNJ11 chiếm 10% các bệnh nhân có đột biến gen mã hóa kênh  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , và chiếm 8,6% các trường hợp đái tháo đường sơ sinh vĩnh viễn. Kết quả này thấp hơn so với các nghiên cứu khác. Theo Léon và cs [7], tỷ lệ bệnh nhân có biểu hiện thần kinh trong nhóm bệnh nhân ĐTĐ vĩnh viễn là 20% và cũng là tỷ lệ bệnh nhân trong nhóm có đột biến KCNJ11. Cho đến nay chỉ có đột biến KCNJ11 được mô tả gây nên hội chứng DEND hoặc hội chứng DEND trung gian (iDEND). Lý do là Kir6.2 biểu hiện ở nhiều mô bao gồm cả hệ thần kinh và cơ, tuy nhiên chưa rõ ràng liệu yếu cơ và chậm phát triển vận động biểu hiện trong hội chứng DEND có phải là hậu quả của đột biến Kir6.2 hay không [13]. Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi lại có một bệnh nhân có đột biến ABCC8 có biểu hiện thần kinh. Nghiên cứu của Flanagan và cs [6], trong 13 bệnh nhân có đột biến gen ABCC8 và 12 bệnh nhân có đột biến gen KCNJ11 thì có 4 bệnh nhân có biểu hiện thần kinh (16%) gặp ở cả hai nhóm. Biểu hiện thần kinh được báo cáo ở 3 bệnh nhân có đột biến ABCC8. Đột biến ABCC8 có biểu hiện hội chứng DEND đã đưa ra một cái nhìn mới về cơ sở của các biểu hiện ngoài tụy đặc trưng bởi hội chứng. Tuy nhiên SUR1 không biểu hiện ở cơ xương. Do vậy, vấn đề bất thường về vận động của bệnh nhân phải có nguồn gốc thần kinh. Nguyên nhân có thể là do trung ương hoặc ngoại vi khi SUR biểu hiện ở cả thần kinh trung ương và tận cùng của thần kinh vận động. Điều này cũng gợi ý rằng vấn đề thần kinh của bệnh nhân được mô tả có thể là

do hoạt hóa quá mức của neuron Kir6.2/SUR1. Giả thiết này phù hợp với sự nhạy cảm kém hơn với chuyển hóa của kênh Kir6.2/SUR1 ở tế bào thần kinh [8].

## V. KẾT LUẬN

Tỷ lệ phát hiện đột biến gen trong dải tháo đường sơ sinh là 82,5% (33/41 bệnh nhân). Các gen xác định được gây ĐTD sơ sinh bao gồm: KCNJ11 (27,0%), ABCC8 (25,0%), bất thường NST số 6 (20,0 %), INS (18%), EIF2AK3 (4,0%), FOXP3 (2,0%), EIF2B1 (2%), IL2RA (2%).

Tỷ lệ trẻ có cân nặng lúc sinh thấp là 63,0%. Tuổi chẩn đoán trong 6 tháng đầu sau sinh chiếm 96,9%. Toàn xê tôn khi được chẩn đoán gặp ở 63,0% bệnh nhân. HbA1C có thể không tăng ở thời điểm chẩn đoán, C-peptide thấp, glucose máu khi chẩn đoán rất cao thường trên 30 mmol/l.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **RubioCabezas O., Flanagan S.E., Damhuis A. và cộng sự. (2012).** KATP channel mutations in infants with permanent diabetes diagnosed after 6 months of life: KATP channels and infancy-onset diabetes. *Pediatr Diabetes*, **13**(4), 322–325.
2. **De Franco E., Flanagan S.E., Houghton J.A. và cộng sự. (2015).** The effect of early, comprehensive genomic testing on clinical care in neonatal diabetes: an international cohort study. *The Lancet*, **386**(9997), 957–963.
3. **Globa E., Zelinska N., Mackay D.J.G. và cộng sự. (2015).** Neonatal diabetes in Ukraine: incidence, genetics, clinical phenotype and treatment. *J Pediatr Endocrinol Metab*, **28**(11–12).
4. **Cao B., Gong C., Wu D. và cộng sự. (2016).** Genetic Analysis and Follow-Up of 25 Neonatal Diabetes Mellitus Patients in China. *J Diabetes Res*, **2016**, 1–9.
5. **Stanik J., Gasperikova D., Paskova M. và cộng sự. (2007).** Prevalence of Permanent Neonatal Diabetes in Slovakia and Successful Replacement of Insulin with Sulfonylurea Therapy in KCNJ11 and ABCC8 Mutation Carriers. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**(4), 1276–1282.
6. **Flanagan S.E., Patch A.-M., Mackay D.J.G. và cộng sự. (2007).** Mutations in ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel Genes Cause Transient Neonatal Diabetes and Permanent Diabetes in Childhood or Adulthood. *Diabetes N Y*, **56**(7), 1930–7.
7. **De León D.D. và Stanley C.A. (1993).** Permanent Neonatal Diabetes Mellitus. *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
8. **P P., Al A., J B. và cộng sự. (2006).** A heterozygous activating mutation in the sulphonylurea receptor SUR1 (ABCC8) causes neonatal diabetes. *Hum Mol Genet*, **15**, 1793–1800.

## HỘI CHỨNG IPEX LẦN ĐẦU ĐƯỢC CHẨN ĐOÁN VÀ ĐIỀU TRỊ TẠI VIỆT NAM

Cần Thị Bích Ngọc\*, Vũ Chí Dũng\*

### TÓM TẮT

IPEX là hội chứng hiếm và di truyền lặn liên kết nhiễm sắc thể X bao gồm rối loạn điều hòa miễn dịch, tổn thương nhiều tuyến nội tiết, tổn thương ruột non với biểu hiện lâm sàng là bong da, ỉa chảy khó điều trị, teo lông mao ruột, thiếu máu tan máu, bệnh tuyến giáp tự miễn và đái tháo đường (ĐTĐ) sơ sinh. Nguyên nhân là do đột biến gen FOXP3 trên nhánh ngăn nhiễm sắc thể giới tính X (Xp11.23) mã hóa cho protein chuỗi nhánh. **Mục tiêu:** mô tả đặc điểm kiểu gen và kiểu hình hội chứng IPEX và đánh giá kết quả điều trị bệnh nhân mắc hội chứng IPEX lần đầu được chẩn đoán và điều trị tại Việt Nam. **Đối tượng và phương pháp:** nghiên cứu một loạt ca bệnh. 3 bệnh nhân trong 1 gia hệ. được thăm khám, chẩn đoán và phân tích gen đột biến bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới cho panel gen gây đái tháo đường sơ sinh bao gồm KCNJ11, ABCC8, INS, INSR, EIF2AK3, FOXP3, GATA4, GATA6, GCK, GLIS3, HNF1B, IER3IP1, PDX1, PTF1A, NEUROD1, NEUROG3, RFX6, SLC2A2, SLC19A2, WFS1 và ZFP57. **Kết quả:** Ca bệnh 1: Trẻ nam tiền sử đẻ forcep, cân nặng lúc sinh 2,4 kg, sau đẻ khóc to, không suy hô hấp, vàng da từ ngày thứ 3 sau đẻ. Trẻ khám khi 11 ngày tuổi vì kết quả sàng lọc sơ sinh có nguy cơ cao suy giáp trạng bẩm sinh và nhập viện trong bệnh cảnh nhiễm toan xê tôn

nặng, suy giáp bẩm sinh. Bệnh nhân được điều trị toan xê tôn, suy giáp, tình trạng nhiễm khuẩn nặng, trẻ tử vong sau 4 ngày điều trị. Ca bệnh 2: trẻ nam, 5 tuổi chẩn đoán hen phế quản, 8 tuổi được chẩn đoán đái tháo đường typ 1, điều trị bằng insulin; 9 tuổi, nôn máu và đi ngoài phân đen, được chẩn đoán trào ngược dạ dày, thực quản, phải phẫu thuật Nissen, sau phẫu thuật có hẹp môn vị phải nông môn vị, tình trạng đau bụng và đi ngoài phân đen dai dẳng kéo dài kèm theo có các đợt viêm phổi tái diễn. Ca bệnh 3: trẻ nam 13 tuổi, hen phế quản từ khi 5 tuổi, nôn ra máu và đi ngoài phân đen từ khi 7 tuổi, phải nhập viện nhiều đợt vì xuất huyết tiêu hóa. Từ 9 tuổi trẻ xuất hiện nhiều đợt viêm phế quản được chẩn đoán hen phế quản phải điều trị dự phòng. Từ năm 12 tuổi trẻ được chẩn đoán đái tháo đường phải điều trị bằng insulin. Đái tháo đường kiểm soát tốt, nhưng trẻ phải nhập viện nhiều đợt vì xuất huyết tiêu hóa và viêm phổi, thở oxy tại nhà 5 tháng. Ba bệnh nhân được phân tích gen. Cả 3 bệnh nhân đều có đột biến mới dị hợp tử missense p.Pro378Leu của gen FOXP3. Sau khi có kết quả đột biến gen, bệnh nhân số 3 được điều trị bằng corticoid và Tacrolimus, tình trạng hô hấp cải thiện, không phải thở oxy, glucose máu kiểm soát tốt. **Kết luận:** Phân tích phân tử có vai trò quan trọng trong chẩn đoán và điều trị hội chứng IPEX.

**Từ khóa:** Hội chứng IPEX, Đái tháo đường sơ sinh.

### SUMMARY

#### IPEX SYNDROME: THE FIRST DIAGNOSIS AND MANAGEMENT IN VIETNAM

\*Bệnh viện Nhi Trung Ương

Chịu trách nhiệm chính: Vũ Chí Dũng

Email: dungvu@nch.org.vn

Ngày nhận bài: 28.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 11.10.2020

Ngày duyệt bài: 19.11.2020

IPEX stands for immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked. Individuals with IPEX syndrome typically develop other types of autoimmune disorders in addition to those that involve the intestines, skin, and endocrine glands. The cause of syndrome is changes (mutations) of the FOXP3 gene, which is located on the X chromosome. Methods: case series report. Subject: 3 patients from one pedigree. Case 1: The full term child with GA of 42 weeks and vacuum – assisted delivery was admitted because the results of newborn screening showed high risk of hypothyroidism at 11 days of age. When admitted he presented with severe ketoacidosis diabetes mellitus and hypothyroidism. Laboratories showed pH of 6.95, blood glucose of 91.31 mmol/l, T3: 0.4 nmol/l, T4: 24.4 nmol/l, TSH: 764.2 mUI/ml. The patient had been treated the DKA condition and hypothyroidism but he died for severe infection after 4 days of treatment. Case 2: presented with asthma at 5 year, diabetes mellitus with the good blood glucose control at 8 years. From 9 years, he had hospitalization many times due to gastrointestinal heamorrhage and prolong pneumonia but he was unrespondent with tuberculosis protocol, Infliximab, Azathioprin combine corticosteroid. Case 3: presented with asthma at 5 years. From 6 years 10 months, had hospitalization many time due to recurrent gastrointestinal heamorrhage and prolong pneumonia. At 11 years 6 months, he has suffered diabetes and received insulin therapy. He has good blood glucose control, so the pneumonia and gastroenteritis condition did not respond with tuberculosis protocol, antibiotics and he required oxygen by mask at home. Genetic testing of three patients showed hemizygous for a novel FOXP3 missense mutation, p.Pro378Leu. The case 3 has been treated with corticosteroid and Tacrolimus. He

get better with good blood glucose control and does not oxygen requirement. Conclusion: Genetic analysis plays an important role in the diagnosis and management of IPEX syndrome

**Keyword:** IPEX syndrome, Neonatal diabetes mellitus

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng hiếm gặp có tên IPEX là hội chứng di truyền lặn liên kết nhiễm sắc thể giới tính X (NST X) bao gồm rối loạn điều hòa miễn dịch, tổn thương nhiều tuyến nội tiết, tổn thương ruột non với biểu hiện lâm sàng là bong da, ỉa chảy khó điều trị, teo lông mao ruột, thiếu máu tan máu, bệnh tuyến giáp tự miễn và đái tháo đường (ĐTĐ) sơ sinh. Nguyên nhân của hội chứng này là do đột biến gen FOXP3 mã hóa cho protein chuỗi nhánh. Gen FOXP3 có liên quan đến sự điều hòa chi phối các phản ứng miễn dịch đối với tự kháng nguyên [1].

Triệu chứng lâm sàng đa dạng, triệu chứng điển hình là biểu hiện của bệnh lý ruột như tiêu chảy nặng, phân nước, sinh thiết ruột cho thấy tổn thương dạng phòng rộp có thâm nhiễm tế bào lympho trong niêm mạc ruột [2]. Biểu hiện triệu chứng phổ biến tiếp theo là phát ban dạng viêm da cơ địa từ nhẹ đến nặng. Tổn thương nội tiết trong hội chứng IPEX hầu như chỉ giới hạn ở tuyến tụy và tuyến giáp. Đái tháo đường typ 1 trong hội chứng IPEX liên quan phản ứng viêm gây tổn thương tế bào tiểu đảo tụy, là hậu quả của sự thâm nhiễm lympho bào. Ngoài bệnh lý ruột, viêm da và rối loạn nội tiết có ở hầu hết bệnh nhân IPEX, một số tình trạng lâm sàng khác bao gồm thiếu máu, giảm tiểu cầu, bệnh hạch bạch huyết, viêm gan, bệnh thận và rụng tóc cũng có mặt ở nhiều mức độ khác nhau [1]. Bệnh hiếm gặp, được mô tả lần đầu tiên năm 1982 và cho

đến nay mới có 96 bệnh nhân từ 38 trung tâm trên thế giới đã được mô tả [3]. Để hiểu thêm về triệu chứng lâm sàng, diễn biến bệnh, tiên lượng cũng như kiểu gen của các bệnh nhân mắc hội chứng IPEX, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu:

1. *Mô tả đặc điểm kiểu gen và kiểu hình hội chứng IPEX*

2. *Đánh giá kết quả điều trị cho bệnh nhân mắc hội chứng IPEX*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**Đối tượng:** 3 bệnh nhân được chẩn đoán hội chứng IPEX tại Khoa Nội tiết - Chuyển hóa - Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương

**Phương pháp nghiên cứu:** nghiên cứu một loạt ca bệnh

Các thông tin lâm sàng được thu thập: tiền sử sản khoa, cân nặng lúc sinh, các triệu chứng lâm sàng, các xét nghiệm chẩn đoán tình trạng bệnh: đái tháo đường, viêm phổi, viêm dạ dày, ruột, suy giáp trạng: glucose máu, HbA1C, C-peptid, khí máu, xê tôn niệu, điện giải đồ, T3, FT4, TSH, CTM, CRP, Xquang phổi, Cây dịch tỵ hầu, PCR lao, nội soi dạ dày, tá tràng, sinh thiết dạ dày, tá tràng, nội soi đại trực tràng, các xét nghiệm miễn dịch

ADN của bệnh nhân được chiết tách theo quy trình chuẩn từ bạch cầu lympho máu ngoại vi, được phân tích gen tại Phòng xét nghiệm di truyền phân tử, Đại học Y, Đại học Exeter theo phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới cho panel gen gây đái tháo đường sơ sinh bao gồm KCNJ11, ABCC8, INS, INSR, EIF2AK3, FOXP3, GATA4, GATA6, GCK, GLIS3, HNF1B, IER3IP1, PDX1, PTF1A, NEUROD1, NEUROG3, RFX6, SLC2A2, SLC19A2, WFS1 và ZFP57.

Sau khi có kết quả phân tích gen của bệnh nhân, phát hiện đột biến gen FOXP3, mẹ và em gái của bệnh nhân được lấy máu tách ADN, mẫu ADN được phân tích gen FOXP3 theo phương pháp giải trình tự Sanger.

Bệnh nhân được điều trị hormone thay thế: insulin, levothyroxine, thuốc ức chế miễn dịch Tacrolimus và điều trị triệu chứng.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

**3.1. Ca bệnh 1:** Trẻ nam, con đầu, thai 42 tuần, đẻ forcep, cân nặng lúc sinh 2,4 kg, sau đẻ khóc to, không suy hô hấp, vàng da từ ngày thứ 3 sau đẻ, không phải chiếu đèn. Trẻ khám khi 11 ngày tuổi vì kết quả sàng lọc sơ sinh có nguy cơ cao suy giáp trạng bẩm sinh. Khi đến khám, bác sỹ đánh giá trẻ trong tình trạng nhiễm toan xê tôn nặng và được nhập viện điều trị. Trẻ nhập viện trong tình trạng: SPO<sub>2</sub> 100%, mạch 157 l/p, li bì, thở nhanh sâu 65 lần/phút, dấu hiệu mất nước nặng, thóp trũng, chõng khớp sọ, tim đều, phổi ran ẩm, bụng mềm không chướng, phân lỏng nhiều lần trong ngày, phân nhầy mũi, dịch dạ dày vàng. Các xét nghiệm: Glucose: 91,31 mmol/L; Khí máu: pH: 6,95; PCO<sub>2</sub>: 10 mmHg; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 1,5mmol/L; BE: -28,9mmol/L; Ure: 28,14 mmol/L; Creatinin: 179 µmol/l; Na<sup>+</sup> 163 mmol/L; K<sup>+</sup> 5,9mmol/L; Cl<sup>-</sup> 145 (mmol/L); AST 34,3 UI/L; ALT 17 UI/L; Bilirubin toàn phần: 274,4 µmol/L; Bilirubin trực tiếp: 18,17µmol/L; T3: 0,4 nmol/L; T4: 24,4 nmol/L; TSH: 764,2 mUI/mL; C-peptide 0,01 ng/mL; Insulin 60,47mUI/L; HbA1C 3,5%. BC 19,69G/L; Hb 96g/L; TC 148G/L; CRP 96,1 mmg/L; PT 34%. Bệnh nhân được điều trị toan xê tôn bằng truyền dịch, insulin truyền tĩnh mạch, điều trị suy giáp bằng levothyroxin, điều trị nhiễm khuẩn nặng bằng kháng sinh, sau 4 ngày điều trị tình

trạng nhiễm toan xê tôn có cải thiện, tuy nhiên trẻ tử vong do tình trạng nhiễm khuẩn nặng, tình trạng suy thận không cải thiện.

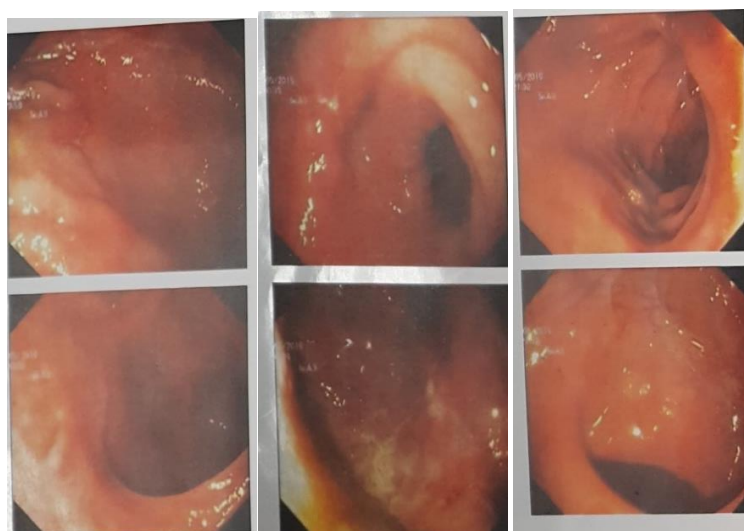
**3.2. Ca bệnh 2:** Trẻ con thứ 2, đẻ thường, đủ tháng, sau đẻ phát triển bình thường đến khi 5 tuổi. Xuất hiện bệnh từ khi 5 tuổi phải nhập viện nhiều đợt.

**Bảng 3.1. Diễn biến lâm sàng, xét nghiệm và điều trị của ca bệnh số 2**

| Tuổi               | Chẩn đoán                                              | Triệu chứng                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Điều trị                                                                                                                                                                           |
|--------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5                  | Hen phế quản                                           | Ho, thở rít tái diễn                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Dự phòng cắt cơn                                                                                                                                                                   |
| 8                  | Đái tháo đường                                         | Đái nhiều, uống nhiều, gầy.<br>Glucose huyết thanh 18 mmol/l;<br>HbA1C 9,6%                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Insulin (Actrapid Mixtard)                                                                                                                                                         |
| 9                  | Xuất huyết tiêu hóa, GERD, bất thường góc His<br>2 đợt | Nôn máu, phân đen<br>Nội soi: Viêm loét dạ dày, bất thường góc his                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Phẫu thuật Nissen,<br>Phẫu thuật cầm máu<br>Insulin                                                                                                                                |
| 10-14              | Viêm dạ dày mạn tính/Viêm phổi tái diễn 4 đợt          | Nôn, phân lỏng, đau bụng<br>Nội soi: viêm loét mạn tính dạ dày, cuối trực tràng<br>Xquang: Viêm phổi                                                                                                                                                                                                                                                               | Kháng sinh<br>Thuốc viêm dạ dày<br>Insulin                                                                                                                                         |
| 14 tuổi<br>3 tháng | Viêm đại trực tràng chảy máu/ viêm phổi/lao            | Ho, khó thở, phân máu, đau bụng<br>Ly <1,5 G/L; IgG 4,62g/L; IgA 1,16; IgM 2,1; Protein 49,5g/L; Alb 24g/L; FOB (+); PCR lao dịch dạ dày 3 lần (-)<br>Nội soi: viêm loét DD mạn, viêm loét ĐTT chảy máu<br>Sinh thiết: viêm ĐT nặng, loạn sản vừa, dị sản vảy, thâm nhiễm bạch cầu ái toan<br>PCR lao trong máu (-), PCR đờm có 1 lần (+) với lao, cấy đờm lao (-) | Kháng sinh<br>IVIG<br>Nexium<br>Pentasa<br>Infliximab<br>Azathioprin<br>Insulin<br>Truyền máu<br>Thuốc lao<br>Sau 4 tháng:ĐTĐ kiểm soát tốt, Đau bụng, Phân đen, viêm phổi ổn định |



**Hình 3.1. Tõn thương phổi  
khi 14 tuổi 3 tháng**



**Hình 3.2. Hình ảnh tổn thương dạ dày, đại  
trực tràng khi 14 tuổi 3 tháng**

**3.3. Ca bệnh 3:** Trẻ nam, con thứ 3, đẻ thường, đủ tháng, sau đẻ phát triển bình thường, hai chị gái khỏe mạnh. Xuất hiện bệnh từ khi 6 tuổi 10 tháng, nôn máu và đi ngoài phân đen phải nhập viện điều trị nhiều đợt

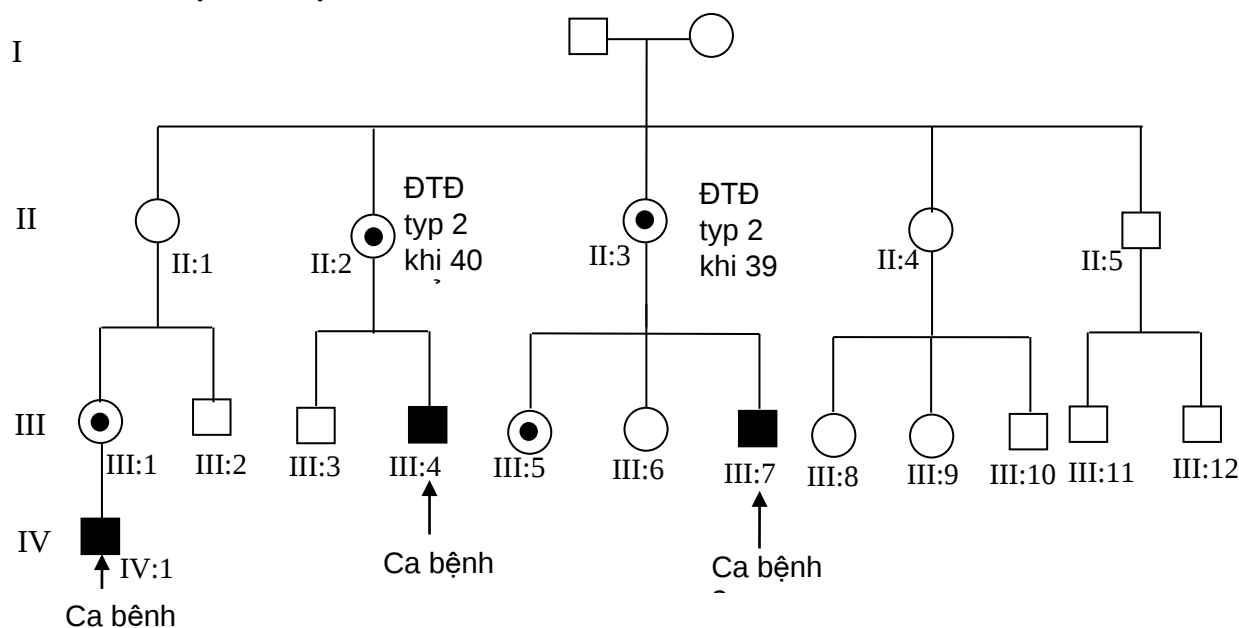
**Bảng 3.2. Diễn biến lâm sàng, xét nghiệm và điều trị của ca bệnh 3.**

| Tuổi            | Chẩn đoán                           | Triệu chứng                                                                                                                                                                                                         | Điều trị                                                       |
|-----------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 5 tuổi          | Hen phế quản                        | Ho, khò khè, thở rít                                                                                                                                                                                                | Điều trị dự phòng seretide,                                    |
| 6 tuổi 10 tháng | Viêm loét hành tá tràng             | Nôn máu, phân đen, đau bụng<br>BC 13,5 G/L; Neu 6,2 G/L; Ly 5,2 G/L; Hb 12 g/dL<br>Nội soi: Hành tá tràng biến dạng, mặt trước có ổ loét, đáy sâu, bờ xơ chai, đáy có giả mạc                                       | Losec 2mg/kg/ngày<br>tiêm TM<br>Xuất viện sau 4 ngày           |
| 6 tuổi 11 tháng | Viêm loét hành tá tràng             | Nôn máu, phân đen; BC 11,8 G/L; Neu 7,4 G/L; Ly 3,1 G/L; Hb 122 g/L<br>Nội soi: Hành tá tràng và D1 có một ổ loét lớn, bờ phù nề, đáy có giả mạc, đường kính 3 cm làm hẹp đường đi xuống tá tràng                   | Losec 2mg/kg/ngày<br>Ra viện sau 3 ngày                        |
| 11 tuổi 3 tháng | Xuất huyết tiêu hóa/<br>Viêm dạ dày | Nôn máu, phân đen, Đau bụng,<br>Nội soi: niêm mạc thực quản 1.2 dưới có các khía chạy dọc nối tiếp nhau, không giãn tĩnh mạch thực quản. toàn bộ niêm mạc dạ dày phù nề xung huyết sần,, niêm mạc thô, hang vị biến | Kháng sinh, truyền dịch, ức chế bơm proton<br>2 tuần xuất viện |

CHUYÊN ĐỀ SÀNG LỌC VÀ CHẨN ĐOÁN BỆNH DI TRUYỀN

|                          |                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                       |
|--------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                          |                                                 | <p>dạng, có một khối lồi lan tỏa từ bờ cong nhỏ đến môn vị, khối lồi nhô cao nhất 2,5 cm không đều, nhiều đám niêm mạc kèm theo các loét nông sâu dễ chảy máu.</p> <p>CTscanner: dày không đều thành dạ dày hang vị</p> <p>Sinh thiết: viêm dạ dày nặng, có trợt, tăng sinh Eosin. Tủy đồ bình thường</p> <p>BC: 7,6G/L; Neu 4,73; ly 1,46</p>                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                       |
| 11<br>tuổi<br>6<br>tháng | Đái tháo<br>đường                               | <p>Ăn nhiều, uống nhiều, đái nhiều</p> <p>HbA1c 9,3 %; glucose 9,2 mmol/L</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <p>Dự phòng hen</p> <p>Viêm dạ dày tăng</p> <p>BCAT; Insulin</p> <p>Ra viện sau 3 ngày</p>                                                                                                                            |
| 12<br>tuổi               | Viêm phế<br>quản phổi/Đái<br>tháo đường         | <p>Sốt cao liên tục, ho 2 ngày, đi ngoài phân lỏng, mệt, khó thở, ran ẩm hai phổi, SpO2 60-70%</p> <p>BC 5,7G/L; Neu 3,7G/L; Ly 1,0 G/L; Hb 7,6g/dL</p> <p>Alb 27,7 g/L; HbA1C 5,0%; HbA1 9,8%; HbA2 1,8%; IgA 1,85; IgG 8,09; IgM 3,02 g/j; IgE 878,2UI/mL; Anti-dsDNA (-), anti-ANA (-), Cây máu (-), cây dịch ty hầu(-); ELISA các loại KST(-), MODS lao dịch dạ dày(-) Widal thương hàn (-), Cây phân (-) PCR pneumocystic carinii (-), PCR Mycoplasma (-), PCR lao dịch dạ dày (-)</p> <p>Nội soi: viêm dạ dày, đại tràng bình thường</p> <p>Sinh thiết: viêm dạ dày mạn tính, tăng sinh bạch cầu ái toan</p> | <p>Thở oxy, kháng sinh,</p> <p>Chống nấm,</p> <p>Chống lao RHZE</p> <p>Sandostatin</p> <p>IVIG</p> <p>4 tháng xuất viện, thở oxy tại nhà</p>                                                                          |
| 12<br>tuổi<br>8<br>tháng | Viêm phổi kẽ/<br>Đái tháo<br>đường/Viêm<br>ruột | <p>Trẻ đang điều trị thở oxy tại nhà, sốt nhẹ, ho khạc đờm vàng, khó thở tăng, thở 45 l/p, đi ngoài phân nhầy, không có máu 6 lần/ngày</p> <p>BC 8,5 G/L; Hb 9,4 g/L; TC 302 G/L; Ure 2,9 mmol/L; glucose 3,9 mmol/L; creatinine 30,4 µmol/L; protein 32,6 g/L; albumin 15,6 g/L; Sắt 1,7 umol/L; GOT 14 UI/L; GPT 8,3 UI/L; IgA 0,88g/L; IgG 4,3 g/L; IgM 1,21 g/L; IgE 910 UI/mL</p> <p>Cấy dịch ty hầu (-)</p> <p>Xquang: viêm phế quản phổi</p>                                                                                                                                                                | <p>Kháng sinh,</p> <p>Insulin</p> <p>Dự phòng hen bằng seretide</p> <p>Tacrolimus</p> <p>Corticoid liều cao</p> <p>Sau điều trị 2 tuần, cai được oxy, giảm dần được liều corticoid, tổn thương phổi đỡ, xuất viện</p> |

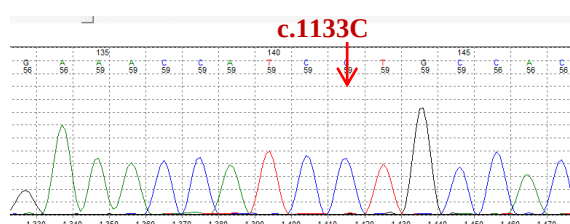
### 3.4. Phả hệ của 3 bệnh nhân



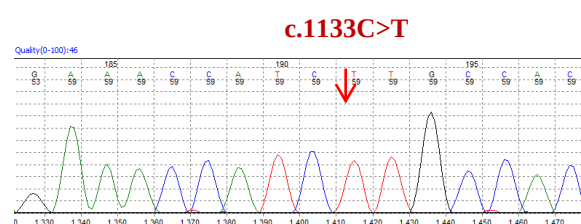
Hình 3.3. Phả hệ của ba bệnh nhân

### 3.5. Kết quả phân tích gen

Ba bệnh nhân được phân tích gen bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới theo panel gen gây đái tháo đường. Cả 3 bệnh nhân (III.4, III.5 và IV.1) đều có đột biến mới bán hợp tử missense p.Pro378Leu của gen FOXP3 trên nhiễm sắc thể X. Các thành viên III.1, II.2, II.3 trong gia hệ (hình 3.3) được làm xét nghiệm phân tích gen, cả ba người đều mang gen.



Người bình thường



Bệnh nhân

Hình 3.4. Hình ảnh đột biến gen của bệnh nhân

## IV. BÀN LUẬN

Hội chứng IPEX là một bệnh hiếm gặp lần đầu tiên được Powell và cs [4] mô tả lâm sàng năm 1982. Bệnh phổ biến gặp ở trẻ nhỏ, nhưng cũng có thể xuất hiện sớm trong tử

cung [5] hoặc muộn ở bất kỳ tuổi nào [4]. Trong ba bệnh nhân của chúng tôi, có một trường hợp xuất hiện sớm trong giai đoạn sơ sinh, hai trường hợp còn lại xuất hiện ở thời kỳ trẻ nhỏ. Mặc dù cả ba trường hợp đều có

kiểu gen giống nhau. Điều này có thể là do tính chất đa diện của các chức năng phân tử của FOXP3[1].

Mặc dù hội chứng IPEX hiếm gặp, bệnh cảnh lâm sàng đa dạng, tuy nhiên biểu hiện nhất quán hay gặp nhất là bệnh lý ruột [1]. Ba bệnh nhân của chúng tôi xuất hiện bệnh ở ba độ tuổi khác nhau, triệu chứng ban đầu cũng khác nhau, tuy nhiên cả ba bệnh nhân đều có biểu hiện bệnh lý ở ruột: bệnh nhân số 2 và bệnh nhân số 3 tổn thương ống tiêu hóa nặng, dai dẳng, khó điều trị, còn bệnh nhân 1 do tuổi còn nhỏ, tử vong sớm nên không đánh giá được. Trong nghiên cứu của Gambineri và cs [6] bệnh lý ruột là biểu hiện phổ biến chiếm 97% các trường hợp mắc hội chứng IPEX, biểu hiện là tiêu chảy phân nước, một số trường hợp phân có máu hoặc nhầy. Tiêu chảy xuất hiện sau đẻ vài tháng gặp ở hầu hết các bệnh nhân, tuổi trung bình xuất hiện tiêu chảy là 7,8 tháng và biểu hiện nặng ở hầu hết bệnh nhân. Trong 3 bệnh nhân của chúng tôi, 2 bệnh nhân có biểu hiện tổn thương ruột nặng với biểu hiện xuất huyết tiêu hóa, nôn ra máu và phân đen kéo dài, đáp ứng kém với điều trị. Tuy nhiên tuổi xuất hiện bệnh của bệnh nhân số 1 của chúng tôi sớm hơn rất nhiều so với nghiên cứu của Gambineri và cs [9], trong khi ca bệnh 2 và 3 lại xuất hiện muộn hơn. Trong một nghiên cứu khác của Barzaghi và cs [3] được tiến hành trên 96 bệnh nhân mắc hội chứng IPEX có đột biến gen FOXP3, tuổi trung bình xuất hiện bệnh là 2 tháng (giao động từ sơ sinh đến 11,3 tuổi), 41% xuất hiện trong tháng đầu sau đẻ, 46% từ 1 tháng đến 1 tuổi, 10% sau 1 tuổi và 3% không rõ thời điểm xuất hiện bệnh.

Về biểu hiện bệnh lý của tuyến nội tiết, cả ba bệnh nhân của chúng tôi đều có biểu hiện bệnh của tuyến tụy. Tuổi xuất hiện cũng

khác nhau giữa 3 bệnh nhân. Trong nghiên cứu của Gambineri và cs [9], tỷ lệ bệnh nhân có biểu hiện bệnh tuyến tụy chiếm 65% các trường hợp, tuổi chẩn đoán trung bình là 27 tháng. Trong nghiên cứu của Barzaghi và cs [3], biểu hiện phổ biến nhất gợi ý chẩn đoán IPEX là bộ ba bệnh lý: bệnh ruột non, đái tháo đường và eczema gặp ở 39/96 bệnh nhân và là đái tháo đường xuất hiện ở tuổi sơ sinh. Chỉ có 1/3 bệnh nhân của chúng tôi có biểu hiện bệnh của tuyến giáp là suy giáp trạng, bệnh nhân số 1 được phát hiện qua sàng lọc sơ sinh. Biểu hiện của tuyến giáp trong hội chứng IPEX được định nghĩa là có bất thường TSH, T3, hoặc T4 có hoặc không có biểu hiện triệu chứng [6]. Trong nghiên cứu của Gambineri và cs [6], tỷ lệ bệnh nhân có biểu hiện tuyến giáp là 26%, trong đó có một số nhỏ các bệnh nhân có kháng thể kháng tuyến giáp (anti-microsomal hoặc anti-thyroglobulin) nhưng không có triệu chứng.

Các biểu hiện khác như bất thường về huyết học như thiếu máu, giảm các dòng tế bào máu, giảm tiểu cầu gặp ở 42% bệnh nhân, bất thường về thận gặp ở 28% bệnh nhân, viêm gan tự miễn 20%, bệnh về phổi như hen, viêm phổi kẽ gặp ở 23%, bất thường về thần kinh 24% [6]. Tuy nhiên, trong 3 bệnh nhân của chúng tôi, cả ba bệnh nhân đều có tổn thương phổi nặng dai dẳng, kéo dài ngoại trừ bệnh nhân số 1 tử vong khi 14 ngày tuổi. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Gambineri và cs [6] 47% bệnh nhân có biểu hiện nhiễm trùng nặng trong đó có viêm phổi.

Điều đặc biệt đáng chú ý ở đây là cả 3 bệnh nhân đều có cùng đột biến gen, tuy nhiên biểu hiện lâm sàng, tuổi xuất hiện bệnh, diễn biến lâm sàng của ba bệnh nhân lại rất khác nhau: bệnh nhân số 1 xuất hiện

sớm ngay trong giai đoạn sơ sinh với biểu hiện suy giáp, tiêu chảy, nhiễm toan xê tôn, đái tháo đường nặng, bệnh nhân số 2 biểu hiện nổi trội là xuất huyết tiêu hóa kéo dài, không đáp ứng với thuốc ức chế miễn dịch, bệnh nhân số 3 nổi bật lên tình trạng viêm phổi kẽ nhưng lại đáp ứng tốt với thuốc ức chế miễn dịch. Điều này cho thấy mức độ biểu hiện bệnh của IPEX được điều chỉnh bởi các gen sửa đổi bệnh khác có thể ảnh hưởng đến chức năng của tế bào Treg. Sự thay đổi này cũng có thể là do sự khác biệt của thụ thể kháng nguyên của tế bào T (TCR) hoặc haplotype của phức hợp hòa hợp mô chủ yếu (MHC) giữa các bệnh nhân. Điều này được hỗ trợ bởi thực tế là phân tử MHC lớp III là một trong những yếu tố đóng góp di truyền chính cho tính nhạy cảm tự miễn [7]. Phơi nhiễm với các kháng nguyên hoặc nhiễm trùng khác nhau cũng có thể giải thích cho tác động lâm sàng khác biệt đối với bệnh nhân có đột biến tương tự.

## V. KẾT LUẬN

Cần nghĩ đến hội chứng IPEX khi bệnh nhân có các biểu hiện: Tổn thương đường tiêu hóa khó điều trị: tiêu chảy, xuất huyết tiêu hóa, đái tháo đường kèm theo có tiền sử gia đình. Phân tích gen có vai trò quan trọng trong chẩn đoán, điều trị và tư vấn di truyền hội chứng IPEX.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. d'Hennezel E., Bin Dhuban K., Torgerson T, et al. (2012). The immunogenetics of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet*, **49**(5), 291–302.
2. **Digestive histopathological presentation of IPEX syndrome.** ResearchGate, <[https://www.researchgate.net/publication/23284455\\_Digestive\\_histopathological\\_presentation\\_of\\_IPEX\\_syndrome](https://www.researchgate.net/publication/23284455_Digestive_histopathological_presentation_of_IPEX_syndrome)>, accessed: 13/04/2020.
3. **Barzaghi F., Hernandez L.C.A., Neven B, et al. (2018).** Long-term follow-up of IPEX syndrome patients after different therapeutic strategies: An international multicenter retrospective study. *J Allergy Clin Immunol*, **141**(3), 1036-1049.e5.
4. **Powell B.R., Buist N.R.M., Stenzel P. (1982).** An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr*, **100**(5), 731–737.
5. **Allenspach E.J., Finn L.S., Rendi M.H, et al. (2017).** Absence of functional fetal regulatory T cells in humans causes in utero organ-specific autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol*, **140**(2), 616-619.e7.
6. **Gambineri E., Ciullini Mannurita S., Hagin D, et al. (2018).** Clinical, Immunological, and Molecular Heterogeneity of 173 Patients With the Phenotype of Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked (IPEX) Syndrome. *Front Immunol*, **9**.
7. **Rioux J.D., Goyette P., Vyse T.J, et al. (2009).** Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(44), 18680–18685.

## Kiểu gen và kiểu hình của bệnh nhân đái tháo nhạt do thận

Nguyễn Thu Hà\*, Vũ Chí Dũng\*

### TÓM TẮT

Đái tháo nhạt (ĐTĐ) do thận là bệnh lý do thận không có khả năng cô đặc nước tiểu khi đáp ứng với hormone arginine vasopressin (AVP). Ở trẻ bị ĐTĐ do thận bẩm sinh, điều trị sẽ làm giảm số lượng nước tiểu và tránh tăng Natri máu và mất nước. Hầu hết các bệnh nhân ĐTĐ do thận bẩm sinh di truyền liên kết nhiễm sắc thể giới, và có đột biến ở gen AVPR2. **Mục tiêu:** Mô tả kiểu hình và kiểu gen của bệnh nhân ĐTĐ do thận. **Phương pháp:** nghiên cứu ca bệnh gồm mô tả triệu chứng lâm sàng, xét nghiệm sinh hoá và phân tích gen. **Kết quả:** Gia đình 1: bé trai 3 tuổi, từ 4 tháng tuổi trẻ thường quấy khóc, thích uống nước và tiểu đêm nhiều kèm sốt nhẹ. Trẻ được chẩn đoán ĐTĐ lúc 1,5 tuổi và điều trị bằng desmopressin nhưng không đáp ứng. Lúc 4 tuổi trẻ vào viện vì tăng Natri máu nghiêm trọng, tăng glucose máu, nhiễm khuẩn nặng và tử vong sau đó 1 tháng. Anh trai 11 tuổi, vào viện sau khi em trai tử vong. Trẻ được chẩn đoán ĐTĐ kèm chậm phát triển tinh thần - vận động. MRI sọ não có hình ảnh loạn dưỡng chất trắng. Điều trị bằng desmopressin không đáp ứng. Bệnh nhân được xác định có đột biến c.500C>T (p.Ser167Leu) ở gen AVPR2, có đáp ứng với thuốc Hydrochlorothiazide (2mg/kg/ngày). Gia đình 2: Trẻ 14 tháng, vào viện vì tiểu nhiều, uống nhiều vài tháng gần đây. Trẻ được chẩn đoán ĐTĐ và không đáp ứng với điều trị desmopressin. Bệnh nhân có đột biến c.244C>T (p.Cys82Arg) trên

gen AVPR2, và có đáp ứng với thuốc Hydrochlorothiazide. **Kết luận:** Kết quả phân tích phân tử cho phép chẩn đoán xác định bệnh, can thiệp điều trị, đem lại hiệu quả giảm số lượng nước tiểu ở bệnh nhân ĐTĐ do thận và tư vấn di truyền phòng bệnh.

**Từ khoá:** đái tháo nhạt do thận, gen AVPR2.

### SUMMARY

#### GENOTYPE AND PHENOTYPE OF PATIENTS WITH NEPHROGENIC DIABETES INSIPIDUS

Nephrogenic Diabetes Insipidus (NDI) is a distinct disorder caused by the nephrogenic failure to concentrate urine in response to the antidiuretic hormone arginine vasopressin (AVP). In infants with hereditary NDI, the aim of treatment is to minimize the polyuria and avoiding hypernatremia and volume depletion. Most cases of hereditary NDI are inherited as X-linked recessive disorders. Almost cases of hereditary NDI with mutations in the AVPR2 gene. **Objectives:** to describe the phenotype and genotype of patients with NDI. **Methods:** this is case series study including clinical symptom descriptions, whole exome sequencing of patients from two unrelated families with NDI. **Results:** Family 1: the younger brother was 3 years old. From 4 months old, he was constantly irritable, thirsty, micturition, mild fever. From 1 year old he was polydisa and polyuria. When he was 1,5 year old, he was admitted to our hospital cause of pneumonia. During this period, he was diagnosed with diabetes insipidus, but unresponded to desmopressin. When he was 4 years old, he was admitted again cause of severe hypernatremia, very high blood glucose, severe sepsis. He died 1 month later. The elder brother was admitted to

\*Bệnh viện Nhi Trung Ương

Chịu trách nhiệm chính: Vũ Chí Dũng

Email: dungvu@nch.org.vn

Ngày nhận bài: 1.10.2020

Ngày phản biện khoa học: 11.10.2020

Ngày duyệt bài: 19.11.2020

our hospital after his brother died. He had polyuria and polydipsia for along time after birth. He was diagnosed with diabetes insipidus and retard mental - motor development. He has leukodystrophy in MRI brain. He had unresponded with desmopressin. A pathogenic variant c.500C>T (p.Ser167Leu) was identified in AVPR2 gene and good respond with hydrochlorothiazide 2mg/kg per day. Family 2: Male patient 14 months old admitted to our hospital cause of polyuria and polydipsia for several months ago. He was diagnosed with diabetes insipidus but unresponded with desmopressin. A variant c.244C>T (p.Cys82Arg) was identified in AVPR2 gene and good respond with hydrochlorothiazide 2mg/kg per day. **Conclusions:** This case report illustrates the clinical and laboratory characterization of NDI and the importance of genetic testing for the undiagnosed disease.

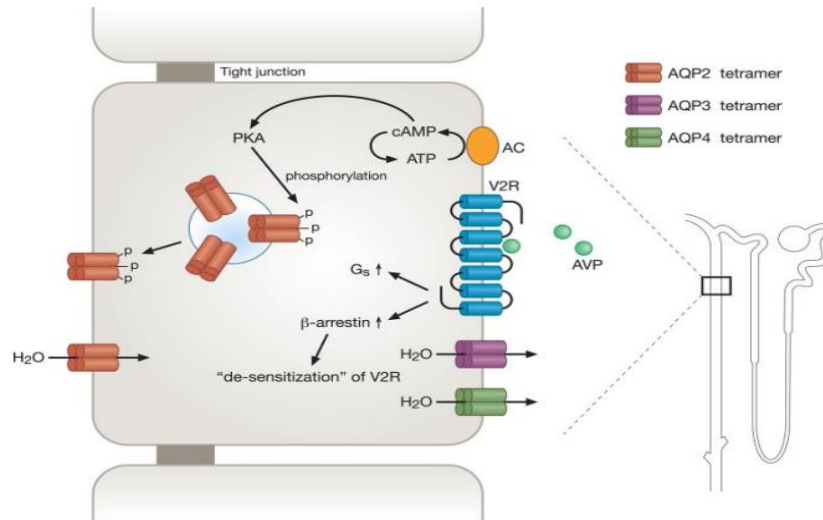
**Keywords:** nephrogenic diabetes insipidus, AVPR2 gene.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đái tháo nhạt là tình trạng tiểu nhiều - uống nhiều và đặc trưng bởi tình trạng tiểu nhiều nhược trương (thể tích nước tiểu > 3ml/kg/h) và uống nhiều (lượng nước uống thường > 3l/ngày). Sau khi loại trừ một số hội chứng liên quan đến lợi niệu thẩm thấu (đái tháo đường), cần phải chẩn đoán phân biệt giữa đái nhiều nguyên phát (ĐTĐ trung ương, ĐTĐ do thận) và đái nhiều thứ phát (hậu quả của cường uống). Tần suất mắc ĐTĐ xấp xỉ 1/25000 - 30000. ĐTĐ trung ương là do sự bài tiết không đầy đủ của arginine vasopressin (AVP) ở vùng dưới đồi tuyến yên trong đáp ứng với các kích thích do áp lực thẩm thấu. Đái nhạt trung ương thường là bệnh lý mắc phải do tổn thương của vùng não liên quan đến các tế bào thần kinh sản xuất AVP, trong khi đái nhạt trung ương bẩm sinh ít gặp hơn và thường do đột

biến gen AVP (nằm trên cánh ngắn của nhiễm sắc thể số 20). ĐTĐ do thận là do đáp ứng không đầy đủ của thận với AVP, có thể do đột biến của receptor AVP típ 2 (gen AVPR2) hoặc aquaporin 2 (gen AQP2) hoặc do tác dụng phụ của một vài loại thuốc, thường gặp là lithium, hay do các rối loạn điện giải như tăng calci máu hoặc hạ kali máu. Các bệnh lý ĐTĐ do di truyền chiếm khoảng 10% các bệnh lý ĐTĐ nói chung [1].

Tác dụng giữ nước của AVP chủ yếu qua trung gian của AVP với thụ thể vasopressin loại 2 (AVPR2), một loại thụ thể kết hợp protein G nằm ở bên màng đáy của tế bào chính ống thận. AVP gắn với AVPR2 làm kích hoạt thụ thể và sự tương tác của AVPR2 với G cytosolic, GαS tương bào làm kích hoạt lần lượt cyclase adenylate. Điều này dẫn đến tăng nồng độ cAMP và dẫn đến một loạt các phản ứng nội bào, trong số có sự hoạt hóa protein kinase A (PKA) và sự di chuyển của các túi vận chuyển chứa AQP2 từ các khoang nội bào đến bề mặt đỉnh của các tế bào chính. Tại đỉnh của màng plasma, AQP2 tồn tại chức năng dưới dạng homotetramers và là vị trí giới hạn tốc độ vào cho sự tái hấp thu nước theo gradient thẩm thấu. Gradient thẩm thấu là do sự tái hấp thu chất hoà tan ở nhánh lên dày ở vùng tuỷ thận, một quá trình cũng được điều hoà bởi AVP. Nước đi vào tế bào chính qua AQP2 và đi ra thông qua AQP3 và AQP4 ở màng đáy phía trong màng plasma. Khi nước cân bằng, nồng độ AVP huyết tương giảm và nồng độ AQP2 trên đỉnh màng huyết tương giảm (hình 1.1). Ở người, sự hiện diện của AVP có thể làm tăng áp lực thẩm thấu nước tiểu đến khoảng 1200 mOsmol/kg và giảm tốc độ bài niệu đến 0,5 ml/phút. Ngược lại, trong trường hợp không có AVP, độ thẩm thấu nước tiểu có thể là 50 mOsmol/kg và tốc độ bài niệu lên đến 20 ml/phút [2].



**Hình 1.1. Minh họa về vận chuyển nước của AQP2 qua trung gian AVP trên tế bào chính của ống góp thận [3].**

Gen AVPR2 mã hoá cho receptor AVPR2, lần đầu tiên được xác định vị trí vào năm 1992 [4]. Khoảng 90% bệnh nhân ĐTN do thận di truyền mang đột biến trên gen AVPR2. Gen này nằm trên nhiễm sắc thể giới tính X, ở vị trí Xq28. Gen AQP2 lần đầu tiên được xác định vị trí vào năm 1993, và vào năm 1994 đã tìm được đột biến trên gen AQP2 ở ca bệnh ĐTN thận di truyền lặn nhiễm sắc thể thường. Gen AQP2 nằm trên nhiễm sắc thể số 12, vị trí 12q12-q13 [2].

Đa niệu ở trẻ em được định nghĩa là thể tích nước tiểu > 150ml/kg/ngày ở trẻ sơ sinh, >100ml/kg/ngày ở trẻ dưới 2 tuổi, và > 50ml/kg/ngày ở trẻ lớn [3]. Những biểu hiện đầu tiên của bệnh có thể xuất hiện trong những tuần đầu tiên sau đẻ. Trẻ có các triệu chứng không đặc hiệu như tiểu nhiều, sốt không thể giải thích bằng nguyên nhân thông thường, nôn, ăn kém, chậm lớn. Khi trẻ lớn hơn triệu chứng uống nhiều trở nên rõ ràng hơn. Các xét nghiệm thấy Natri máu có thể tăng (thường gặp ở trẻ bú mẹ hoặc trẻ nhỏ) hoặc bình thường (thường gặp ở trẻ lớn), áp lực thẩm thấu máu tăng, nước tiểu loãng, áp

lực thẩm thấu niệu giảm. Nếu không được phát hiện sớm và điều trị, ĐTN do thận bẩm sinh ở trẻ có thể vào viện trong các đợt mất nước tăng áp lực thẩm thấu, hoặc có các biến chứng nặng như phù não và co giật. Sử dụng Hypothiazid đem lại nhiều hiệu quả trong điều trị [1].

Để giúp các bác sỹ trong thực hành lâm sàng chẩn đoán và điều trị cho bệnh nhân đái nhạt, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu: mô tả kiểu hình và kiểu gen của bệnh nhân đái nhạt do thận.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu gồm 3 bệnh nhân trong hai gia đình riêng rẽ mắc đái nhạt dựa trên các tiêu chuẩn tốc độ bài niệu  $\geq 4$  ml/kg/giờ, tăng áp lực thẩm thấu máu, giảm áp lực thẩm thấu niệu, tỷ trọng niệu thấp, tăng natri máu và không đáp ứng với điều trị bằng arginine vasopressin.

Nghiên cứu được tiến hành tại khoa Nội tiết – Chuyển hóa – Di truyền, bệnh viện Nhi Trung ương.

Nghiên cứu một loạt ca bệnh bao gồm khai thác phả hệ di truyền, tiền sử, bệnh sử, thăm khám lâm sàng toàn diện, theo dõi bài niệu đáp ứng với điều trị. Các xét nghiệm hóa sinh bao gồm: điện giải đồ máu, urea, creatinin, áp lực thẩm thấu máu, áp lực thẩm thấu niệu, protein, tế bào niệu, điện giải đồ niệu. DNA được chiết tách từ máu ngoại vi và được giải trình tự toàn bộ vùng gen biểu hiện.

### III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

2 gia đình bệnh nhân đái tháo nhạt do thận được chẩn đoán xác định dựa các biểu hiện lâm sàng, xét nghiệm sinh hoá và trên phân tích đột biến của gen AVPR2. Biểu hiện lâm sàng và sinh hoá được mô tả trong bảng 3.1.

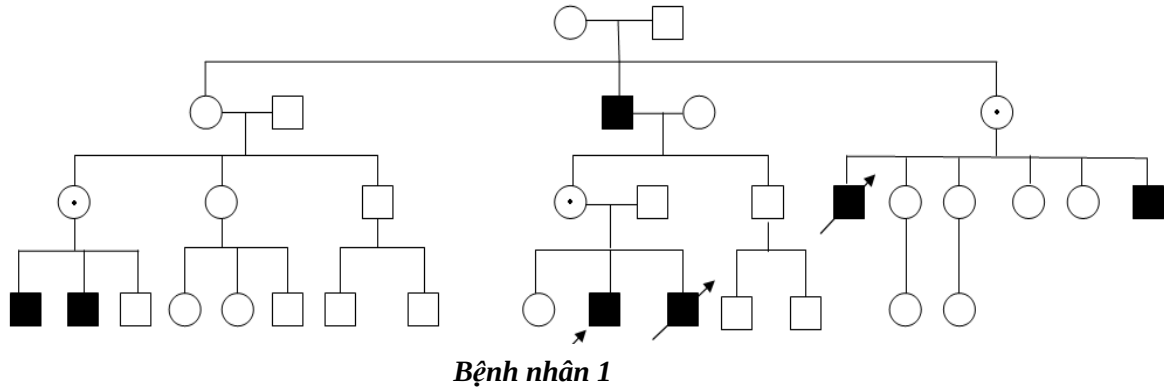
**Gia đình 1:** Bệnh nhân nam 11 tuổi 4 tháng, vào viện vì tiểu nhiều và uống nhiều. Bệnh diễn biến từ lúc trẻ 4 tháng tuổi. Bệnh nhân là con thứ 1, đẻ thường, đủ tháng, cân nặng lúc sinh 3,4 kg. Từ tháng thứ 4 đến lúc 1,5 tuổi trẻ hoàn toàn không tăng cân. Lúc 1,5 tuổi trẻ được 5,4kg ( $P < -3 SD$ ). Ngoài ra trẻ xuất hiện nôn nhiều, nôn sau ăn, thường xuất hiện tình trạng tăng thân nhiệt, nhiệt độ 38 - 38,5 độ, quấy khóc nhiều. Tuy nhiên không phát hiện căn nguyên gây nôn và tình trạng nhiễm trùng. Trẻ được chẩn đoán suy dinh dưỡng nặng, điều trị tại khoa dinh dưỡng bằng thay đổi chế độ ăn. Sau đó trẻ tăng cân trở lại. Trẻ biết đi và biết nói từ lúc 3 tuổi. Từ khi biết đi, trẻ thường xuyên đi tìm nước để uống, khát nhiều, trẻ trở nên kích thích khi không được uống nước, và tiểu đêm nhiều. Từ khi trẻ uống nước đầy đủ, tình trạng tăng thân nhiệt được cải thiện. Trung bình một ngày trẻ uống khoảng 8 - 10 lít nước, tiểu cũng từ 8 - 10 lít/ngày. Từ cách đây 2 năm trẻ xuất hiện tình trạng tăng

cân nhanh.

Tại thời điểm vào viện, trẻ không sốt. Tiểu nhiều 12 lít/24 giờ (10,6ml/kg/h), uống nhiều 13 lít/24 giờ, không có dấu hiệu mất nước. Trẻ có tình trạng béo phì, nặng 49 kg, cao 128,5cm, BMI: 28,6kg/m<sup>2</sup> (>95 percentile). Trẻ chậm phát triển tinh thần mức độ trung bình (IQ: 90). Các xét nghiệm được tóm tắt trong bảng 3.1. Bệnh nhân được điều trị bằng desmopressin (Minirin) nhưng không có đáp ứng, sau đó kết hợp với Hydrochlorothiazide (2mg/kg/ngày) thì số lượng nước tiểu giảm (5 - 6ml/kg/h). Bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới, đã xác định được bệnh nhân mang đột biến c.500C>T (p.Ser167Leu) trên gen AVPR2.

Em trai của bệnh nhân vào viện lúc 3 tuổi. Bệnh diễn biến từ sau đẻ, mẹ bệnh nhân nhận thấy trẻ thường xuyên quấy khóc, chậm tăng cân, trẻ bú tốt nhưng hay nôn. Đến khoảng 4 tháng tuổi, mẹ trẻ nhận thấy trẻ thích uống nước và tiểu nhiều (mỗi ngày thay 8 - 10 bỉm). Trẻ thường xuyên trong tình trạng sốt nhẹ (37 - 38 độ). Khi trẻ biết đi, trẻ tự tìm nước để uống, tình trạng sốt cải thiện đáng kể. Lúc 1,5 tuổi trẻ nhập viện vì viêm phổi. Trong đợt nằm viện này, trẻ được chẩn đoán ĐTN với biểu hiện tiểu nhiều (> 7ml/kg/h), tăng Natri máu (Natri máu từ 169 - 177mmol/l), áp lực thẩm thấu thấp (< 100 mOsm/kg). Bệnh nhân được điều trị bằng desmopressin (Minirin) nhưng không đáp ứng. Lúc 3 tuổi bệnh nhân nhập viện lần 2 vì sốt cao, li bì. Các xét nghiệm cho thấy tăng Natri nặng (189 - 192mmol/l), đường máu cao (>20 mmol/l), nhiễm trùng nặng. Bệnh nhân tử vong sau 1 tháng điều trị.

Khai thác tiền sử gia đình, phát hiện trong gia đình bệnh nhân có nhiều người có biểu hiện tương tự (hình 1).



**Hình 1. Phả hệ gia đình 1**

**Gia đình 2:** Bệnh nhân nam, 14 tháng tuổi, vào viện vì lí do tiểu nhiều và uống nước nhiều. Trẻ là con thứ 1, cân nặng lúc sinh 3,2kg, tiền sử sản khoa bình thường. Mẹ trẻ nhận thấy con có biểu hiện tiểu nhiều trong thời gian khoảng 1 tháng trước vào viện. Trẻ thích uống nước hơn và thường xuyên đòi uống nước. Trẻ phát triển thể chất bình thường (cân nặng: 17% percentile; chiều cao: 35% percentile). Trẻ phát triển tinh thần - vận động bình thường: đang tập đi, và bập bẹ nói. Lúc vào viện trẻ không có tình trạng mất nước, thiếu máu nhẹ, tiểu nhiều (>10ml/kg/h) và uống nhiều (>2 l/24h). Các xét nghiệm chẩn đoán được nêu

ở bảng 3.1. Bệnh nhân được chẩn đoán ĐTN, và được điều trị ban đầu bằng Minirin. Ban đầu số lượng nước tiểu có giảm ít (8 - 9ml/kg/h), sau đó tiểu nhiều trở lại. Bệnh nhân được kết hợp thuốc Hydrochlorothiazide (2mg/kg/ngày) thì số lượng nước tiểu giảm rõ (4 - 5ml/kg/h). Bằng kĩ thuật giải trình tự gen thế hệ mới, đã xác định được bệnh nhân mang đột biến c.244C>T (p.Cys82Arg) trên gen AVPR2. Tuy nhiên đây là một đột biến chưa được công bố trước đó, do vậy cần có những nghiên cứu đánh giá chức năng receptor để khẳng định tính chất gây bệnh của đột biến.

**Bảng 1. Triệu chứng lúc vào viện và các xét nghiệm của các bệnh nhân**

| TT | Tuổi chẩn đoán | Triệu chứng vào viện                | Na/K/Cl     | Áp lực thẩm thấu máu | Áp lực thẩm thấu niệu | MRI sọ não                |
|----|----------------|-------------------------------------|-------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|
| 1  | 11 tuổi        | Tiểu nhiều<br>Uống nhiều            | 144/3,7/107 | 285                  | 59                    | Loạn dưỡng não chất trắng |
| 2  | 3 tuổi         | Sốt cao<br>Tiểu nhiều<br>Uống nhiều | 182/4,2/144 | 411                  | 329                   | Chậm Myelin hoá           |
| 3  | 14 tháng       | Tiểu nhiều<br>Uống nhiều            | 138/4,0/106 | 280                  | 57                    | Bình thường               |

#### IV. BÀN LUẬN

Cho đến nay có 277 đột biến gây bệnh đã được xác định trên gen AVPR2. Trong đó chủ yếu là các đột biến điểm (169/277) và mất đoạn nhỏ (52/277), ngoài ra còn có các đột biến mất đoạn lớn (23/277), đột biến thêm đoạn nhỏ (19/277) và các loại đột biến khác [4]. Trong báo cáo của chúng tôi, có hai đột biến, trong đó đột biến sai nghĩa c.500C>T (p.Ser167Leu) trên gen AVPR2 đã được công bố năm 1944 [5], đây là đột biến nằm trên exon 2, làm thay đổi acid amin Serin thành acid amin Leucin ở vị trí bộ ba 167 của protein AVPR2. Đây là đột biến có ảnh hưởng đến chức năng protein và đã được xác định tính chất gây bệnh [4]. Đột biến thứ 2 là đột biến sai nghĩa c.244C>T (p.Cys82Arg) trên gen AVPR2, tuy nhiên đột biến này chưa từng được công bố trước đây trên những bệnh nhân ĐTN do thận (ClinVar and HGMD), và cũng không gặp trong dữ liệu di truyền của quần thể (gnomAD). Trong 2 gia đình bệnh nhân trong báo cáo, những người nữ mang gen đều không có triệu chứng tiểu nhiều và uống nhiều.

Khoảng 90% bệnh nhân ĐTN do thận di truyền mang đột biến trên gen AVPR2. Bệnh được di truyền theo qui luật liên kết nhiễm sắc thể giới, do đó hầu hết bệnh nhân là nam. Bệnh nhân nữ ĐTN do thận mang đột biến trên gen AVPR2 đã được mô tả trong y văn, tuy nhiên triệu chứng rất thay đổi. Điều thú vị là hầu hết những đột biến này là đột biến sai nghĩa và khi đánh giá in vitro, có vẻ các receptor bị sai lệch cấu trúc không gian, do đó bị giữ lại và giáng hoá ở mạng lưới nội chất. Khoảng 10% các ca ĐTN thận là do đột biến gây mất chức năng trên gen AQP2. Những đột biến này thường di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, tuy nhiên một số ít các

trường hợp đã được mô tả là bệnh lý di truyền trội.

Hầu hết các bệnh nhân ĐTN do thận bẩm sinh đều có tình trạng chậm tăng cân xuất hiện từ vài tháng sau đẻ, trong khi ĐTN do thận mắc phải thường xuất hiện muộn với các triệu chứng đái nhiều và / hoặc uống nhiều. Trẻ thường có tình trạng mất nước tăng Natri máu, cùng với các triệu chứng kích thích, ăn bú kém, chậm tăng cân. Trên lâm sàng có các triệu chứng của mất nước, hoặc sốt cao không liên tục, có thể có co giật [6]. Ở những trường hợp ĐTN do thận một phần, bệnh nhân vẫn còn khả năng cô đặc nước tiểu nên làm giảm nguy cơ mất nước nặng. Nếu không được điều trị, hầu hết các bệnh nhân đều không phát triển bình thường, nhưng khi được điều trị thì trẻ nhanh chóng hồi phục lại cân nặng ban đầu [6]. Khi vấn đề chẩn đoán và điều trị bị chậm, bệnh nhân không được bù đầy đủ nước dẫn đến mất nước tăng Natri máu dẫn đến não bị tổn thương và chậm phát triển tâm thần [7]. Một số bệnh nhân có thể có calci hoá trong nhu mô não. Calci hoá này có thể là hậu quả của sự hoại tử các tế bào nội mô khi não bị mất nước nặng và có thể có sự liên quan giữa tổn thương não trên chẩn đoán hình ảnh với tình trạng tăng áp lực thẩm thấu tăng Natri tái diễn. Tâm lý của trẻ có thể bị ảnh hưởng khi tác động của việc thường xuyên uống nước và đi tiểu, có thể bị chẩn đoán là tăng động giảm chú ý.

Các biện pháp điều trị ĐTN do thận bẩm sinh chủ yếu tập trung vào điều trị triệu chứng thay vì chữa khỏi bệnh. Với tình trạng mất nước tăng Natri máu ở bệnh nhân ĐTN do thận, việc điều trị cấp cứu có khác biệt so với các tình trạng tăng Natri máu do các nguyên nhân khác. Do sự mất nước qua nước tiểu, việc truyền NaCl 0,9% có thể làm nặng

lên tình trạng tăng Natri máu, bệnh nhân ĐTN do thận cần được điều trị bằng dung dịch đẳng trương, ưu tiên đường uống [2]. Từ năm 1965, một nghiên cứu đã sử dụng hydrochlorothiazide để điều trị cho bệnh nhân ĐTN do thận và sau 3 ngày điều trị thấy lượng nước tiểu đã giảm khoảng 50% so với bình thường. Một số cơ chế tác dụng của thuốc đã được chứng minh. Tăng áp lực thẩm thấu niệu qua trung gian giảm tái hấp thu muối (cotransporter SLC12A3) ở ống lượn xa và quá trình giảm Natri dẫn đến giảm thể tích huyết tương làm tăng tái hấp thu nước ống lượn gần, do đó ít nước đến ống góp và mất qua nước tiểu. Một nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng giảm thể tích nước tiểu có thể không cùng với tăng áp lực thẩm thấu niệu là do hydrochlorothiazide làm ức chế carbonic anhydrase ở ống lượn gần, dẫn đến giảm hấp thu muối ở đây và thông qua phản ứng tubuloglomerular để giảm mức lọc cầu thận [8]. Tuy nhiên khi điều trị bằng hydrochlorothiazide có thể gây hạ Kali, do vậy cần phải kiểm soát điện giải đồ và bổ sung Kali khi cần thiết.

## V. KẾT LUẬN

Hai gia đình riêng rẽ được chẩn đoán ĐTN do thận dựa trên biểu hiện lâm sàng, xét nghiệm sinh hoá. Phân tích phân tử tìm nguyên nhân ĐTN do thận bẩm sinh được tiến hành trên bệnh nhân Việt Nam, từ đây sẽ tạo điều kiện cho việc chẩn đoán xác định, can thiệp điều trị và tư vấn di truyền.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Moeller H.B., Rittig S., Fenton R.A. (2013).** Nephrogenic diabetes insipidus: essential insights into the molecular background and potential therapies for treatment. *Endocr Rev.* 34(2):278-301.
2. **Bockenhauer D., Bichet D.G. (2015).** Pathophysiology, diagnosis and management of nephrogenic diabetes insipidus. *Nat Rev Nephrol.* 11(10):576-88.
3. **Di Iorgi N., Napoli F., Allegri A.E. et al (2012).** Diabetes insipidus--diagnosis and management. *Horm Res Paediatr.* 77(2):69-84.
4. **The Human Genome Mutation Database (2019).** <http://www.hgmd.cf.ac.uk/> [Internet].
5. **Wildin R.S., Antush M.J., Bennett R.L. et al (1994).** Heterogeneous AVPR2 gene mutations in congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Hum Genet.* 55(2):266-77.
6. **Wesche D., Deen P.M., Knoers N.V. (2012).** Congenital nephrogenic diabetes insipidus: the current state of affairs. *Pediatr Nephrol.* 27(12):2183-204.
7. **Bichet D.G. (2006).** Nephrogenic diabetes insipidus. *Adv Chronic Kidney Dis.* 13(2):96-104.
8. **Sinke A.P., Kortenoeven M.L., de Groot T. et al (2014).** Hydrochlorothiazide attenuates lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus independently of the sodium-chloride cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol.* 306(5):F525-33.

## UNG THƯ - ĐIỀU TRỊ NHẪM ĐÍCH VÀ CÁC XÉT NGHIỆM DẪN ĐƯỜNG CANCER - TARGETED THERAPIES AND BIOMARKER TESTS

Phạm Hùng Vân\*

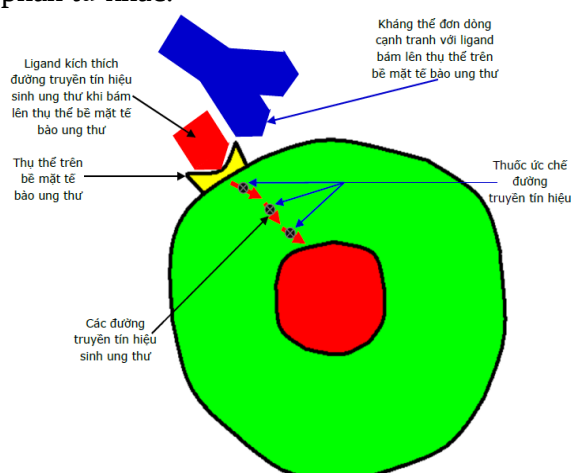
Hiện nay với sự hiểu biết ngày càng nhiều hơn về cơ chế sinh ung thư của nhiều ung thư khác nhau, y học đã phát triển nhiều liệu pháp nhắm đích phân tử mang đến nhiều hy vọng cho bệnh nhân ung thư vì có nhiều ung thư có thể được chữa lành hẳn, hay kéo dài thời gian và chất lượng sống của bệnh nhân, hoặc giúp bệnh nhân nếu phải chịu liệu pháp phẫu thuật thì sẽ là liệu pháp phẫu thuật bảo tồn hơn, hay nếu kết hợp với hoá trị thì sẽ nhẹ nhàng hơn.

### LIỆU PHÁP NHẪM ĐÍCH PHÂN TỬ

Liệu pháp nhắm đích phân tử là liệu pháp sử dụng các thuốc ức chế đường truyền tín hiệu sinh ung thư bên trong tế bào ung thư và các thuốc này được bào chế dưới dạng các phân tử nhỏ (micro-molecule có kích thước nano để vào tế bào dễ dàng), hay là các kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho các thụ thể hiện diện trên bề mặt tế bào ung thư (bị quá biểu hiện hay bị kích thích bởi các phối tử hay còn gọi là ligand) để ức chế sự kích thích của các thụ thể này.

Tuy nhiên liệu pháp nhắm đích phân tử là một liệu pháp cá nhân hóa, có nghĩa là có thể cá nhân này đáp ứng rất tốt với liệu pháp

nhắm đích phân tử này nhưng với một cá nhân khác thì lại cần liệu pháp nhắm đích phân tử khác.



**Hình 1: Cơ chế sinh ung thư và các liệu pháp nhắm đích phân tử.**

Chính vì vậy rất cần phải có xét nghiệm phát hiện đích phân tử nào hiệu quả cho liệu pháp nào, xét nghiệm này được gọi là xét nghiệm dẫn đường. Cơ sở cho các xét nghiệm dẫn đường là (1) xét nghiệm phát hiện các đa hình đơn nucleotide (SNP = Single Nucleotide Polymorphism) tức là các khác biệt nucleotide trên các gen có liên quan đến sinh ung thư để xác định có các SNP giúp cho liệu pháp nhắm đích phân tử hiệu quả hay không, hay là (2) xét nghiệm phát hiện sự quá biểu hiện của các thụ thể nằm trên bề mặt tế bào sinh ung thư của bệnh nhân có lợi hay không cho liệu pháp nhắm đích. Các kỹ thuật được áp dụng để phát hiện SNP là real-time PCR hay giải trình tự (sequencing), còn các kỹ thuật để phát hiện sự quá biểu hiện các thụ thể là hóa mô miễn

\*Trường Đại học Phan Châu Trinh

Chịu trách nhiệm chính: Phạm Hùng Vân

Email: van.pham@pctu.edu.vn

Ngày nhận bài: 8.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 30.10.2020

Ngày duyệt bài: 20.11.2020

dịch (IHC=Immuno Histo Chemistry), real-time PCR định lượng gen, hay lai tại chỗ huỳnh quang (FISH=Fluorescent In Situ Hybridization). Xin dẫn ra đây một ung thư mà hiện nay đã có rất nhiều các liệu pháp điều trị nhắm đích phân tử và các xét nghiệm dẫn đường để hướng dẫn cách lựa chọn liệu pháp nhắm đích phù hợp, đó là ung thư phổi không tế bào nhỏ, gọi là Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC). Hiện nay đã có nhiều thuốc điều trị đích phân tử được FDA chấp nhận dùng làm thuốc hàng đầu (first line) để điều trị NSCLC. Việc chọn lựa thuốc nào là phụ thuộc vào kết quả xét nghiệm dẫn đường trong đó có xét nghiệm phát hiện các đột biến dẫn đường là các đột biến mà một thuốc điều trị đích phân tử nào đó có hiệu quả. Thuốc điều trị đích phân tử dành cho NSCLC gồm:

#### **Thuốc nhắm đích EGFR**

1. Thuốc ức chế tyrosine kinase: Tyrosine kinase là một enzyme trong chuỗi tín hiệu của tế bào ung thư giúp nó tăng sinh và phát triển. Tyrosine kinase sẽ biểu hiện một khi thụ thể EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) trên bề mặt tế bào bị kích hoạt khiến cho hai phân tử bề mặt bị kết hợp lại. Thuốc ức chế tyrosine kinase (TK) được gọi là thuốc TKI (tyrosine kinase inhibitor) được bào chế dưới dạng các phân tử nhỏ có khả năng đi trực tiếp vào tế bào và một khi gắn lên TK thì sẽ làm cho tế bào ung thư không tăng trưởng, không phân chia được và đi vào chu trình tự hủy (apoptosis) [1]. Tuy nhiên thuốc TKI chỉ có tác dụng nếu gen EGFR có các đột biến dẫn đường, quan trọng nhất là hai đột biến L858R ở exon 21 và các đột biến deletion (mất đoạn) ở exon 19. Cho đến nay đã có 3 thế hệ TKI được phát triển. Thế hệ 1 là erlotinib, gefitinib và lapatinib. Tuy nhiên sau một thời gian sử dụng thì các TKI

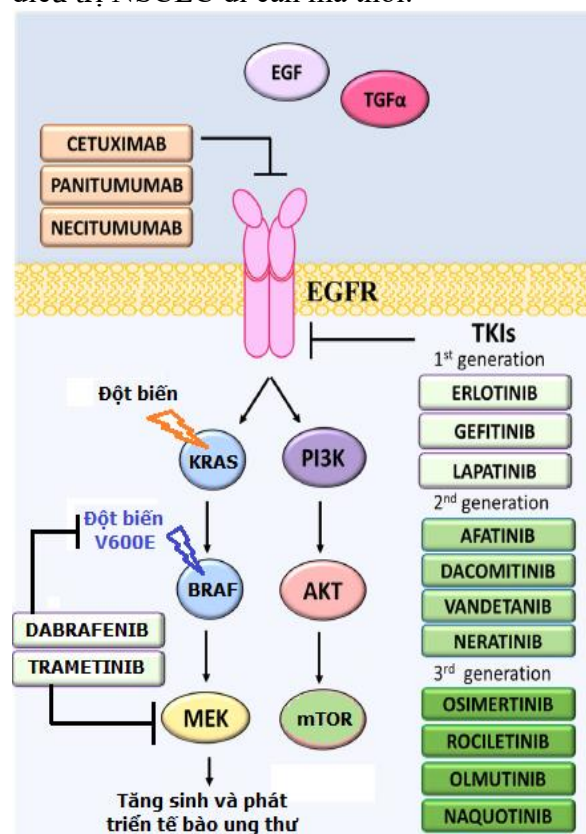
thế hệ 1 này sẽ bị đề kháng do xuất hiện đột biến T790M trên exon 20 của gen EGFR [2]. Để vượt qua đề kháng này, TKI thế hệ 2 được phát triển, đó là afatinib, dacomitinib, vandetanib và neratinib; Sau đó TKI thế hệ 3 là osimertinib, rociletinib, olmutinib và naquotinib với ít tác dụng phụ hơn thế hệ 2.

2. Điều trị đích cho đột biến KRAS: KRAS là một mắt xích trong chuỗi tín hiệu điều khiển sự tăng sinh tế bào. Trong ung thư, nếu KRAS bị đột biến thì dù các TKI có hiệu quả đi nữa cũng không ngăn chặn được sự phát triển tế bào ung thư [3]. Chính vì vậy nếu xét nghiệm đột biến dẫn đường phát hiện được đột biến KRAS thì không có chỉ định sử dụng TKI. Trong NSCLC thì đột biến KRAS có thể xảy ra trong 12-15% các trường hợp với 90% trên codon 12 và từ 5-10% xảy ra trên codon 13. Hiện vẫn chưa có một phương thuốc điều trị đích nào có hiệu quả cho NSCLC có đột biến KRAS. Liệu pháp ức chế chốt gác miễn dịch đang là tia hy vọng cho điều trị đích có đột biến KRAS.

3. Điều trị đích cho đột biến BRAF: Cũng giống KRAS, BRAF là một mắt xích trong chuỗi tín hiệu điều khiển sự tăng sinh tế bào. Cũng như KRAS, nếu BRAF bị đột biến thì sẽ không có chỉ định sử dụng TKI vì ung thư sẽ phát triển dù TKI có đột biến dẫn đường trên EGFR. Trong NSCLC thì 1-3% là có đột biến BRAF với 55% đột biến V600E. Khác với KRAS, nếu đột biến BRAF là V600E thì thuốc điều trị đích dabrafenib (ức chế BRAF) và trametinib (ức chế MEK) được chỉ định là thuốc điều trị hàng đầu [1].

4. Kháng thể đơn dòng khóa thụ thể EGFR: Giải pháp để khóa hãm con đường tín hiệu từ EGFR cho dù có các đột biến hạ lưu (downstream mutation) của chuỗi tín hiệu bắt nguồn từ EGFR (tyrosine kinase, KRAS, BRAF, MET) là dùng kháng thể đơn dòng

đặc hiệu để khóa hẳn thụ thể EGFR [1]. Hiện đã có nhiều kháng thể đơn dòng được phát triển để khóa thụ thể EGFR, đó là cetuximab, panitumumab và necitumumab. Sản phẩm Cetuximab là kháng thể đơn dòng lai giữa người và chuột, panitumumab là kháng thể đơn dòng hoàn toàn có nguồn gốc người và thuộc lớp IgG2, còn necitumumab là kháng thể đơn dòng người tái tổ hợp thuộc lớp IgG1. Các kháng thể này được FDA phê duyệt để điều trị ung thư đại trực tràng (CRC: Colo-Rectal Cancer) di căn, riêng chỉ có cetuximab là được FDA phê chuẩn để điều trị NSCLC di căn mà thôi.

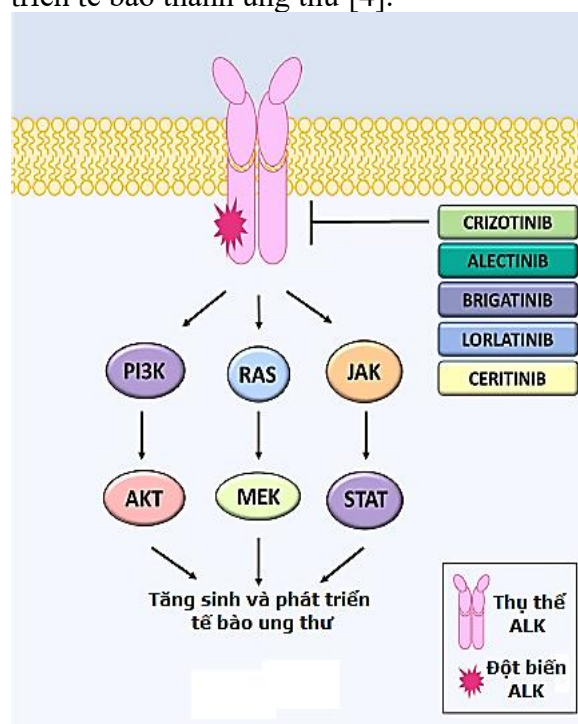


**Hình 2:** Các giải pháp điều trị nhắm đích EGFR trong ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC)

### Thuốc nhắm đích ALK

ALK (anaplastic lymphoma kinase) cũng là tín hiệu cho sự tăng sinh và phát triển tế

bào. Đột biến gen ALK sẽ làm cho sự phát triển tế bào thành ung thư [4].



**Hình 3:** Các giải pháp điều trị nhắm đích ALK<sup>+</sup> trong ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC)

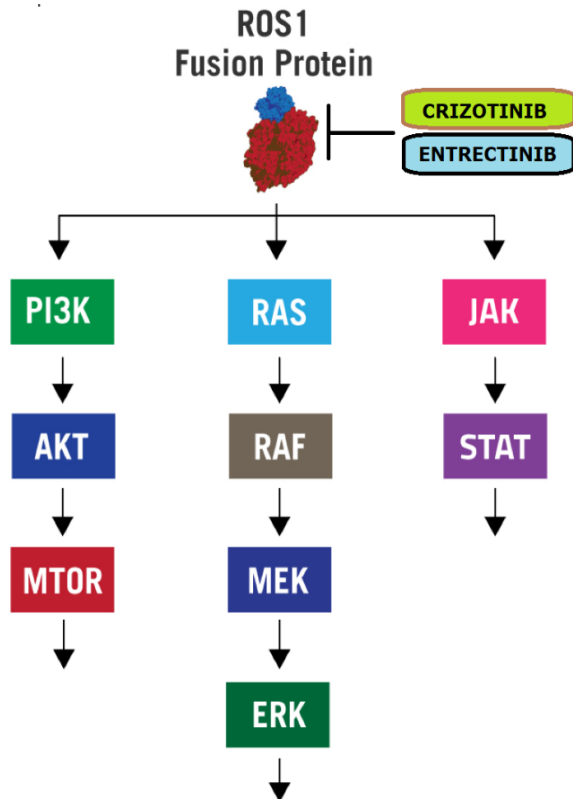
Trong NSCLC thì đột biến ALK có thể xảy ra với tỷ lệ 5% và cơ chế đột biến là do sự nối đoạn (fusion) AML4 với ALK. Nếu NSCLC có đột biến ALK (ALK<sup>+</sup>) thì phải sử dụng thuốc nhắm đích là ức chế ALK, gọi là ALK inhibitor [5]. Thuốc nhắm đích đầu tiên dành cho ALK<sup>+</sup> NSCLC là crizotinib. Tuy nhiên crizotinib có thể bị đề kháng do đột biến khác trên ALK hay một số cơ chế khác. Lúc này, phải thay crizotinib bằng alectinib, brigatinib, ceritinib, hay lorlatinib để vượt qua được đề kháng crizotinib (hình 3).

### Thuốc nhắm đích ROS1

ROS 1 cũng là một tyrosine kinase mà sự đột biến gen ROS1 sẽ chiếm 2% trong NSCLS. Đột biến ROS1 là do nối đoạn ROS1 với các thành phần ROS1 khác tạo ra protein ROS1 khác thường, chính là fusion

protein, hậu quả là làm tăng sinh tế bào ung thư và di căn [6].

Thuốc điều trị đích dành cho NSCLC có ROS1 bị đột biến (ROS1<sup>+</sup> NSCLC) là crizotinib và entrectinib.



#### Tăng sinh tế bào và di căn

**Hình 4:** Các giải pháp điều trị nhắm đích ROS1<sup>+</sup> trong ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC)

**Thuốc nhắm đích NTRK, MET ex14, và RET.** NTRK bị đột biến là do nối đoạn, MET ex14 đột biến do thay đổi xảy ở exon 14, và RET bị đột biến cũng do nối đoạn. Mỗi đột biến cũng đều có thuốc nhắm đích. Liệu pháp entrectinib và larotrectinib là nhắm đích ức chế NTRK fusion protein do NTRK<sup>+</sup> (đột biến nối đoạn NTRK), capmatinib là dành cho MET ex14, còn selpercatinib là dành cho RET<sup>+</sup> (đột biến nối đoạn RET).

#### Thuốc ức chế chốt gác miễn dịch

Các nhà khoa học từ lâu đã nghi ngờ rằng hệ thống miễn dịch có khả năng phát hiện và tiêu diệt được tế bào ung thư. Bằng chứng là những người bị suy giảm miễn dịch (HIV/AIDS hay phải sử dụng thuốc ức chế miễn dịch chống thải ghép) là có nguy cơ cao mắc một số ung thư. Ở người bình thường, các tế bào lympho T của hệ miễn dịch là có khả năng phát hiện các tế bào ung thư để tiêu diệt. Nhưng ở người bị ung thư thì tế bào lympho T hầu như bị tê liệt khả năng này. Lý do của vấn đề này là nằm ở chỗ chốt gác miễn dịch (immune check point).

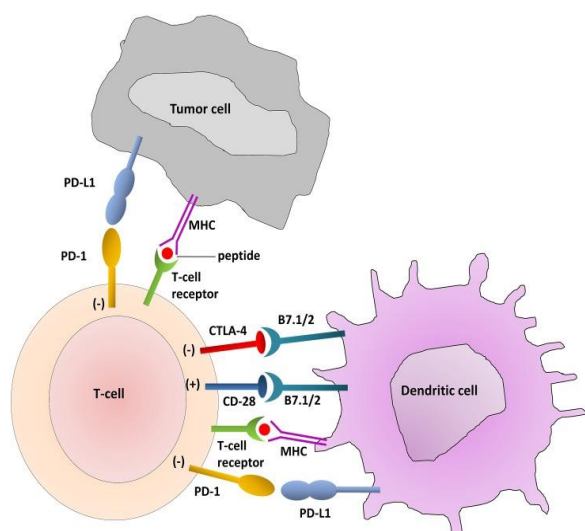
Để đáp ứng được miễn dịch thì tế bào trình diện kháng nguyên (tế bào tua tức là các đại thực bào tại chỗ) phải trình diện kháng nguyên trên phân tử MHC của nó cho thụ thể kháng nguyên (TCR; T cell receptor) trên tế bào T, đồng thời cũng phải trình diện phối tử B7 (B7 ligand) của nó lên CD28 trên tế bào T để kích hoạt tế bào T. Tuy nhiên sự kích hoạt này lại được điều hòa bằng kháng nguyên CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) có khả năng cạnh tranh với CD28 để bám vào phối tử B7 và ngăn được tín hiệu B7-CD28 và ngăn sự kích hoạt quá đáng tế bào lympho T. Chính nhờ cơ chế điều hòa này mà trong các phản ứng viêm kinh niên, cơ thể chúng ta đã giảm thiểu được các thiệt hại do sự quá đáp ứng miễn dịch. Đây chính là cơ chế hoạt động của chốt gác miễn dịch.

Thế thì chuyện gì đã xảy ra trong ung thư đã khiến cho tế bào T hoàn toàn bị tê liệt, không bị kích hoạt để nhận diện và tiêu diệt được tế bào ung thư? Có thể có một trong hai cơ chế diễn ra:

(i) Hoặc là sự quá biểu hiện của kháng nguyên CTLA-4 đã cạnh tranh hoàn toàn với CD28 để gắn vào phối tử B7 làm mất đi tín hiệu B7-CD28 do vậy mà tế bào T không bị kích hoạt.

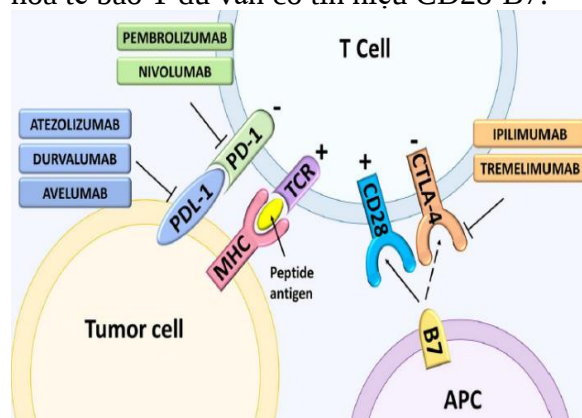
(ii) Hoặc là các programmed cell death protein 1 (PD-1) trên tế bào lympho T bị các phối tử đặc hiệu các protein này, gọi là PDL-1 trên tế bào ung thư bám vào và làm cho tế bào lympho T bị tê liệt cho dù các thụ thể TCR trên tế bào T vẫn nhận diện được các kháng nguyên của tế bào ung thư [7].

Năm 2018, giải Nobel Y Học/Sinh Lý Học đã được trao cho hai nhà khoa học: James P. Allison (Trung tâm Ung thư M. D. Anderson, Hoa Kỳ) phát hiện CTLA-4 và Tasuku Honjo (đại học Kyoto) phát hiện PDL-1. Ngày 1 tháng 10 năm 2018, tại buổi trao giải Nobel, Ủy ban trao giải cho biết: “Căn bệnh ung thư đã giết chết hàng triệu người mỗi năm và là một trong những thách thức sức khỏe lớn nhất của nhân loại” và “Bằng cách kích thích khả năng vốn có của hệ thống miễn dịch của chính người bệnh để tấn công các tế bào ung thư, những người đoạt giải Nobel năm nay đã tìm ra một phương điều trị ung thư hoàn toàn mới”



**Hình 5:** Cơ chế hoạt động của chốt gác miễn dịch, chủ yếu là CTLA-4 cạnh tranh với CD28 trong gắn vào phối tử B7 trên tế bào trình diện kháng nguyên, hay trong ung thư là sự quá biểu hiện của PDL-1 trên tế bào

ung thư gắn lên protein PD-1 làm tê liệt hoạt hóa tế bào T dù vẫn có tín hiệu CD28-B7.



**Hình 6:** Các thuốc ức chế chốt gác miễn dịch là nhằm giải phóng tín hiệu CD28-B7 với ba nhóm kháng thể đơn dòng: (i) Ức chế CTLA-4; (ii) Ức chế PD-1; (iii) và ức chế PDL-1.

Quả thật vậy, dựa trên các hiểu biết về chốt gác miễn dịch, đã có nhiều liệu pháp nhắm đích là ức chế chốt gác miễn dịch được phát triển. Đó chính là các kháng thể đơn dòng ức chế các chốt gác này. Tựu trung có ba nhóm kháng thể đơn dòng (hình 6), đó là: Ipilimumab và tremelimumab dành cho ức chế CTLA-4; Pembrolizumab và nivolumab để ức chế PD-1; Atezolizumab, durvalumab và avelumab để ức chế PDL-1 [1]. Các kháng thể đơn dòng ức chế CTLA-4 được sử dụng chủ yếu trong điều trị ung thư sắc tố da. Hai nhóm kháng thể đơn dòng sau là được chỉ định điều trị nhiều ung thư khác nhau trong đó có NSCLC với điều kiện là xét nghiệm nhuộm hóa mô miễn dịch hay FISH thấy có biểu hiện PDL-1 trên mô ung thư.

## XÉT NGHIỆM DẪN ĐƯỜNG

Như đã bàn ở phần đầu, điều trị nhắm đích phân tử là một điều trị mang tính cá nhân hóa, nghĩa là bác sĩ điều trị phải lựa chọn giải pháp điều trị phù hợp cho từng cá

thể. Muốn vậy thì phải có xét nghiệm dẫn đường.

**Xét nghiệm phát hiện đột biến dẫn đường.** Trong điều trị nhắm đích phân tử dành cho NSCLC thì xét nghiệm dẫn đường trước hết là xét nghiệm phát hiện các đột biến dẫn đường cho các thuốc ức chế tyrosine kinase (TKI), đó là xét nghiệm phát hiện các đột biến gen EGFR, đặc biệt là phải phát hiện được hai đột biến quan trọng là L858R trên exon 21 và các deletion trên exon 19 giúp NSCLC nhạy cảm được các TKI. Không chỉ vậy còn phải phát hiện đột biến T790M trên exon 20 làm cho NSCLC kháng được các TKI thế hệ 1, phải chỉ định TKI thế hệ 2 hay thế hệ 3 để thay thế. Ngoài ra, hiện nay nhờ có thêm các hiểu biết về các đột biến hạ lưu như đột biến KRAS và BRAF, hay các đột biến ALK, ROS1, NTRK, MET ex14, và RET làm cho các TKI không còn hiệu quả, nên xét nghiệm dẫn đường cho trị liệu đích phân tử dành cho NSCLC còn phải thêm xét nghiệm phát hiện các đột biến trên để bác sĩ có thể chọn lựa các thuốc điều trị nhắm đích phân tử thích hợp.

Các xét nghiệm phát hiện các đột biến dẫn đường trên các gen EGFR, KRAS, BRAF, ALK, ROS1, NTRK, MET ex14 và RET là được thực hiện bằng phương pháp giải trình tự gen, hay real-time PCR với mẫu thử là mẫu sinh thiết lấy từ mô ung thư, hay cắt từ mô ung thư sau khi giải phẫu cắt khối u. Tuy nhiên khi làm xét nghiệm với mẫu thử phải là mẫu mô lấy từ khối u thì sẽ gặp một số thách thức:

(i) Trước hết là nếu mẫu sinh thiết lấy được không phải là mô ung thư mà là mô bình thường, hay đa số là mô bình thường và

chỉ có một vị trí nào đó là mô ung thư thì xét nghiệm sẽ không phát hiện được đột biến nếu không có sự hướng dẫn của giải phẫu bệnh để chỉ lấy phần mô ung thư làm xét nghiệm mà thôi. Do vậy xét nghiệm phát hiện đột biến dẫn đường bắt buộc phải làm trên các mô FFPE (Formalin Fixed Paraffin Embedded) tức là mô đúc sáp đã được giải phẫu bệnh xác định chứa mô ung thư. Tuy nhiên chất lượng mô đúc sáp lại rất thay đổi tùy thuộc vào chất lượng hóa chất được sử dụng vì nếu dùng formalin không tốt sẽ làm các DNA bị đứt gãy thì kết quả PCR sẽ không khuếch đại được trình tự đích nên sẽ không thể phát hiện được đột biến. Ngoài ra, cũng phải lưu ý tình trạng ngoại nhiễm do sáp được dùng lại, hay hóa chất dùng lại, hay khuôn đúc dùng lại cũng có thể cho các kết quả phát hiện đột biến bị dương tính giả.

(ii) Một thách thức nữa cũng rất thường gặp, đó là với các khối u còn nhỏ hay nằm ở vị trí khó tiếp cận thì các mẫu lấy được chỉ là các sinh thiết lõi kim với kích thước rất nhỏ, có khi chỉ lấy được mô bình thường hay chỉ có một số ít mô ung thư. Với mẫu thử như vậy thì cũng rất khó để có thể phát hiện đột biến vì lượng mẫu quá ít không đủ DNA để khuếch đại.

(iii) Với các mẫu tràn dịch màng phổi thì việc phát hiện các đột biến từ tế bào ung thư cũng rất khó vì bị che lấp bởi các tế bào viêm và tế bào bạch cầu. Trong trường hợp này thì lấy mẫu cell bloc sẽ tốt hơn.

Các thách thức này sẽ được giải quyết một phần nếu phòng thí nghiệm chọn giải pháp kỹ thuật có độ nhạy cao. **Bảng 1** trình bày độ nhạy của các giải pháp kỹ thuật được

sử dụng trong phát hiện các đột biến dẫn đường trên gen EGFR [8].

**Bảng 1: Độ nhạy của các kỹ thuật phát hiện đột biến dẫn đường trên gen EGFR**

| Kỹ thuật                            | Giới hạn phát hiện |
|-------------------------------------|--------------------|
| Giải trình tự trực tiếp (Sanger)*   | 25%                |
| PCR-SSCP*                           | 10%                |
| TaqManPCR                           | 10%                |
| Loop-hybrid mobility shift assay    | 7,5%               |
| CycleavePCR                         | 5%                 |
| PCR-RLFP (fragment length analysis) | 5%                 |
| MassARRAY genotyping                | 5%                 |
| LNA-PCR clamp                       | 1%                 |
| Scorpion ARMS (DxS)                 | 1%                 |
| Pyrosequencing                      | 1-2%               |
| dHPLC                               | 1%                 |
| COLD-TaqManPCR                      | 0,05%              |
| NGS (Next Generation Sequencing)*   | 0,01%              |

\*Phát hiện các đột biến đã biết và cả đột biến mới

Theo như **bảng 1** thì chúng ta thấy kỹ thuật giải trình tự Sanger cho độ nhạy thấp nhất vì phải cần đến 25% mẫu phân tích có đột biến mới có thể phát hiện được. Phương pháp taqman-PCR bình thường cũng cho độ nhạy không cao vì giới hạn phát hiện cũng phải đến 10%. Tuy nhiên với real-time PCR sử dụng kỹ thuật Scorpion-ARMS của Qiagen thì độ nhạy cao hơn nhiều với giới hạn phát hiện 1%, tương đương với kỹ thuật pyrosequencing. Lý do pyrosequencing có độ nhạy cao là vì pyrosequencing chỉ cần giải trình tự những đoạn ngắn có chứa các

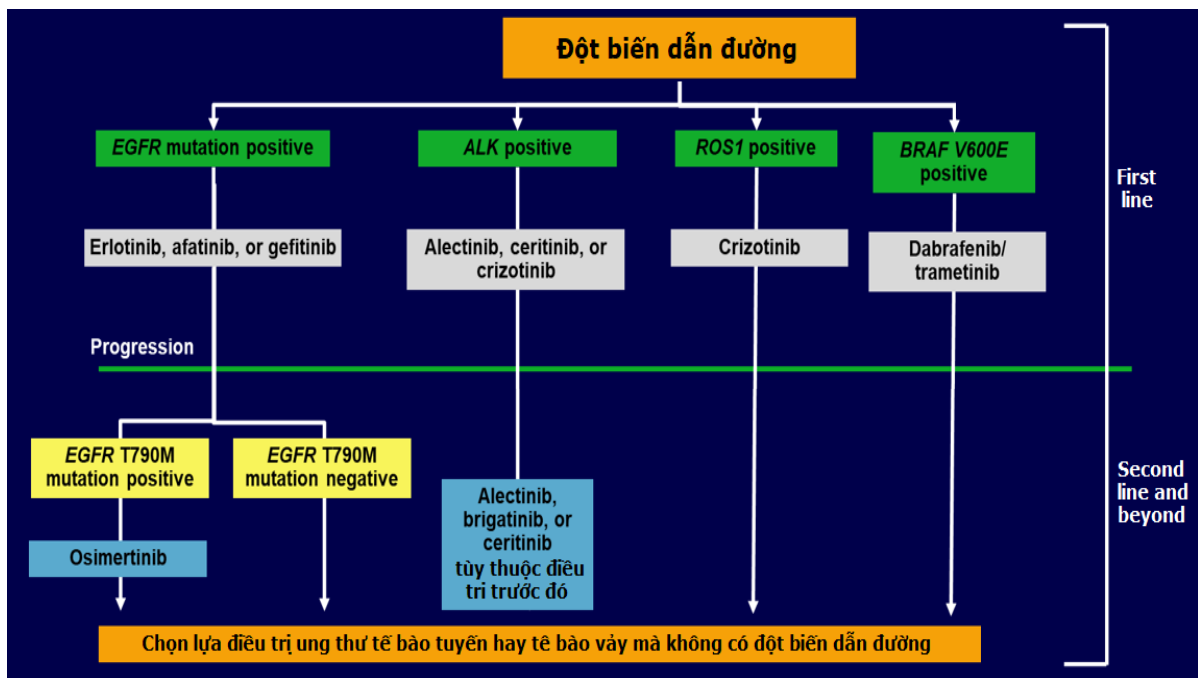
đột biến nên nhạy cảm hơn giải trình tự Sanger, phải giải trình tự các đoạn dài và nguy cơ khuếch đại không xảy ra nếu DNA mục tiêu bị gãy khúc nhiều. **Bảng 1** cũng cho thấy kỹ thuật cho độ nhạy cao nhất là NGS (Next Generation Sequencing), có giới hạn phát hiện thấp đến 0,01%. Lý do NGS cho độ nhạy cao là vì NGS có thể giải được hàng triệu trình tự của các mảnh DNA có mặt trong mẫu thử, nhờ vậy mà các trình tự có mang đột biến dù hiện diện rất thấp trong mẫu vẫn có thể được phát hiện.

Trước đây, trong nghiên cứu PIONEER 2012 [9], công ty Nam Khoa đã áp dụng kỹ thuật Scorpion-ARMS PCR để phát hiện các đột biến dẫn đường ở gen EGFR trên các mẫu mô sinh thiết NSCLC và đã ghi nhận 62,4% các trường hợp nghiên cứu là có các đột biến dẫn đường mà trong số đó có đến 84,2% là có đột biến L858R và/hoặc mất đoạn trên exon 19. Sau đó công ty Nam Khoa cũng đã phát triển thêm kỹ thuật pyrosequencing trong phát hiện các đột biến dẫn đường trên gen EGFR, KRAS, BRAF và một số gen khác như KIT, PDGRA. Riêng trong phát hiện các đột biến dẫn đường trên gen EGFR thì nghiên cứu đã cho thấy độ nhạy của pyrosequencing tương đương với độ nhạy của Scorpion-ARMS.

Từ đầu năm 2019, với sự hợp tác của Viện Nghiên Cứu Gen và Miễn Dịch Quốc Tế, Đại Học Phan Châu Trinh đã triển khai kỹ thuật NGS trong phát hiện các đột biến dẫn đường trên 12 gen bao gồm EGFR, KRAS, BRAF, NRAS, ALK, AKT1, DDR2, ERBB2, MEK1, PIK3CA, PTEN, TP53. Xét nghiệm phát hiện 12 đột biến này có thể thực hiện trên mẫu thử là mô sinh thiết và cả trên huyết tương lấy từ bệnh nhân nếu có chỉ định liquid biopsy. Không chỉ vậy, kỹ thuật NGS cũng được triển khai để phát hiện được 50

đột biến nóng (bao gồm cả 12 đột biến dẫn đường cho điều trị nhắm đích phân tử dành cho NSCLC), đó là: ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, EZH2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1,

SMO, SRC, STK11, TP53 và VHL; Với mẫu thử là các mẫu mô sinh thiết. Đối với ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC), kết quả phát hiện đột biến dẫn đường là rất có giá trị giúp bác sĩ chọn phát đồ điều trị nhắm đích phân tử thích hợp cho bệnh nhân. Lưu đồ dưới đây được BS. Tan Jiunn Liang thuộc Trung Tâm Y Khoa Malaya đưa ra trong Hội Nghị Châu Á về sức khỏe tuổi già vào năm 2017 là một trong các lưu đồ được khuyến nghị cho các nhà điều trị.



**Hình 7:** Lưu đồ do BS. Tan Jiunn Liang đề nghị nhằm giúp các nhà điều trị lựa chọn thuốc nhắm đích phân tử dành cho NSCLC dựa trên các đột biến dẫn đường phát hiện được.

Liquid biopsy - Giải pháp phát hiện đột biến mà không cần mẫu sinh thiết

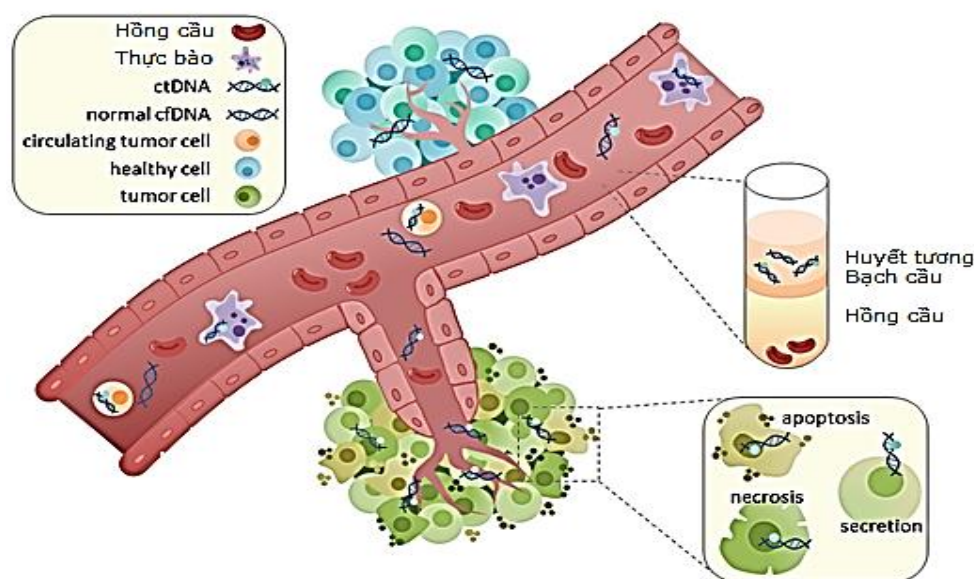
Liquid biopsy hay còn gọi là sinh thiết lỏng là giải pháp phát hiện các đột biến dẫn đường trong các trường hợp không lấy được mẫu sinh thiết. Đó là các trường hợp ung thư nằm ở vị trí không tiếp cận được, hay trong trường hợp bệnh nhân đang điều trị và mô ung thư đã bị teo nhỏ lại không thể lấy được

mẫu sinh thiết lần nữa để làm xét nghiệm theo dõi xem có xuất hiện đột biến kháng thuốc hay không (như đột biến T790M kháng TKI thế hệ 1). Thế thì cơ sở nào để có thể phát hiện các đột biến từ mô ung thư trên mẫu thử là huyết thương người bệnh?

Thật ra trong huyết tương của người bệnh vẫn có các mảnh DNA của khối u lưu thông, đó là ctDNA (circulating tumor DNA) do sự

phân rã của các tế bào khối u trong quá trình tự hủy (apoptosis) hay hoại tử (necrosis). Không chỉ vậy trong huyết tương người bệnh cũng có cả DNA của tế bào bình thường là normal cfDNA (cell free DNA), một số lượng rất nhỏ tế bào khối u (circulating

tumor cell) và đồng thời các tế bào bình thường, bạch cầu và đại thực bào. Do vậy nếu lấy được một lượng lớn huyết tương người bệnh thì rất có cơ hội để tách chiết được các ctDNA và phát hiện được các đột biến trên các ctDNA này.



**Hình 8:** Trong huyết tương người bệnh vẫn có thể lưu hành các ctDNA do các ctDNA này được phóng thích vào máu từ các tế bào khối u bị tan rã vì bị hoại tử (necrosis) hay bị tự hủy (apoptosis)

Để làm được liquid biopsy, ngoài việc phải tách chiết DNA từ một lượng lớn huyết tương lấy từ bệnh nhân (3-10ml), kỹ thuật phát hiện đột biến phải là kỹ thuật đạt độ nhạy cao nhất.

Chính vì vậy mà điều kiện thứ hai để làm được liquid biopsy là phải sử dụng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới. Với kỹ thuật này thì kết quả vẫn có thể phát hiện được đột biến cho dù các ctDNA không nhiều, đột biến tỷ lệ thấp. Hiện nay Đại Học Phan Châu Trinh đã phối hợp với Viện Nghiên Cứu Gen và

Miễn Dịch Quốc tế triển khai xét nghiệm liquid biopsy phát hiện các đột biến dẫn đường trên nền mẫu là huyết tương lấy từ người bệnh NSCLC với kết quả có thêm phần bàn luận về phương pháp điều trị nhắm đích phân tử từ phần mềm chuyên gia trong server của thiết bị NGS có tại phòng nghiên cứu. Dưới đây là một kết quả liquid biopsy được thực hiện từ mẫu huyết tương bệnh nhân bị NSCLC kèm với phần biện luận từ server.

### Detection Results

| Gene   | Result               | Frequency |
|--------|----------------------|-----------|
| AKT1   | No mutation detected | -         |
| ALK    | No mutation detected | -         |
| BRAF   | No mutation detected | -         |
| DDR2   | No mutation detected | -         |
| EGFR   | c.T2573G;p.L858R     | 17.02%    |
| ERBB2  | No mutation detected | -         |
| KRAS   | No mutation detected | -         |
| MEK1   | No mutation detected | -         |
| NRAS   | No mutation detected | -         |
| PIK3CA | No mutation detected | -         |
| PTEN   | No mutation detected | -         |
| TP53   | No mutation detected | -         |

#### 1. Being approved by FDA/CFDA to be used for guidance of individualized lung cancer medication

| Gene | Mutation | Drug                                                               | Drug reaction        | Evidence                       |
|------|----------|--------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| EGFR | p.L858R  | Osimertinib, Gefitinib, Erlotinib, Icotinib, Afatinib, Dacomitinib | Positive Correlation | NCCN Guidelines <sup>[1]</sup> |
| EGFR | p.L858R  | Anlotinib                                                          | Positive Correlation | CFDA <sup>[2]</sup>            |

#### 2. Being approved by FDA/CFDA to be used for guidance of individualized medication of other cancers

Not found

#### 3. Clinical research drugs for lung cancer

| Gene | Mutation | Drug     | Study cancer type | Drug reaction        | Evidence                         |
|------|----------|----------|-------------------|----------------------|----------------------------------|
| EGFR | p.L858R  | Avitinib | Lung Cancer       | Positive Correlation | Clinical Research <sup>[3]</sup> |

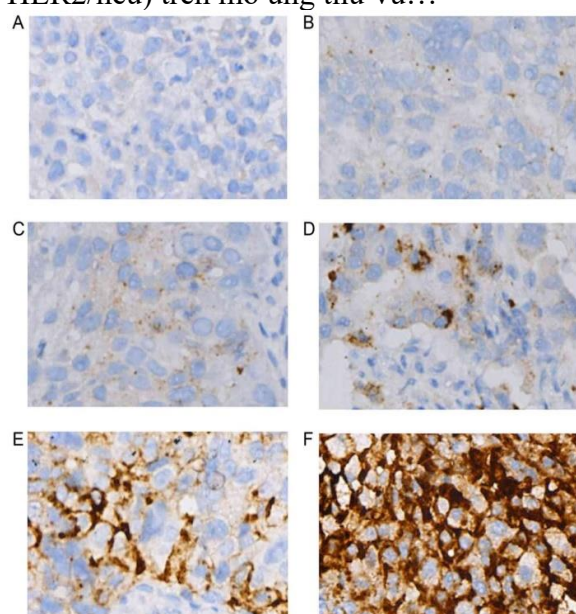
**Hình 9:** Kết quả của một xét nghiệm sinh thiết lỏng (liquid biopsy) mẫu huyết tương của bệnh nhân NSCLC cho thấy có đột biến L858R (T2573G) và trong phần biện luận thì thuốc nhắm đích phân tử phù hợp là osimertinib, gefitinib, erlotinib, icotinib, afatinib, hay dacomitinib (theo NCCN), hay anlotinib (the CFDA)

### Xét nghiệm hóa mô miễn dịch dẫn đường

Để có thể chỉ định các kháng thể đơn dòng khóa thụ thể EGFR thì phải có xét nghiệm chứng minh mô ung thư có sự quá biểu hiện EGFR trên mô ung thư. Xét

nghiệm như vậy có thể thực hiện được bằng phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch. Nếu có sự quá biểu hiện EGFR thì khi quan sát dưới kính hiển vi sẽ thấy các tế bào ung thư bị nhuộm màu đậm hơn. Tương tự như vậy, để có thể chỉ định sử dụng kháng thể đơn

dòng khóa phổi tử PDL-1 trên tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC), phải sử dụng kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch dùng kháng thể đơn dòng đặc hiệu PDL-1. Nếu có sự quá biểu hiện PDL-1 thì mô ung thư sẽ bị nhuộm màu đậm hơn (**hình 10**). Đối với ung thư vú, để chỉ định kháng thể đơn dòng khóa thụ thể HER2 thì cũng phải sử dụng xét nghiệm hóa mô miễn dịch đánh giá sự quá biểu hiện của thụ thể này (gọi là HER2/neu) trên mô ung thư vú...



**Hình 10:** Hình nhuộm hóa mô miễn dịch PDL-1 trên mẫu sinh thiết NSCLC, quan sát ở độ phóng đại 20X: A: chứng [-]; B: 1% [+]; C: 5% [+]; D: 10% [+]; E: 50% [+];

F: 100% [+] ([https:// doi.org/10.3892/ol.2019.10302](https://doi.org/10.3892/ol.2019.10302))

### HY VỌNG MỚI ĐIỀU TRỊ UNG THƯ MÁU LIỆU PHÁP CAR-T

Chúng ta biết rằng nếu tế bào ung thư bị nhận diện bởi các tế bào lympho T của cơ thể thì nó sẽ bị tiêu diệt. Lympho T nhận diện được tế bào ung thư là nhờ có mang những thụ thể phát hiện được các kháng nguyên đặc hiệu trên bề mặt của tế bào ung

thư. Tuy nhiên nếu tế bào lympho T bị mất đi các thụ thể này hay tế bào ung thư biểu hiện lên bề mặt những kháng nguyên mà tế bào lympho T không thể nhận diện được thì tế bào ung thư sẽ thoát được sự săn lùng của các tế bào lympho T và như vậy là tế bào ung thư sẽ phát triển.

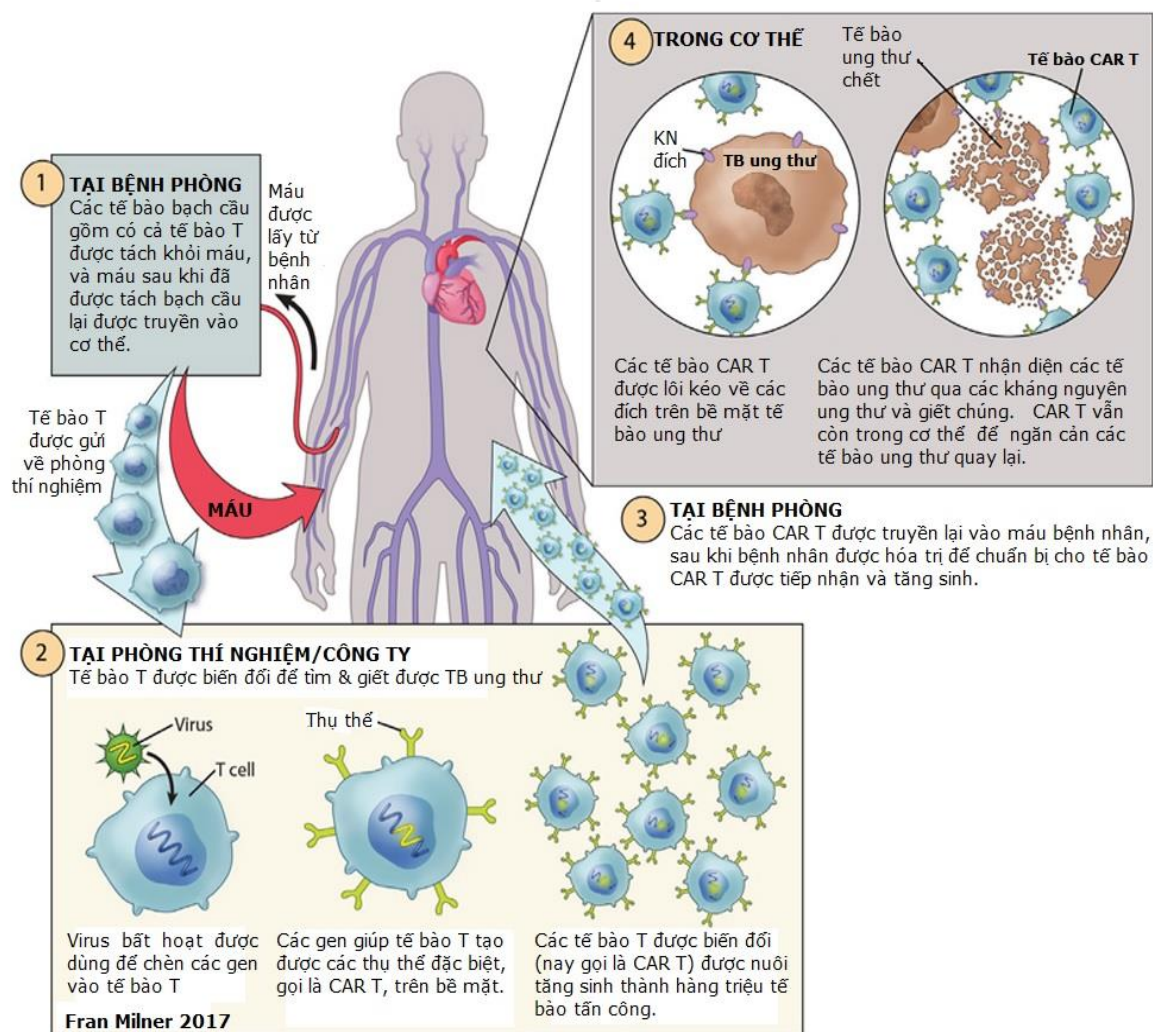
Giải pháp CAR-T được thực hiện bằng cách: (i) Tách tế bào lympho T từ máu bệnh nhân rồi gửi đến phòng thí nghiệm; (ii) Tại phòng thí nghiệm, tế bào lympho T được cho nhiễm các virus vô hại nhưng có mang gen giúp trên bề mặt của các tế bào này biểu hiện được các thụ thể nhận diện được kháng nguyên trên tế bào ung thư, các thụ thể này được gọi là CAR (Chimeric Antigen Receptor) và các tế bào lympho T này được gọi là CAR-T; Cũng trong phòng thí nghiệm, các CAR-T được nuôi tăng sinh thành hàng triệu tế bào (thời gian của giai đoạn phòng thí nghiệm là mất trên 10 ngày); (iii) Các CAR-T sẽ được truyền lại cho bệnh nhân, nhưng trước khi truyền thì phải dùng hóa trị để giúp cơ thể đón nhận các tế bào CAR-T được truyền vào; (iv) Sau đó là phải theo dõi các biến chứng như hội chứng phóng thích cytokine (cytokine release syndrome) và một số biến chứng khác. **Hình 11** dưới đây tóm tắt các giai đoạn chính của phương pháp CAR-T điều trị ung thư [10].

Liệu pháp điều trị ung thư bằng CAR-T được các nhà y học hy vọng có thể áp dụng trong điều trị nhiều loại ung thư, kể cả ung thư trên các mô đặc. Tuy nhiên cho đến hiện nay thì liệu pháp CAR-T chỉ mới được áp dụng thành công trên điều trị ung thư bạch cầu cấp tính. Trong các ung thư bạch cầu cấp, các tế bào lympho B sẽ phát triển hỗn loạn thành tế bào ung thư (gọi là B-ALL; Acute Lymphoblastic Leukemia) và trên bề mặt biểu hiện nhiều CD19 mà tế bào

lympho-T của cơ thể không thể nhận diện được. Do vậy mà lympho-T của bệnh nhân sẽ được phòng thí nghiệm chèn vào gen biểu hiện thụ thể nhận diện CD19. Do có những thất bại điều trị nên hiện nay có thêm công nghệ chèn gen biểu hiện thụ thể CD22 và CD123 nữa.

Thành công của CAR-T trong điều trị ung thư bạch cầu cấp đã mang đến rất nhiều hy

vọng trong mở rộng thêm cánh cửa điều trị ung thư. Tuy nhiên giá thành trong điều trị ung thư bằng phương pháp CAR-T cũng rất mắc. Chi phí điều trị CAR-T của hãng Novartis là 475.000 USD và của Kite Pharma là 373.000 USD, chưa bao gồm các chi phí liên quan đến điều trị, nằm viện và các chi phí xử lý tác dụng phụ liên quan. Có thể nói là vô cùng đắt đỏ.



**Hình 11:** Các giai đoạn chính trong điều trị ung thư bạch cầu cấp bằng CAR-T bao gồm tại phòng bệnh và tại phòng thí nghiệm. (1) Tại phòng bệnh, bệnh nhân được lấy máu để tách lấy bạch cầu gồm cả tế bào lympho T còn trả lại hồng cầu cho bệnh nhân. (2) Tại phòng thí

nghiệm tế bào lympho T của bệnh nhân được cho nhiễm virus có mang gen biểu hiện thụ thể CAR đặc hiệu kháng nguyên ung thư, sau đó các CAR-T được nhân bản thành hàng triệu tế bào. (3) Chuẩn bị bệnh nhân tại phòng bệnh bằng hóa trị để sẵn sàng tiếp nhận các tế bào CAR-T. (4) Các tế bào CAR-T được truyền lại vào cơ thể bệnh nhân để tìm và diệt tế bào ung thư.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Seebacher et al. (2019). Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019;38:156
2. Pao W et al. (2005) Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*. 2005;2(3):e73.
3. Román et al. (2018). KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target. *Molecular Cancer*. 2018;17:33
4. Hallberg B et al. (2016). The role of the ALK receptor in cancer biology. *Ann Oncol*. 2016;27(Suppl 3):iii4-iii15.
5. Alshareef A. (2017) Novel Molecular Challenges in Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase in ALK-Expressing Human Cancers. *Cancers*. 2017;9(11)
6. A T Shaw et al. (2019). Crizotinib in ROS1-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): updated results, including overall survival, from PROFILE 1001. *Ann Oncol*. 2019 Jul; 30(7): 1121-1126.
7. Viricel C et al. (2015). Human PD-1 binds differently to its human ligands: a comprehensive modeling study. *J Mol Graph Modell*. 2015;57:131-42
8. Pao and Ladanyi. (2007). Epidermal growth factor receptor mutation testing in lung cancer: searching for the ideal method. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4954-55
9. Yuankai Shi et al. (2014). A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol* . 2014 Feb;9(2):154-62.
10. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>

## CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH BỆNH THIẾU HỤT CITRIN BẰNG KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ

Nguyễn Thị Mai Hương\*, Nguyễn Phạm Anh Hoa\*,  
Nguyễn Thị Phương Mai\*, Trần Minh Điển\*

### TÓM TẮT

Bệnh thiếu hụt Citrin là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường do đột biến gen SLC25A13. **Mục tiêu:** Áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán trước sinh bệnh thiếu hụt Citrin. **Đối tượng và phương pháp:** 22 thai phụ có tiền sử sinh con mắc bệnh thiếu hụt Citrin đã xác định được đột biến gen SLC25A13 ở con đầu mắc bệnh. Chẩn đoán trước sinh được thực hiện bằng kỹ thuật PCR-RFLP và giải trình tự gen trực tiếp. **Kết quả:** Trong tổng số 22 thai nhi được chẩn đoán trước sinh, 5 thai bị đột biến đồng hợp tử, 8 thai bị đột biến dị hợp tử và 9 thai không có đột biến. **Kết luận:** Chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật sinh học phân tử mang lại kết quả đáng tin cậy, góp phần quan trọng trong kiểm soát bệnh tật di truyền, quản lý thai sản và giảm tỷ lệ sinh con mắc bệnh qua đó nâng cao chất lượng sống của cộng đồng.

**Từ khóa:** Citrin deficiency, SLC25A13, NICCD, Citrullinemia

### SUMMARY

#### PRENATAL DIAGNOSIS FOR CITRIN DEFICIENCY BY DNA ANALYSIS

Citrin deficiency is autosomal disorder caused by SLC25A13 gene mutation. It was divided into two types: NICCD (neonatal hepatitis associated

with cholestasis) and CTLN2 (adult-onset type II citrullinemia) based on the age of onset. In the present study, we use PCR-RFLP and directly Sanger sequencing for prenatal diagnosis of 22 families with NICCD proband. This study found 5 affected fetuses, 8 carrier fetuses and 9 normal fetuses. PCR-RFLP and Sanger sequencing are still useful tools in prenatal diagnosis as well as in postnatal diagnosis. Our finding also provided a reliable test for genetic counseling and clinical management of Citrin deficiency in Viet Nam.

**Key words:** Citrin deficiency, SLC25A13, NICCD, Citrullinemia

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thiếu hụt citrin (Citrin deficiency) là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường do đột biến gen SLC25A13 nằm trên cánh dài NST số 7 (7q21.3) gây ra thiếu hụt Citrin, một loại protein vận chuyển xuyên màng trong ty thể [6]. Citrin là một chất mang Aspartate (Asp) - Glutamate (Glu) ở màng trong ty thể, tham gia vào quá trình tân tạo đường, đường phân hiếu khí và sản phẩm để tổng hợp protein, là một thành phần của con thoi Malate-Aspartate (Aspartate - Malate shuttle) qua đó điều chỉnh tỷ lệ NAD<sup>+</sup>/NADH giữa tế bào và ty thể [6, 3]. Nó được mô tả lần đầu tiên ở người Nhật Bản và Đông Á nhưng hiện nay được coi là một căn bệnh sắc tộc [2].

Thiếu hụt Citrin được chia thành hai thể lâm sàng dựa vào độ tuổi khởi phát: Viêm gan ứ mật ở trẻ sơ sinh (Neonatal

\*Bệnh viện Nhi Trung Ương

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Mai Hương  
Email: nmai.huong@gmail.com

Ngày nhận bài: 26.8.2020

Ngày phản biện khoa học: 8.9.2020

Ngày duyệt bài: 18.11.2020

intrahepatic cholestatic hepatitis caused by citrin deficiency, NICCD: MIM#605814) và tăng citrullin typ II khởi phát ở tuổi trưởng thành (Adult-onset type II Citrullinemia - CTLN2; MIM#603471) [6]. Gen gây bệnh của cả hai thể lâm sàng nằm trên cánh dài của nhiễm sắc thể số 7 (7q21.3), có kích thước khoảng 200 kb, gồm 18 exon và mã hóa cho 675 axit amin (aa). Citrin chủ yếu biểu hiện ở gan là cơ quan đóng vai trò chuyển hóa nhiều chất khác nhau [4, 2].

Ngoại trừ một số ca bị rối loạn chức năng gan nghiêm trọng cần phải ghép gan, NICCD sẽ thuyên giảm dần và các triệu chứng sẽ được cải thiện khi trẻ được 1 tuổi. Tuy nhiên, sau 10 năm hoặc thậm chí một vài thập vài thập kỉ, một số bệnh nhân thiếu hụt Citrin phát triển thành CTLN2 với các triệu chứng liên quan đến thần kinh, có thể nguy hiểm đến tính mạng [6, 4]. Việc chẩn đoán xác định sớm trẻ bị thiếu hụt Citrin góp phần quan trọng trong điều trị và ngăn chặn NICCD chuyển sang CTLN2, qua đó nâng cao chất lượng sống cho bệnh nhân. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu: Chẩn đoán trước sinh bệnh thiếu hụt Citrin bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng

22 sản phụ có tiền sử sinh con mắc bệnh thiếu hụt Citrin, đang mang thai ở tuần thai 16-18 tuần.

### 2.2. Phương pháp

- Mẫu bệnh phẩm: Mỗi sản phụ được lấy 12-15 ml dịch ối đựng trong ống vô trùng. Quá trình chọc hút dịch ối được tiến hành tại Trung tâm chẩn đoán trước sinh - Bệnh viện Phụ sản Hà Nội.

- Phân tích 4 đột biến trên gen SLC25A13 bằng kỹ thuật PCR/RFLP: Được tiến hành tại Khoa Di truyền và Sinh học phân tử - Bệnh viện Nhi Trung ương:

Nuôi cấy dòng tế bào ối: Mẫu dịch ối được nuôi cấy trong môi trường Amniomax Complete (Invitrogen). Dòng tế bào ối được thu hoạch sau hai tuần và rửa sạch bằng dung dịch PBS1X trước khi tiến hành tách DNA tổng số. DNA tổng số từ dòng tế bào ối được tách chiết bằng kit tách DNA (QIAamp DNA Blood Mini Kit, (Qiagen-Đức).

Kỹ thuật PCR-RFLP: Để xác định đột biến trên gen SLC25A13, ADN tổng số của mỗi dòng tế bào ối được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR nhờ 4 cặp mồi đặc hiệu đã được thiết kế sẵn (Bảng 2.1). Trình tự mồi và chu trình nhiệt cho 4 đột biến được thiết kế theo Kobayashi và cs [4]: 95 °- 5 giây, [95 °- 20 giây, 55 °- 20 giây, 72 °- 30 giây] x 35 chu kỳ, 72 °-7 phút. Sản phẩm PCR của đột biến I, X lần lượt được nhận biết bằng cắt enzyme Tail và Tas I, ở điều kiện 65 °C trong 5 giờ. Sản phẩm PCR của đột biến III và sản phẩm cắt enzyme được điện di trên thạch agarose 3% để nhận biết kích thước. Đột biến XIX được kiểm tra trên thạch agarose 1%.

**Bảng 2.1: Đột biến gen SLC25A13 trên bệnh nhân NICC Việt Nam**

| Đột biến          | Thay đổi nucleotide | Thay đổi amino acid | Exon      |
|-------------------|---------------------|---------------------|-----------|
| I (851del4)       | c. 851_854delGTAT   | p.R284fs(286*)      | 9         |
| III (1638ins23)   | c.1638_1660dup      | p.A554fs570*        | 16        |
| X (IVS6+5G>A)     | c.not detectable    |                     | Intron 6  |
| XIX (IVS16ins3kb) | c.aberrant RNA      | p.A584fs(585*)      | Intron 16 |

Xác định đột biến trên gen SLC25A13 bằng kỹ thuật giải trình tự gen: DNA tổng số của mỗi dòng tế bào 0i được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR nhờ 18 cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên thạch agarose 1%. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit tinh sạch (DNA purification kit (Qiagen, Đức). Sản phẩm tinh sạch tiếp tục được sử dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự gen. Sau đó, sản phẩm giải trình tự gen tiếp tục được rửa bằng kit BigDye X. terminator purification kit (Applied Biosystems, Mỹ). Giải trình tự gen sử dụng kit BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) và được thực hiện trên máy ABI PRISM - 3130 Genetic Analyzer machine (Applied Biosystems, Mỹ). Trình tự gen được xử lý bằng phần mềm Sequencing Analysis Software v5.3 và được phân tích bằng phần mềm Chromas, Seqscape 2.5 và so sánh với trình tự chuẩn được công bố trên Ngân hàng gen quốc tế NT\_012247.1.

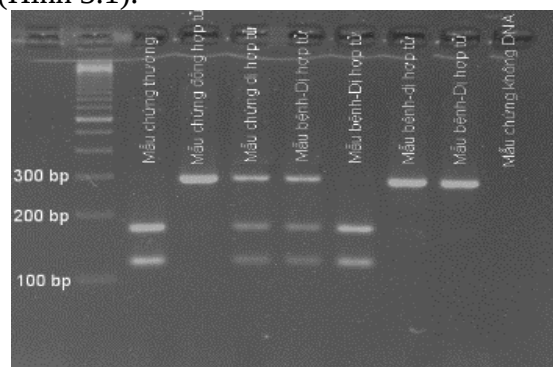
### 2.3. Đạo đức nghiên cứu

Đề tài tuân thủ chặt chẽ đạo đức nghiên cứu trong Y học, bệnh nhân và người nhà hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu và có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không muốn tiếp tục tham gia vào nghiên cứu. Bệnh nhân và người nhà bệnh nhân sẽ được thông báo về kết quả xét nghiệm gen để giúp cho các bác sỹ tư vấn di truyền hoặc lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp. Các thông tin của họ sẽ được đảm bảo bí mật.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Kết quả phân tích đột biến gen

**bằng kỹ thuật PCR/RFLP và giải trình tự gen.** Trong số 4 đột biến được sàng lọc, đột biến I và X được thực hiện bằng kỹ thuật PCR-RFLP, đột biến III và XIX được thực hiện bằng kỹ thuật PCR. Đột biến số I là đột biến mất 4bp trên exon số 9. Enzyme được sử dụng để cắt sản phẩm PCR có vị trí nhận biết điểm cắt chính là vị trí đột biến mất 4bp (Hình 3.1).



**Hình 3.1. Hình ảnh điện di đột biến c.851\_854del5 (mut I)**

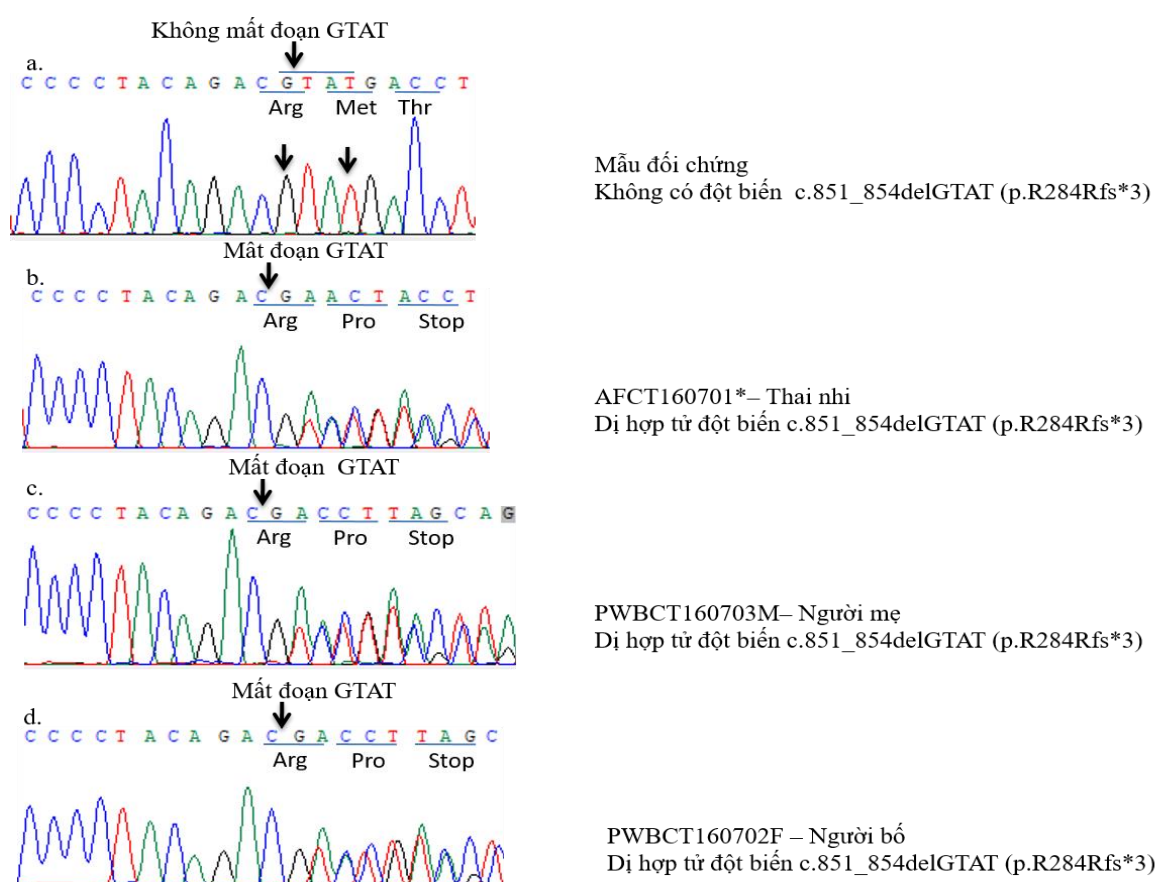
Mẫu chứng bình thường gồm 2 băng có kích thước là 174 và 118 bp; Mẫu chứng đồng hợp tử, trình tự gen mất GTAT nên mất vị trí nhận biết của enzyme giới hạn Tail I, sản phẩm PCR không bị cắt và có kích thước 288 bp; Mẫu chứng dị hợp tử, sản phẩm PCR sẽ bị cắt, đồng thời một alen bình thường không bị cắt nên trên ảnh điện di sẽ có 3 băng: 292, 178 và 118 bp

Qua phân tích kết quả PCR/RFLP trên dòng tế bào 0i của 22 thai nhi cho thấy 5 thai bị đột biến đồng hợp tử đột biến I, 8 thai bị đột biến dị hợp tử đột biến I và 9 thai nhi dị hợp tử đột biến. Trong số 8 thai nhi bị đột biến dị hợp tử, có 8 thai nhi dị hợp tử đột biến I và 1 thai nhi dị hợp tử đột biến XIX (Bảng 3.1).

**Bảng 3.1. Kết quả chẩn đoán trước sinh cho 22 thai phụ**

| MSBN             | Kết quả phân tích đột biến gen |           |                   |
|------------------|--------------------------------|-----------|-------------------|
|                  | Đồng hợp tử                    | Dị hợp tử | Không có đột biến |
| Số lượng         | 5                              | 9         | 8                 |
| Tỷ lệ (% , n=22) | 22,7                           | 40,9      | 36,4              |

Dòng tế bào ối bị đột biến sẽ được kiểm tra lại bằng kỹ thuật giải trình tự gen trực tiếp. Các kết quả giải trình tự gen sẽ được so sánh với kết quả đột biến của bố mẹ (Hình 3.2).

**Hình 3.2. Kết quả giải trình tự gen exon 9 phát hiện đột biến c.851\_854del4 (Mut 1)**

Đột biến mất đoạn 4 bp GTAT không thay đổi bộ ba CGA mã hóa axit amin Arg tại vị trí 284 và tạo mã kết thúc sớm TAG cách vị trí axit amin bị đột biến 3 axit amin; a. Mẫu đối chứng thường; b. DNA từ dòng tế bào ối bị đột biến dị hợp tử mut 1; c, d: DNA từ máu ngoại vi của người bố và người mẹ bị đột biến dị hợp tử mut 1.

### 3.2. Kết quả chẩn đoán trước sinh của 22 thai phụ có tiền sử sinh con mắc bệnh thiếu hụt Citrin

Kết quả chẩn đoán trước sinh đã phát hiện 5 thai bị bệnh, 8 thai mang gen bệnh và 9 thai bình thường (Bảng 3.2).

**Bảng 3.2. Kiểu gen của 22 thai nhi CDTS**

| MSBN         | Thể đột biến      | Kiểu gen của thai nhi | Kết luận                     |
|--------------|-------------------|-----------------------|------------------------------|
| AFCT130301   | Đồng hợp tử       | I/I                   | Thai nhi bị bệnh             |
| AFCT121103   | Đồng hợp tử       | I/I                   | Thai nhi bị bệnh             |
| PAFCT140406* | Dị hợp tử         | I/N                   | Thai nhi mang gen bệnh       |
| AFCT150407   | Không bị đột biến | N/N                   | Thai nhi không mang gen bệnh |
| AFCT1150611  | Dị hợp tử         | I/N                   | Thai nhi mang gen bệnh       |
| AFCT150905   | Dị hợp tử         | I/N                   | Thai nhi mang gen bệnh       |
| AFCT151010   | Dị hợp tử         | I/N                   | Thai nhi mang gen bệnh       |
| AFCT160701*  | Dị hợp tử         | I/N                   | Thai nhi mang gen bệnh       |
| AFCT170201   | Không bị đột biến | N/N                   | Thai nhi không mang gen bệnh |
| AFCT170407   | Đồng hợp tử       | I/I                   | Thai nhi bị bệnh             |
| AFCT170802   | Dị hợp tử         | I/N                   | Thai nhi mang gen bệnh       |
| AFCT170104   | Dị hợp tử         | I/N                   | Thai nhi mang gen bệnh       |
| AFCT180204   | Đồng hợp tử       | I/I                   | Thai nhi bị bệnh             |
| AFCT180303   | Dị hợp tử         | XIX/N                 | Thai nhi mang gen bệnh       |
| AFCT180805   | Không bị đột biến | N/N                   | Thai nhi không mang gen bệnh |
| AFCT180808   | Không bị đột biến | N/N                   | Thai nhi không mang gen bệnh |
| AFCT190706*  | Không bị đột biến | N/N                   | Thai nhi không mang gen bệnh |
| PAFCT190202  | Không bị đột biến | N/N                   | Thai nhi không mang gen bệnh |
| AFCT190204   | Không bị đột biến | N/N                   | Thai nhi không mang gen bệnh |
| AFCT200102   | Không bị đột biến | N/N                   | Thai nhi không mang gen bệnh |
| AFCT200204   | Không bị đột biến | N/N                   | Thai nhi không mang gen bệnh |
| AFCT200503*  | Đồng hợp tử       | I/I                   | Thai nhi bị bệnh             |

**Chú thích:** N (normal, không bị đột biến); MSBN (mã số bệnh nhân)

\*: sản phụ có con đầu đã tử vong

#### IV. BÀN LUẬN

Khoảng 100 đột biến khác nhau đã được tìm thấy trên gen SLC25A13 [<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/search.php>] song 4 đột biến I, III, X, XIX là những đột biến thường gặp ở Đông Á [6, 4] cũng như ở người Việt Nam, đặc biệt là đột biến I có tỷ lệ đột biến lên đến 20% [1]. Do vậy, phần lớn các thai phụ tham gia chẩn đoán trước

sinh đều có tiền sử sinh con có đột biến đồng hợp tử đột biến I, duy nhất có một thai phụ có tiền sử sinh con bị dị hợp tử kép đột biến I và XIX.

NICCD thường không gây hậu quả nghiêm trọng vì các triệu chứng của NICCD thường biến mất khi trẻ 1 tuổi, nên một số ý kiến cho rằng thiếu hụt Citrin không cần thiết chẩn đoán trước sinh. Tuy nhiên, một số

ca NICCD có thể có rối loạn chức năng gan nghiêm trọng, hoặc chuyển sang thể nặng hơn là CTLN2, với đặc điểm khởi phát muộn, và hôn mê não do nhiễm độc aminac máu [6]. Trong số 22 bệnh nhân mắc bệnh thiếu hụt Citrin của các gia đình tham gia làm chẩn đoán trước sinh, 4 bệnh nhân đã tử vong và đây chính là bằng chứng trái ngược với kết luận cho rằng NICCD có thể tự thích nghi [5, 6, 8] và có thể cũng là nguyên nhân khiến bố mẹ bệnh nhân đưa ra quyết định làm chẩn đoán trước sinh cho dù y vẫn cho rằng hầu hết các trường hợp mắc bệnh đều cải thiện rõ rệt sau khi điều trị và bước vào giai đoạn thích nghi từ 6 tháng đến 1 tuổi. Bốn trường hợp bị thiếu hụt Citrin đều tử vong dưới 6 tháng hoặc 1 tuổi, thậm chí bệnh nhân của gia đình AFCT160701\* tử vong khi mới ngoài 1 tháng. Rõ ràng, giai đoạn dưới 6 tháng tuổi của trẻ rất quan trọng trong việc chẩn đoán xác định bệnh và điều trị kịp thời, hay nói cách khác nếu dưới 6 tháng trẻ được chẩn đoán và điều trị, chất lượng sống của trẻ có thể được cải thiện rõ rệt. Điều này hoàn toàn phù hợp với công bố trước đó cho rằng, giai đoạn từ 6 tháng đến 1 tuổi là thời gian tự thích nghi của cơ thể [8, 2]. Ngược lại, nếu không được chẩn đoán bệnh và điều trị kịp thời, bệnh nhân NICCD có thể chuyển sang thể CTLN2 và có thể sẽ tử vong do các biến chứng của bệnh [8].

Ngày nay, sự phát triển của khoa học kỹ thuật đã góp phần hiệu quả trong kiểm soát bệnh tật. Các xét nghiệm sàng lọc và chẩn đoán sớm chẳng hạn như NIPT (noninvasive prenatal testing), PGS hay PGD (Preimplantation genetic screening/ Preimplantation genetic diagnosis) [3] đã làm giảm tỷ lệ sinh con bất thường nhưng vẫn không thể thiếu các xét nghiệm chẩn đoán trước sinh, đặc biệt là với các bệnh di truyền.

Các bệnh di truyền có bệnh cảnh lâm sàng nặng sẽ có khuyến cáo bắt buộc làm chẩn đoán trước sinh cho các lần sinh sau, và nếu thai nhi được chẩn đoán có nguy cơ bị bệnh, hầu hết các sản phụ sẽ chấm dứt thai kì để tránh sinh con bị bệnh [8]. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, nhất là các bệnh lý có lâm sàng nhẹ và có thể điều trị hiệu quả như bệnh thiếu hụt Citrin, gia đình sản phụ sẽ có nhiều lựa chọn. Vì thế, chẩn đoán trước sinh cũng chính là một cách để giúp quản lý thai sản và quản lý sơ sinh hiệu quả hơn. Chẩn đoán phân tử đối với bệnh di truyền đơn gen ngày càng được sử dụng rộng rãi để giảm tỷ lệ kết quả sai đến mức tối thiểu và cặp vợ chồng đã có con bị bệnh di truyền lặn trên NST thường được xác định là có nguy cơ sinh con bị bệnh sẽ có chỉ định chẩn đoán trước sinh. Bố mẹ và thai nhi được chẩn đoán đột biến đã biết trên trẻ bị bệnh của gia đình bằng kỹ thuật PCR/PCR-RFLP và kiểm tra lại bằng giải trình tự gen trực tiếp. Do vậy, nghiên cứu phát hiện đột biến gen SLC25A13 là bước tiếp cận có giá trị trong nghiên cứu dịch tễ phân tử của bệnh thiếu hụt Citrin nhằm phát hiện sớm thai nhi bị bệnh cũng như người mắc bệnh để điều trị dự phòng. Đồng thời đây cũng phương pháp duy nhất trong xác định người mang gen bệnh, là cơ sở quan trọng trong tư vấn di truyền tiền hôn nhân.

## V. KẾT LUẬN

Chẩn đoán trước sinh bệnh thiếu hụt Citrin cho các gia đình có tiền sử sinh con bị bệnh và các cặp bố mẹ mang gen bệnh là một lựa chọn. Chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật sinh học phân tử mang lại kết quả đáng tin cậy, góp phần quan trọng trong kiểm soát bệnh tật di truyền, quản lý thai sản và giảm tỷ lệ sinh con mắc bệnh qua đó nâng cao chất lượng sống của cộng đồng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nguyễn Thị Mai Hương, Nguyễn Thị Phương Mai, Nguyễn Phạm Anh Hoa và cộng sự (2012).** Đột biến gen SLC25A13 gây bệnh thiếu hụt citrin trên người Việt Nam. Tạp chí Nghiên cứu Y học. Tập 81, Số 1, tr. 19 – 24.
2. **Joel M. Andres, Allah B. Haafiz (2012).** Gastroenterology and Nutrition: Neonatology Questions and Controversies (Second Edition). Chapter 18 - Neonatal Cholestasis, Pages 251-291. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2603-9.00018-1>.
3. **Kimelman D, Confino R, Confino E, Shulman LP, Zhang JX, Pavone ME (2018).** Do patients who achieve pregnancy using IVF-PGS do the recommended genetic diagnostic testing in pregnancy?. J Assist Reprod Genet. 35(10):1881-1885. doi:10.1007/s10815-018-1289-z Rabinovich S, Silberman A, Adler L, et al. The mitochondrial carrier Citrin plays a role in regulating cellular energy during carcinogenesis. Oncogene. 2020;39(1):164-175.
4. **Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, et al (1999).** The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. Nat Genet. 22: 159–63.
5. **Lu YB, Kobayashi K, Ushikai M. et al (2005).** Frequency and distribution in East Asia of 12 mutations identified in the SLC25A13 gene of Japanese patients with Citrin deficiency. Hum Genet. 50: 338-346.
6. **Saheki T, Kobayashi K, Iijima M, et al. (2004).** Adult-onset type II citrullinemia and idiopathic neonatal hepatitis caused by citrin deficiency: involvement of the aspartate glutamate carrier for urea synthesis and maintenance of the urea cycle. Mol Genet Metab. 2004;81 Suppl 1:S20-S26. doi:10.1016/j.ymgme.2004.01.006.
7. **Song YZ, Li BX, Chen FP, Liu SR et al (2009).** Neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: Clinical and laboratory investigation of 13 subjects in mainland of China. Digestive and Liver disease. 41: 683-689.
8. **Xin-Jing Zhao, Xiao-Mei Tang, Xiao-Min Xiao và cộng sự (2011).** Prenatal diagnosis of Citrin deficiency in a Chinese family with a fatal proband. Tohoku J Exp Med. 225, 273-276.

## Kiểu hình và kết quả điều trị BỆNH ACID PROPIONIC NIỆU THỂ MUỘN

Nguyễn Ngọc Khánh\*, Vũ Chí Dũng\*

### TÓM TẮT

Bệnh acid propionic niệu (PA) là bệnh rối loạn chuyển hoá di truyền acid hữu cơ liên quan đến chuyển hoá acid amin isoleucine, valine, threonine và methionine. Mục tiêu: i/ Mô tả kiểu hình của bệnh PA thể muộn; ii/ Đánh giá kết quả điều trị bệnh PA thể muộn. Đối tượng – phương pháp: Nghiên cứu hồi cứu, tiến cứu một loạt ca bệnh; phân tích đánh giá trước và sau điều trị 16 bệnh nhân PA thể muộn từ 2005 đến 2019. Kết quả: Tuổi khởi phát bệnh từ 2 tháng đến 4 tuổi (trung vị: 6 tháng tuổi). 81,2% bệnh nhân phát triển bình thường cho tới đợt cấp vào viện. Tất cả bệnh nhân có biểu hiện đợt cấp khi được chẩn đoán. Đặc điểm nổi bật của đợt cấp là các triệu chứng thần kinh: 75% tăng/giảm trương lực cơ và 43,8 % li bì/hôn mê, sau yếu tố khởi phát nôn (43,8%), sốt (31,5%). Đặc điểm xét nghiệm trong cơn cấp: toan chuyển hoá (62,5%), tăng lactat (56,3%), tăng ammoniac máu (43,8%), xe ton niệu (43,8%), giảm bạch cầu/tiểu cầu (25%). Kết quả điều trị: 5 bệnh nhân tử vong trong cơn cấp lần đầu, 5 bệnh nhân tử vong trong cơn cấp tái phát và biến chứng suy tim, 3 bệnh nhân chậm phát triển tâm thần vận động mức độ nhẹ, 3 bệnh nhân phát triển bình thường (tuổi còn sống 2 – 11 tuổi). Tần suất tái phát cơn cấp 1,8 lần/năm (1 – 7 lần/năm). Kết luận: Bệnh PA thể muộn xuất hiện ở mọi lứa tuổi với triệu chứng các đợt cấp.

Bệnh có nhiều cơn cấp tái phát và tiên lượng nặng.

**Từ khóa:** bệnh acid Propionic máu, acid propionic niệu.

### SUMMARY

#### LATE ONSET PROPIONIC ACIDURIA: PHENOTYPES AND OUTCOMES

Propionic aciduria (PA) is an organic aciduria involving metabolic pathways of isoleucine, valine, threonine và methionine. Objectives: i/ to describe phenotypes of late onset PA; ii/ to evaluate outcomes of late onset PA. Objects & Methods: Case series study including of 16 patients with late onset PA since 2005 to 2019. Results: Age of onset was from 2 months to 4 years old (median: 4 years). 81.2% patients had presented normal development before the 1st acute crisis. All of them presented with acute crisis on the 1st admission. Characteristics of acute crisis were neurological symptoms including hypotonia/hypertonia (75%), lethargy/coma (43.8%) after the triggers vomiting (43.8%), fever (31.5%), cough (25%). Characteristics of routine investigations were metabolic acidosis (62.5%), hyperlactatemia (56.3%), hyperammonemia (43.8%), ketonuria (43.8%), pancytopenia (25%). Poor outcomes revealed 31.2% motarility on the 1st admission and 31.2 % motarility on the recurrent crisis; 37.5% alive but 50% of them presented mild development delay, the rest were normal development (2 – 11 years old). Recurent crisis rate was 1.8 time/year (1 – 7 times/year). Conclusions: Late onset PA often presented

\*Bệnh viện Nhi Trung ương

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Ngọc Khánh

Email: khanhnn@nhp.org.vn

Ngày nhận bài: 3.10.2020

Ngày phản biện khoa học: 21.10.2020

Ngày duyệt bài: 20.11.2020

with acute crisis at any age. The disease had poor prognosis and a lot of recurrent crisis.

**Keywords:** Propionic academia, propionic aciduria.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh acid propionic niệu (Propionic Aciduria: PA) là một bệnh rối loạn chuyển hóa bẩm sinh (RLCHBS). Đây là bệnh lý di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường do đột biến gen PCCA nằm trên nhánh dài nhiễm sắc thể số 13 (13q22) và đột biến gen PCCB trên nhánh dài nhiễm sắc thể số 3 (3q22) mã hóa cho enzym propionyl-CoA carboxylase (PCC) [1]. PCC xúc tác cho quá trình chuyển hóa của các acid amin isoleucine, valine, threonine và methionine. Bệnh lần đầu tiên được mô tả năm 1961 bởi Childs và cộng sự. Tỷ lệ mắc ở các nước Châu Âu 1: 500.000 - 1:50.000 trẻ sinh sống, ở Nhật 1:41.000, ở Hàn Quốc: 1:313.000 [1]. Biểu hiện lâm sàng của bệnh acid propionic niệu khác nhau tùy thuộc vào tuổi xuất hiện triệu chứng. Thời gian xuất hiện bệnh phụ thuộc vào nhiều yếu tố trong đó có hoạt độ enzym còn lại, mức độ tiêu thụ protein và các yếu tố kích thích như stress, nhiễm trùng. Thể xuất hiện sớm - giai đoạn sơ sinh là dạng phổ biến nhất với các biểu hiện như bú kém, nôn nhiều ở những ngày đầu, sau đó li bì, co giật, hôn mê và tử vong. Thể xuất hiện muộn - sau giai đoạn sơ sinh thường biểu hiện bằng các triệu chứng của chậm phát triển tâm thần, nôn mạn tính, không hấp thụ protein, chậm phát triển, giảm trương lực cơ và tổn thương thận nhưng hiếm gặp. Bệnh lý cơ tim là biến chứng thường gặp nhất, đôi khi chỉ xuất hiện đơn độc không đi cùng triệu chứng khác của bệnh. Các biến chứng thần kinh bao gồm co giật, dấu hiệu ngoại tháp, teo não, và các biến chứng mạn tính như khiếm thính, liệt

nửa người và kích động[1].

Tại Việt Nam, bệnh acid propionic niệu là bệnh RLCH axit hữu cơ hay gặp. Từ 2005 đến 2019, có 30 bệnh nhân được chẩn đoán và điều trị bệnh PA tại Bệnh viện Nhi Trung Ương. Cho tới nay chưa có nghiên cứu nào tại Việt Nam về bệnh acid propionic niệu thể muộn. Để giúp các bác sĩ tiếp cận chẩn đoán, xử trí kịp thời và tiên lượng bệnh nhân mắc bệnh acid propionic niệu thể muộn, chúng tôi tiến hành nghiên cứu với 2 mục tiêu sau:

1. *Mô tả kiểu hình của bệnh acid propionic niệu thể muộn.*

2. *Nhận xét kết quả điều trị bệnh acid propionic thể muộn*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng nghiên cứu

16 bệnh nhân acid propionic niệu thể muộn được chẩn đoán và điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung Ương từ năm 2005 đến 2019.

Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân nghiên cứu

- Lâm sàng: trẻ bú mẹ hoặc trẻ nhỏ có nhiều đợt nôn, li bì, hôn mê hoặc chậm phát triển tâm thần vận động không rõ nguyên nhân, rối loạn trương lực cơ. Tiền sử gia đình: anh chị em ruột bị bệnh RLCHBS acid propionic niệu hoặc bệnh RLCHBS khác. Có anh chị em ruột tử vong đột ngột không rõ nguyên nhân.

- Định lượng acid hữu cơ niệu (GC/MS): tăng 3-OH-propionic, methylcitric, propioglycin và/hoặc tăng C3, giảm C0 trong xét nghiệm sắc ký phổ khối đôi (MS/MS).

### 2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu một loạt ca bệnh bao gồm mô tả hồi cứu và tiến cứu tại Bệnh viện Nhi Trung ương từ 2005 – 2019 với phương pháp chọn mẫu thuận tiện.

Các biến số nghiên cứu:

Kiểu hình: khai thác bệnh sử, tiền sử, phá hệ di truyền và các biểu hiện lâm sàng, xét nghiệm cơ bản, xét nghiệm đặc hiệu bằng bộ câu hỏi có sẵn.

Kết quả điều trị: còn sống/tử vong sau con cấp, phát triển tâm thần vận động sau con cấp.

Xử lý số liệu: theo thuật toán thống kê y học bằng phần mềm SPSS16.0.

### 3. Đạo đức trong nghiên cứu

Các xét nghiệm máu, nước tiểu và chẩn đoán hình ảnh là cần thiết để chẩn đoán bệnh và điều trị, an toàn cho bệnh nhân.

Phác đồ điều trị của Bệnh viện Nhi Trung ương.

Nghiên cứu được chấp thuận bởi hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh của Bệnh viện Nhi Trung Ương.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

16 bệnh nhân từ 15 gia đình không kết hôn cận huyết thống được chẩn đoán bệnh PA từ 2005 – 2019.

### 1. Đặc điểm lâm sàng của bệnh PA thể muộn

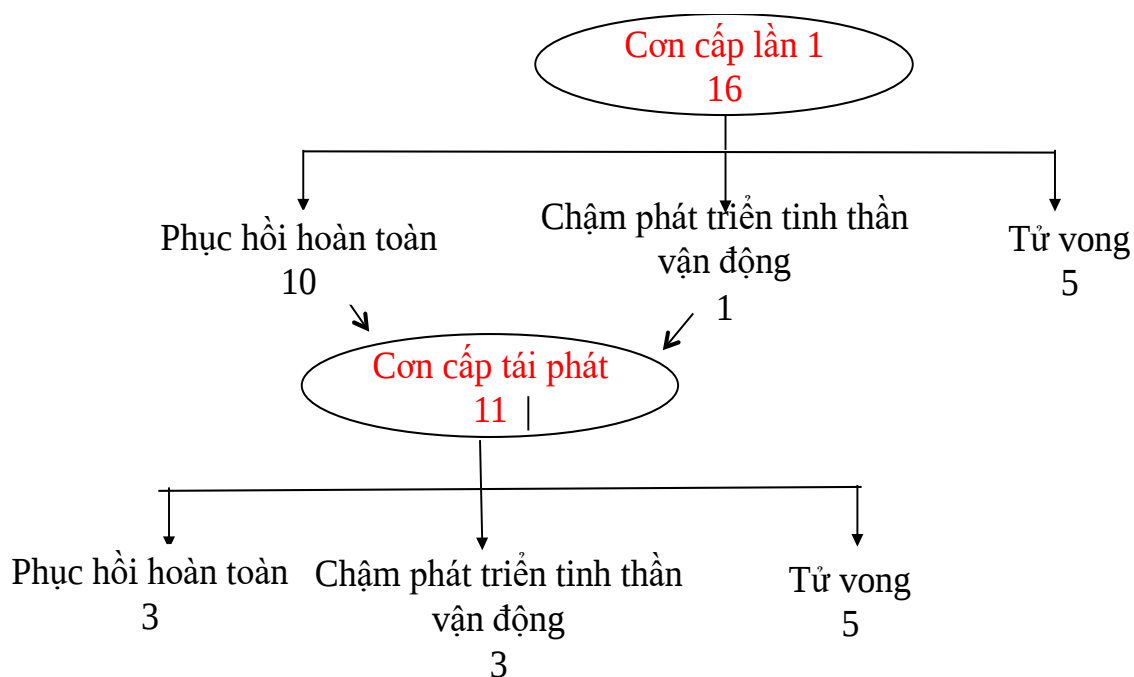
| STT                              | Đặc điểm chung                              | n = 16                                |      |
|----------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|------|
| 1                                | Tuổi xuất hiện triệu chứng                  | 2 tháng – 4 tuổi<br>trung vị: 6 tháng |      |
| 2                                | Tiền sử gia đình                            | 3/15                                  |      |
| 3                                | Bố mẹ kết hôn cận huyết thống               | 0/15                                  |      |
| 4                                | Nam/nữ                                      | 5/11                                  |      |
| 5                                | Tiền sử chậm phát triển tâm thần – vận động | 1/16                                  |      |
| 6                                | Tiền sử nôn chu kỳ                          | 2/16                                  |      |
| Biểu hiện lâm sàng lúc nhập viện |                                             | n = 16                                | %    |
| 1                                | Tăng/giảm trương lực cơ                     | 12                                    | 75   |
| 2                                | Mất nước                                    | 10                                    | 62,5 |
| 3                                | Nôn                                         | 7                                     | 43,8 |
| 4                                | Li bì/hôn mê                                | 7                                     | 43,8 |
| 5                                | Sốt                                         | 5                                     | 31,3 |
| 6                                | Ho, khò khè                                 | 4                                     | 25   |
| 7                                | Co giật                                     | 3                                     | 18,8 |
| 8                                | Suy hô hấp                                  | 3                                     | 18,8 |
| 9                                | Bú kém, bỏ bú                               | 2                                     | 12,5 |
| 10                               | Suy tuần hoàn                               | 1                                     | 6,3  |
| 11                               | Gan to                                      | 2                                     | 12,5 |

**Nhận xét:** Tuổi khởi phát bệnh PA thể muộn ở mọi lứa tuổi từ 2 tháng đến 4 tuổi (trung vị: 6 tháng tuổi). Đa số bệnh nhân phát triển bình thường (81,2%) cho tới đợt cấp vào viện. Hầu hết bệnh nhân vào viện có các triệu chứng thần kinh: 75% tăng/giảm trương lực cơ và 43,8 % li bì/hôn mê, 43,5% nôn và 62,5% mất nước.

**Bảng 2: Đặc điểm sinh hóa và huyết học của acid propionic niệu thể muộn**

| Xét nghiệm thường quy lúc nhập viện |                                               | Tỷ lệ và các giá trị              |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|
| 1                                   | Toan chuyển hoá tăng khoảng trống anion<br>pH | 10/16 (62,5%)<br>(7,02 - 7,24)    |
| 2                                   | Tăng lactat<br>(mmol/l)                       | 9/16 (56,2%)<br>(4,5 ± 2,1)       |
| 3                                   | Tăng ammoniac máu<br>( $\mu$ mol/l)           | 7/16 (43,8%)<br>(261,23 ± 236,26) |
| 4                                   | Xeton niệu (+)                                | 7/16 (43,8%)                      |
| 5                                   | Tăng glucose máu<br>(mmol/l)                  | 3/16 (18,8%)<br>(14 - 16)         |
| 6                                   | Tăng transaminase                             | 6/16 (37,5%)                      |
| 7                                   | Hạ Natri máu                                  | 4/16 (25%)                        |
| 8                                   | Giảm bạch cầu                                 | 4/16 (25%)                        |
| 9                                   | Giảm tiểu cầu                                 | 4/16 (25%)                        |
| 10                                  | Thiếu máu nhẹ                                 | 6/16 (37,5%)                      |

**Nhận xét:** Toan chuyển hoá tăng khoảng trống anion hay gặp nhất trong cơn cấp (62,5%). Giảm tiểu cầu và bạch cầu gặp ở 25% bệnh nhân trong cơn cấp.



**Sơ đồ 1. Kết quả điều trị bệnh PA thể muộn**

Tuổi tử vong trung bình của 5 bệnh nhân tử vong đợt cấp đầu tiên là  $21,5 \pm 12,6$  tháng (2 – 38 tháng).

Tuổi tử vong của 5 bệnh nhân tử vong trong các đợt cấp tái phát là 4 tháng – 11 tuổi (trung vị: 5 tuổi). 4/5 bệnh nhân tử vong trong đợt cấp do shock chuyển hoá dẫn tới suy đa tạng và 1 bệnh nhân tử vong do suy tim và cơ tim giãn.

3 bệnh nhân phục hồi hoàn toàn có tuổi tương ứng đến thời điểm nghiên cứu là 3, 4, 11 tuổi.

3 bệnh nhân có chậm phát triển tâm thần nhẹ (65%) có tuổi tương ứng là 2, 5, 7 tuổi.

Tỉ lệ sống sau 1 năm điều trị là 70%, sau 5 năm điều trị: 40%.

Tần suất tái phát: 1 – 7 lần/năm (trung vị: 1,8 lần/năm).

#### IV. BÀN LUẬN

##### 1. Đặc điểm kiểu hình của bệnh nhân acid propionic niệu

Trong 15 năm từ 2005 – 2019, có 30 bệnh nhân được chẩn đoán PA tại Bệnh viện Nhi Trung Ương. Trong đó có 16 bệnh nhân là thể muộn sau 1 tháng chiếm 53%. Tỉ lệ gặp thể muộn trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với nghiên cứu của Lehnert và cộng sự (8% bệnh nhân có biểu hiện trong giai đoạn sau sơ sinh).

Tuổi khởi phát bệnh của PA muộn từ 2 tháng đến 4 tuổi, với tuổi thường gặp trung vị là 6 tháng. Tuổi xuất hiện cơn cấp đầu tiên phù hợp với cơ chế bệnh sinh và sinh lý chuyển hoá của cơ thể. Thứ nhất, giai đoạn sau 6 tháng tuổi là giai đoạn kháng thể của mẹ truyền sang cho con bắt đầu giảm sút dẫn tới trẻ rất dễ bị nhiễm khuẩn. Và đây là nguyên nhân chính gây khởi phát cơn cấp. Do khi nhiễm khuẩn nhu cầu năng lượng tăng lên 150% đến 200% so với nhu cầu bình

thường. Trong khi đó, năng lượng cung cấp từ ăn uống lại giảm sút do trẻ biếng ăn và nôn trớ. Và khi đó cơ thể sẽ sử dụng năng lượng dự trữ từ lipid và protein dẫn tới ứ đọng các chất chuyển hoá trung gian gây độc.

Hầu hết các bệnh nhân không có triệu chứng lâm sàng trước đợt cấp nhập viện lần đầu chiếm 81,2 % và chỉ có 3/15 (20%) gia đình có tiền sử có anh/chị em ruột của bệnh nhân tử vong hoặc mắc bệnh tương tự. Có một bệnh nhân có tiền sử chậm phát triển tâm thần vận động từ lúc 6 tháng tuổi tới tận lúc 18 tháng mới được chẩn đoán bệnh khi xuất hiện cơn cấp mất bù. Hai bệnh nhân có tiền sử nôn chu kỳ từ lúc 6 và 8 tháng tuổi nhưng tới tận 36 tháng và 38 tháng mới được chẩn đoán bệnh khi xuất hiện cơn cấp. Chính vì vậy, xét nghiệm sàng lọc rối loạn chuyển hoá bẩm sinh được chỉ định đối với tất cả các trường hợp chậm phát triển tâm thần – vận động không rõ nguyên nhân hoặc nôn chu kỳ [1], [2].

Đây là bệnh di truyền lặn nhiễm sắc thể thường và tất cả 15 gia đình không có quan hệ huyết thống khẳng định tần suất mắc bệnh PA ở Việt Nam không bị ảnh hưởng bởi kết hôn cận huyết. Tỉ lệ mắc bệnh của nữ cao hơn nam (11:5) mặc dù đây là bệnh di truyền lặn nhiễm sắc thể thường khả năng mắc bệnh ở nam và nữ như nhau.

Tất cả 16 bệnh nhân đều được chẩn đoán bệnh trong đợt cấp mất bù. Đặc điểm của đợt cấp: 10/16 bệnh nhân có triệu chứng của thần kinh, 7/16 bệnh nhân có rối loạn ý thức, 3/16 bệnh nhân có co giật. Vì vậy 10/16 bệnh nhân được chẩn đoán sơ bộ hội chứng não cấp khi vào viện. 4/16 (25%) bệnh nhân nhập viện lần đầu trong bệnh cảnh nặng (suy hô hấp và suy tuần hoàn) đòi hỏi thở máy và thuốc vận mạch. Chính vì vậy các bệnh nhân

đều nhập viện tại các khoa cấp cứu, khoa thần kinh và khoa truyền nhiễm.

Tình trạng nhiễm trùng hô hấp và rối loạn tiêu hoá tiêu hoá gặp ở 25% và 43,8% là một trong các nguyên nhân khởi phát bệnh. Đây cũng là nguyên nhân khởi phát cơn cấp của bệnh nhân PA trong các nghiên cứu khác [2], [3].

Biến đổi bất thường nổi bật trong các xét nghiệm cơ bản ban đầu là toan chuyển hoá tăng khoảng trống anion (62,5%), tăng lactat (56,2%), tăng ammoniac máu (43,8%), xe ton niệu (43,8%). Mức độ tăng ammoniac máu của 7 bệnh nhân trong nghiên cứu là  $261,23 \pm 236,26 \mu\text{mol/l}$ , là mức độ chưa có chỉ định lọc máu. Nồng độ ammoniac máu của các bệnh nhân này giảm dần sau khi được truyền glucose tốc độ cao (8 – 10 mg/kg/phút), L carnitine (100mg/kg/ngày), Vitamin B12 (1mg/ngày), Biotin (10mg/ngày), Natribenzoat (500 mg/kg/ngày) [4]. Tuy nhiên có 2 bệnh nhân nôn chu kỳ và 1 bệnh nhân chậm phát triển tâm thần vận động thì không thấy có bất thường trong các xét nghiệm cơ bản. Chính vì vậy, xét nghiệm đặc hiệu sắc ký phổ khối đôi (MS/MS) và định lượng acid hữu cơ niệu vẫn cần chỉ định cho các bệnh nhân nghi ngờ RLCHBS ngay cả khi không có biến đổi trong các xét nghiệm cơ bản.

Ngoài ra, có 37,5 % bệnh nhân có thiếu máu, 25% bệnh nhân có giảm bạch cầu và tiểu cầu. Đây là những biến đổi đặc hiệu gặp trong 3 bệnh RLCHBS acid hữu cơ PA, acid methylmalonic máu, acid isovaleric máu. Đây là một trong những yếu tố tiên lượng nặng của bệnh nhân PA vì nguy cơ gây nhiễm trùng thứ phát trong bệnh viện. Giảm bạch cầu và tiểu cầu cũng được mô tả trong nghiên cứu của Grunert là 11% [4]. Các tác giả trên thế giới cũng nhận thấy bệnh nhân

PA dễ bị nhiễm trùng tái phát do tình trạng suy giảm miễn dịch, thiếu máu, giảm bạch cầu, tiểu cầu ở những bệnh nhân PA [5].

Tăng glucose máu gặp ở 3 bệnh nhân, không có bệnh nhân nào hạ glucose máu. Đây là một trong những nguyên nhân khiến bác sĩ lâm sàng cân nhắc loại trừ chẩn đoán nhiễm toan xe ton đái đường ở những bệnh nhân này [6]. Tuy nhiên tăng glucose máu của bệnh nhân nhanh chóng giảm kể cả khi chưa điều trị insulin. Gan to gặp ở 2 bệnh nhân PA muộn chiếm 12,5% là do sự lắng đọng chất chuyển hóa, chính vì vậy gan to thường gặp trên nhóm bệnh nhân ở độ tuổi sau 1 tháng là phù hợp với thực tế.

Dựa trên các phân tích kiểu hình trên, nếu bệnh nhân vào trong tình trạng cấp của hội chứng não cấp, thở nhanh và nhiễm toan chuyển hóa tăng khoảng trống anion, tăng lactat, tăng amoniac và có giảm bạch cầu và tiểu cầu thì các bác sĩ lâm sàng nên cho làm xét nghiệm đặc hiệu chẩn đoán bệnh acid hữu cơ niệu.

## **2. Kết quả điều trị của bệnh nhân PA thể muộn**

Kết quả điều trị lâu dài của bệnh nhân PA thể muộn của chúng tôi không khả quan mặc dù cứu sống được 68,8% (11/16) bệnh nhân qua cơn cấp nhập viện lần đầu. Nhưng có tới 5/11 (45,4%) bệnh nhân đã tử vong trong các đợt cấp tái phát và biến chứng giãn cơ tim của bệnh với tuổi tử vong trung vị 5 tuổi (4 tháng – 11 tuổi); 3/6 bệnh nhân còn sống có chậm phát triển tâm thần vận động nhẹ với DQ 65%. Tần suất tái phát các cơn cao với trung vị là 1,8 lần/năm.

Kết quả điều trị của chúng tôi phù hợp với 47 trẻ bị axit propionic niệu của Pérez-Cerdal và cộng sự có 21 trẻ tử vong chiếm 57%, độ tuổi trung bình sống ở nhóm PA sớm là 6,6 tuổi (15 tháng -15,5 tuổi), thể PA

muộn là 12,6 tuổi (2,5-25 tuổi) [7]. Kết quả theo dõi lâu dài của chúng tôi tương tự nghiên cứu của Grunert chỉ có 9% bệnh nhân ở thời điểm nghiên cứu có nhận thức bình thường, 15,5% bệnh nhân có chậm phát triển tâm thần vận động nhẹ với IQ thấp từ 70-84 điểm, và còn lại 75,5% bệnh nhân có thiếu năng trí tuệ IQ rất thấp dưới 70 điểm [4].

Tuy nhiên biến chứng tim mạch chúng tôi chỉ gặp ở 1/16 bệnh nhân, trong khi đó nhiều nghiên cứu thấy tỉ lệ biến chứng tim mạch cao: 39% có suy chức năng tâm thu thất trái, 61% suy chức năng tâm trương thất trái và cơ tim giãn [8].

## V. KẾT LUẬN

16 bệnh nhân PA thể muộn trong 15 năm có tuổi khởi phát bệnh từ 2 tháng đến 4 tuổi với biểu hiện của các đợt cấp và không có triệu chứng giữa các đợt. Đặc điểm của cơn cấp là các triệu chứng thần kinh: tăng/giảm trương lực cơ và li bì/hôn mê xuất hiện sau yếu tố khởi phát nôn, sốt. Các bất thường hóa sinh và huyết học gồm toan chuyển hoá, tăng lactat máu, tăng ammoniac máu, xe ton niệu; giảm bạch cầu/tiểu cầu (25%). Kết quả điều trị ít khả quan vì tỷ lệ tử vong và di chứng còn cao. Cần triển khai có hệ thống sàng lọc sơ sinh mở rộng các RLCHBS để phát hiện sớm và điều trị kịp thời nhằm giảm tỷ lệ tử vong và di chứng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Haijes, H. A., et al. 2019. Pathophysiology of propionic and methylmalonic acidemias. Part 1: Complications. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 42(5), 730–744.
2. Dionisi-Vici, C., et al. 2006. “Classical” organic acidurias, propionic aciduria, methylmalonic aciduria and isovaleric aciduria: long-term outcome and effects of expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29(2–3), 383–389.
3. Kör, D., Şeker-Yılmaz, B., et al. 2019. Clinical features of 27 Turkish Propionic acidemia patients with 12 novel mutations. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 61(3), 330–336.
4. Grünert, S. C., et al. 2013. Propionic acidemia: clinical course and outcome in 55 pediatric and adolescent patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8, 6.
5. Pena, L., & Burton, B. K. 2012. Survey of health status and complications among propionic acidemia patients. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 158A(7), 1641–1646.
6. Alfadhel, M., & Babiker, A. 2018. Inborn errors of metabolism associated with hyperglycaemic ketoacidosis and diabetes mellitus: narrative review. *Sudanese Journal of Paediatrics*, 18(1), 10–23.
7. Pérez-Cerdá, C., et al. 2000. Potential relationship between genotype and clinical outcome in propionic acidemia patients. *European journal of human genetics: EJHG*, 8(3), 187–194.
8. Kovacevic, A., et al. 2020. Cardiac phenotype in propionic acidemia - Results of an observational monocentric study. *Molecular Genetics and Metabolism*.

## DI TRUYỀN PHÂN TỬ TRONG TĂNG LIPID MÁU TIỀN PHÁT TẠI BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG

Đỗ Thị Thanh Mai\*, Vũ Chí Dũng\*

### TÓM TẮT

Tăng lipid máu tiên phát là một nhóm các bệnh di truyền do rối loạn lipoprotein. Nếu không được điều trị có thể gặp biến chứng tim mạch sớm hoặc viêm tụy cấp. **Mục tiêu:** phát hiện đột biến các gen gây tăng lipid tiên phát và đối chiếu với đặc điểm lâm sàng và hóa sinh. **Đối tượng:** 12 bệnh nhân có tăng triglyceride hoặc tăng cholesterol đã xác định có đột biến gen gây bệnh. **Phương pháp:** Nghiên cứu một loạt ca bệnh bao gồm mô tả các đặc điểm lâm sàng, hóa sinh, biến chứng và phân tích đột biến các gen gây tăng lipid máu tiên phát bằng giải trình tự gen thế hệ mới. **Kết quả:** Trong số 12 bệnh nhân từ 10 gia đình khác nhau có 7 bệnh nhân tăng cholesterol, 5 bệnh nhân tăng triglyceride. Tỷ lệ nam/nữ là 4/8. Tuổi chẩn đoán trung bình là  $5,22 \pm 6,38$  tuổi. Triệu chứng lâm sàng bao gồm: u hạt vàng (5 ca), gan to (2 ca), lách to (1 ca); 4 bệnh nhân không có triệu chứng; biến chứng viêm tụy cấp (3 ca). Nồng độ cholesterol toàn phần trung bình của nhóm tăng cholesterol là  $8,93 \pm 3,94$  mmol/l, nồng độ LDL-cholesterol trung bình của nhóm tăng cholesterol là  $6,48 \pm 2,72$  mmol/l. Nồng độ triglyceride trung bình của nhóm tăng triglyceride là  $16,93 \pm 4,22$  mmol/l. Có 4 bệnh nhân có đột biến gen GPIHBP1; 1 bệnh nhân đột biến dị hợp tử kép gen LPL; 6 bệnh nhân có đột biến gen LDLR; 1 bệnh nhân có đột biến dị hợp

tử kép gen ABCG5. **Kết luận:** tăng lipid máu do đột biến các gen liên quan có triệu chứng lâm sàng nghèo nàn, cần mở rộng phân tích phân tử để có kế hoạch điều trị dự phòng để tránh các biến chứng tim mạch và viêm tụy cấp cũng như tư vấn di truyền phòng bệnh.

**Từ khóa:** tăng lipid máu tiên phát, tăng triglyceride, tăng cholesterol, u hạt vàng, phân tích phân tử.

### SUMMARY

#### MOLECULAR GENETICS OF PRIMARY HYPERLIPIDEMIA IN CHILDRENS

Primary hyperlipidemia is a group of diseases caused by genetic defects involved in the synthesis, transport and metabolism of lipoproteins. Without any intervention, cardiovascular diseases and acute pancreatitis may be occurred. **Objectives:** To identify mutations of genes in primary hyperlipidemia and compare with clinical and biochemical characteristics of primary hyperlipidemia. **Subject:** 12 patients presented with hypercholesterolemia or hypertriglyceridemia and had gene mutations. **Method:** a case series study including mutation analysis using next generation sequencing (familial dyslipidemia panel including 31 genes), clinical symptoms and biochemistry investigation. **Results:** 12 patients from 10 families, 7 cases were hypercholesterolemia (HC) and 5 cases were hypertriglyceridemia (HT). The rate of male/female was 4/8. The mean age at presentation was  $5.22 \pm 6.38$  years old. Clinical manifestations included xanthomas (5 cases),

\*Bệnh viện Nhi Trung Ương

Chịu trách nhiệm chính: Vũ Chí Dũng

Email: dungvu@nch.org.vn

Ngày nhận bài: 1.10.2020

Ngày phản biện khoa học: 10.10.2020

Ngày duyệt bài: 19.11.2020

hepatomegaly (1 case), splenomegaly (2 cases). Acute pancreatitis was reported in 3 patients. Four cases were clinical asymptomatic. 4/12 cases had family history with hypercholesterolemia. Serum total cholesterol levels of HC group was  $8.93 \pm 3.94$  mmol/l, serum LDL- C levels of HC group was  $6.48 \pm 2.72$  mmol/l. Serum triglyceride levels of HT group was  $16.93 \pm 4.22$  mmol/l. 4 cases had mutations in GPIHBP1 gene, 1 case had compound hetegozous in LPL gene, 6 cases had mutation in LDLR gene, 1 case had compound hetegozous in ABCG5 gene. **Conclusions:** Primary hyperlipidemia had poor clinical manifestations. Genome sequencing analysis need to perform for treatment and genetic counseling.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tăng lipid máu tiên phát là bệnh lý rối loạn lipoprotein có nguồn gốc do đột biến gen, các bất thường bao gồm tăng cholesterol, tăng triglyceride hoặc tăng cả hai. Tăng cholesterol máu di truyền đơn gen đặc trưng bởi tăng nồng độ LDL- cholesterol và gây nguy cơ biến chứng tim mạch sớm. Các gen được xác định gây tăng cholesterol máu là LDLR, PCSK9, APOB, STAP1, trong đó đột biến gen LDLR phổ biến nhất, thể dị hợp tử đột biến gen LDLR có thể gặp từ 1/250- 1/200 dân số thế giới [1]. Tăng triglyceride máu tiên phát là nhóm bệnh hiếm gặp, thường là di truyền lặn đặc trưng bởi tăng lipoprotein giàu triglyceride trong hệ thống tuần hoàn có thể gây ra các triệu chứng lâm sàng như u hạt vàng, chậm phát triển thể chất và viêm tụy tái phát. Các gen đã được xác định gây tăng triglyceride nặng là LPL, APOC2, APOA5, APOE, LMF1, GPIHBP [2-5], trong đó đột biến gen LPL chiếm 95% các trường hợp [6]. Để góp phần chẩn đoán bệnh và làm cơ sở cho tư vấn di

truyền thì xét nghiệm gen liên quan và phân tích liên quan giữa biểu hiện bệnh với kiểu gen là rất quan trọng.

Với lý do trên, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm mục đích:

Phát hiện đột biến các gen gây tăng lipid tiên phát và đối chiếu với đặc điểm lâm sàng và hóa sinh.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng gồm 12 bệnh nhân tăng cholesterol hoặc tăng triglyceride đã xác định được đột biến gây bệnh của các gen có liên quan.

Nghiên cứu một loạt ca bệnh bao gồm mô tả các đặc điểm lâm sàng, hóa sinh: định lượng triglyceride, cholesterol toàn phần, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, GOT, GPT, FT4, TSH. Đánh giá biến chứng bằng chẩn đoán hình ảnh (siêu âm tụy, tim mạch; và chụp mạch khi có chỉ định). Phân tích đột biến các gen gây tăng lipid máu tiên phát: DNA được chiết tách từ bạch cầu máu ngoại vi, sử dụng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới để xác định đột biến gây bệnh. Nhóm gen gây tăng lipid máu tiên phát bao gồm 31 gen được phân tích và đối chiếu với dữ liệu từ ngân hàng gen.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Tổng số 12 bệnh nhân từ 10 gia đình khác nhau có 7 bệnh nhân tăng cholesterol, 5 bệnh nhân tăng triglyceride; 8 bệnh nhân nữ, 4 bệnh nhân nam; tuổi chẩn đoán trung bình là  $5,22 \pm 6,38$  tuổi (sớm nhất là 6,5 tháng, muộn nhất là 17,6 tuổi); có 5/12 bệnh nhân có u hạt vàng, 1/12 bệnh nhân biểu hiện gan to, 2/12 bệnh nhân có biểu hiện lách to, 4/12 bệnh nhân không có triệu chứng; 4/12 bệnh nhân có tiền sử gia đình; 3 bệnh nhân tăng triglyceride có biến chứng viêm tụy cấp.

Nhóm tăng cholesterol, nồng độ cholesterol trung bình là  $8,93 \pm 3,94$  mmol/l, nồng độ LDL- cholesterol trung bình là  $6,48 \pm 2,72$  mmol/l, nồng độ triglyceride trung bình là  $1,25 \pm 0,26$  mmol/l. Nhóm tăng triglyceride nồng độ triglyceride trung bình là  $16,93 \pm 4,22$  mmol/l, nồng độ cholesterol toàn phần trung bình là  $4,57 \pm 0,8$  mmol/l. Trong 7

bệnh nhân tăng cholesterol có 6 bệnh nhân có đột biến dị hợp tử gen LDLR, 1 bệnh nhân đột biến dị hợp tử kép trên gen ABCG5. Trong 5 bệnh nhân tăng triglyceride, có 3 bệnh nhân đột biến đồng hợp tử gen GPIHBP1, 1 bệnh nhân đột biến dị hợp tử kép gen GPIHBP1, 1 bệnh nhân đột biến dị hợp tử kép gen LPL.

**Bảng 3.1. Đặc điểm lâm sàng và hóa sinh của nhóm tăng triglyceride**

| Số thứ tự bệnh nhân            | 01                 | 02               | 03       | 04               | 05          |
|--------------------------------|--------------------|------------------|----------|------------------|-------------|
| Tuổi chẩn đoán (tháng)         | 9,8                | 6,5              | 144      | 7                | 1,4         |
| Lý do đi khám                  | Xuất huyết dưới da | Nôn, chướng bụng | Đau bụng | Nôn, chướng bụng | Chướng bụng |
| U hạt vàng                     | Có                 | Không            | Không    | Không            | Không       |
| Gan to                         | Không              | Không            | Có       | Không            | Không       |
| Lách to                        | Không              | Không            | Có       | Không            | Có          |
| Biến chứng viêm tụy cấp        | Không              | Có               | Có       | Có               | Không       |
| Tiền sử gia đình               | Không              | Không            | Không    | Không            | Không       |
| Triglyceride (mmol/l)          | 11,46              | 21,84            | 14,41    | 16,73            | 20,2        |
| Cholesterol toàn phần (mmol/l) | 3,89               | 4,46             | 5,31     | 5,47             | 3,7         |

**Bảng 3.2. Đặc điểm kiểu gen của nhóm tăng triglyceride**

| Bệnh nhân | Gen     | cDNA                      | Protein đột biến          | Di truyền |
|-----------|---------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| 01        | GPIHBP1 | c.45_48dup/<br>c.296-1G>A | p.P17AfsX22/p.(?)         | lặn       |
| 02        | GPIHBP1 | c.45_48dup/<br>c.45_48dup | p.P17AfsX22/p.P17AfsX22   | lặn       |
| 03        | GPIHBP1 | c.45_48dup/<br>c.45_48dup | p.P17AfsX22/p.P17AfsX22   | lặn       |
| 04        | GPIHBP1 | c.45_48dup/<br>c.45_48dup | p.P17AfsX22/p.Pro17AfsX22 | lặn       |
| 05        | LPL     | c.355del/c.898G>C         | p.E119SfsX53/p.G300R      | lặn       |

**Bảng 3.3. Đặc điểm lâm sàng và của nhóm tăng cholesterol**

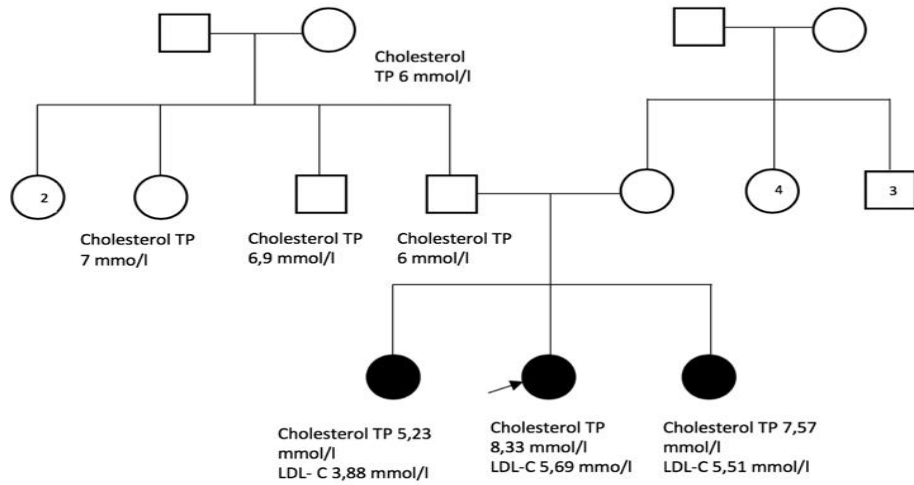
| Bệnh nhân | Tuổi chẩn đoán (năm) | U hạt vàng | Tiền sử gia đình | Cholesterol toàn phần (mmol/l) | LDL-C (mmol/l) | Triglyceride (mmol/l) |
|-----------|----------------------|------------|------------------|--------------------------------|----------------|-----------------------|
| 06        | 1,75                 | Có         | Có               | 10,96                          | 8,58           | 0,93                  |
| 07        | 3,7                  | Có         | Không            | 16,9                           | 10,9           | 1,98                  |
| 08        | 15,2                 | Có         | Có               | 8,33                           | 5,69           | 2,81                  |
| 09        | 8,3                  | Không      | Có               | 7,57                           | 5,51           | 1                     |
| 10        | 17,6                 | Không      | Có               | 5,23                           | 3,88           | -                     |
| 11        | 0,9                  | Không      | Không            | 6,73                           | -              | 2,29                  |
| 12        | 1,1                  | Có         | Không            | 6,77                           | 4,32           | 0,93                  |

**Ghi chú:** (-) không có dữ liệu

**Bảng 3.4. Đặc điểm kiểu gen của nhóm tăng cholesterol**

| Bệnh nhân | Gen   | cDNA                 | Protein đột biến         | Di truyền |
|-----------|-------|----------------------|--------------------------|-----------|
| 06        | LDLR  | c.888C>A             | p.C296X                  | Trội      |
| 07        | LDLR  | c.2397del            | p.V800SfsX129            | Trội      |
| 08        | LDLR  | Mất đoạn lớn exon 15 | p.(?)                    | Trội      |
| 09        | LDLR  | Mất đoạn lớn exon 15 | p.(?)                    | Trội      |
| 10        | LDLR  | Mất đoạn lớn exon 15 | p.(?)                    | Trội      |
| 11        | LDLR  | c.161A>C             | p.D54A                   | Trội      |
| 12        | ABCG5 | c.335dup/c.329T>A    | p.V113GfsX85/<br>p.L110Q | Lặn       |

**Hình 3.1. U hạt vàng ở bệnh nhân 07**



Hình 3.2. Phả hệ của bệnh nhân 08, 09 và 10

#### IV. BÀN LUẬN

Bệnh nhân tăng lipid máu tiên phát thường bị bỏ sót chẩn đoán, chẩn đoán muộn do những lý do sau: i/triệu chứng lâm sàng nghèo nàn, không đặc trưng, bệnh nhân có u hạt vàng thường đến khám tại chuyên khoa da liễu, nhóm bệnh nhân tăng triglyceride thường đi khám chuyên khoa tiêu hoá do các triệu chứng cơ năng như đau bụng, nôn, chướng bụng; ii/bệnh hiếm gặp nên một số bác sỹ không nghĩ tới; điển hình là bệnh nhân 03 được chẩn đoán viêm tụy cấp 3 lần; 2 lần đầu lấy máu có ghi nhận huyết tương đục nhưng không được định lượng triglyceride máu; iii/ bệnh nhân không được làm phân tích phân tử để chẩn đoán xác định và tư vấn di truyền: 3 bệnh nhân 08, 09 và 10 là ba chị em ruột trong một gia đình có nhiều người, nhiều thế hệ tăng cholesterol máu, tuy nhiên thế hệ họ hàng thứ nhất không được làm xem nghiệm gen chẩn đoán, không được tư vấn sàng lọc mỡ máu cho các thế hệ tiếp theo. Nhóm bệnh nhân tăng triglyceride có tuổi chẩn đoán sớm hơn so với nhóm tăng cholesterol do nồng độ triglyceride trong

máu cao gây đục huyết tương nên được tình cờ chẩn đoán.

Nhóm tăng triglyceride chủ yếu di truyền lặn nên hầu hết không có tiền sử gia đình; ngược lại, bệnh nhân tăng cholesterol chủ yếu do đột biến gen LDLR di truyền trội nên tỷ lệ bệnh nhân có tiền sử gia đình khá cao. Các dữ liệu về di truyền phân tử trên các bệnh nhân được phát hiện trên các bệnh nhân Việt Nam cũng được phát hiện ở các báo cáo của y văn [2-6].

Nồng độ triglyceride trung bình ở nhóm tăng triglyceride cao trên ngưỡng nguy cơ biến chứng viêm tụy cấp, phù hợp với kiểu gen của các bệnh nhân; tuy nhiên, không phải tất cả các bệnh nhân đều gặp biến chứng này. Biến chứng viêm tụy chỉ gặp ở 3 bệnh nhân có đột biến đồng hợp tử trên gen GPIHBP1.

Nhóm tăng cholesterol chủ yếu do đột biến gen LDLR gây ra, do đó trong nghiên cứu này, số bệnh nhân có đột biến gen LDLR là nhiều nhất 6/7 bệnh nhân.

## V. KẾT LUẬN

Tăng lipid máu tiên phát có triệu chứng lâm sàng nghèo nàn: u hạt vàng gặp ở cả nhóm tăng cholesterol và nhóm tăng triglyceride, gan lách to, chỉ gặp ở nhóm tăng triglyceride, chẩn đoán bệnh chủ yếu dựa vào xét nghiệm sinh hoá và phân tích phân tử để phát hiện đột biến của các gen có liên quan. Cả 3 bệnh nhân có biến chứng viêm tụy đều có đột biến đồng hợp tử gen GPIHBP1. 6/7 bệnh nhân tăng cholesterol máu có đột biến trên gen LDLR. Cần mở rộng phân tích phân tử để có kế hoạch điều trị dự phòng và tư vấn di truyền phòng bệnh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nordestgaard B.G., Chapman M.J., Humphries S.E. et al (2013).** European Atherosclerosis Society Consensus Panel Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J.* 34(45): 3478-3490.
2. **Gary F.L., Changting X., Hegele R.A. (2015).** Hypertriglyceridemia in the Genomic Era: A New Paradigm. *Endocr Rev.* 36: 131-47.
3. **Calandra S., Priore Oliva C., Tarugi P. et al (2006).** APOA5 and triglyceride metabolism, lesson from human APOA5 deficiency. *Curr Opin Lipidol.* 17: 122-7.
4. **Peterfy M., Ben-Zeev O., Mao H.Z. et al (2007).** Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nature Genet.* 2007;39:1483-7.
5. **Davies B.S., Beigneux A.P., Barnes R.H. et al (2010).** GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell Metab.* 2010;12: 42-52.
6. **Rios J.J. (2012).** Deletion of GPIHBP1 causing severe chylomicronemia *J Inherit Metab Dis.* 35: 531-540 DOI 10.1007/s10545-011-9406-5

## BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT GIÁ TRỊ TIỀN ĐOÁN DƯƠNG CỦA XÉT NGHIỆM SÀNG LỌC TRƯỚC SINH KHÔNG XÂM NHẬP (NIPS) TRONG PHÁT HIỆN CÁC TRISOMY 21, 18 VÀ 13

Hà Thị Minh Thi<sup>1,\*</sup>, Lê Phan Tường Quỳnh<sup>1</sup>, Đoàn Hữu Nhật Bình<sup>1</sup>,  
Võ Văn Đức<sup>1</sup>, Nguyễn Trần Thảo Nguyên<sup>1</sup>, Võ Tá Sơn<sup>2</sup>,  
Phạm Minh Sơn<sup>2</sup>, Trương Thị Phụng<sup>2</sup>, Hà Thị Tiểu Di<sup>2</sup>, Lê Thị Diệu Hằng<sup>3</sup>

### TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Xét nghiệm sàng lọc trước sinh không xâm nhập (NIPS) các trisomy 21, 18 và 13 đang được ứng dụng ngày càng rộng rãi trên lâm sàng. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu: (1) Khảo sát giá trị tiên đoán dương (PPV) của xét nghiệm NIPS trong phát hiện trisomy 21, 18, 13 được chẩn đoán xác định bằng xét nghiệm QF-PCR trên mẫu dịch ối; và (2) So sánh PPV của xét nghiệm NIPS với xét nghiệm sàng lọc quý 1 truyền thống được thực hiện trong giai đoạn 2018-2020. **Đối tượng và phương pháp:** 462 thai phụ được chẩn đoán trước sinh các trisomy 21, 18 và 13 bằng QF-PCR từ mẫu dịch ối, gồm hai nhóm: nhóm 48 thai phụ được chỉ định chẩn đoán do xét nghiệm NIPS dương tính; nhóm 414 thai phụ được chỉ định chẩn đoán do xét nghiệm sàng lọc quý 1 truyền thống nguy cơ cao với các trisomy 21, 18 và 13. **Kết quả:** PPV của xét nghiệm NIPS trong phát hiện trước sinh các trisomy 21, 18 và 13 là cao, 93,8% (95%CI: 83,2 – 97,9), và cao hơn so với xét nghiệm sàng lọc truyền thống quý 1 trong phát hiện các trisomy 21, 18, 13 khi khảo sát tổng thể cũng như theo

các nhóm đặc điểm tuổi mẹ, giới tính thai nhi và từng loại trisomy. **Kết luận:** Xét nghiệm NIPS có PPV cao, có tính ưu việt vượt trội so với xét nghiệm sàng lọc quý 1 truyền thống trong phát hiện trisomy 21, 18 và 13.

**Từ khóa:** Sàng lọc trước sinh không xâm nhập (NIPS), trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13

### SUMMARY

#### PILOT STUDY ON THE POSITIVE PREDICTIVE VALUE OF NON- INVASIVE PRENATAL SCREENING (NIPS) IN DETECTING TRISOMY 21, 18 AND 13

**Background:** Non-invasive prenatal screening (NIPS) for trisomy 21, 18, and 13 is becoming more popular in clinical practice. This study was aimed to (1) investigate the positive predictive value (PPV) of NIPS in detecting trisomy 21, 18, and 13 diagnosed using QF-PCR assay on amniotic fluid samples; and (2) compare the PPV of NIPS to the PPV of the conventional first trimester screening (FTS) performed in 2018-2020. **Patients and Methods:** 462 pregnant women were recruited for the prenatal diagnosis of trisomy 21, 18, and 13 using QF-PCR on amniotic fluid samples. 48 pregnant women subjected to QF-PCR followed a positive NIPS result for trisomy 21, 18, and 13; 414 pregnant women subjected to QF-PCR followed a conventional FTS result with high risk. **Results:** The PPV of NIPS for trisomy 21, 18 và

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

<sup>2</sup>Bệnh Viện Phụ Sản – Nhi Đà Nẵng

<sup>3</sup>Bệnh viện Phụ Nữ Đà Nẵng

Chịu trách nhiệm chính: Hà Thị Minh Thi

Email: htmthi@huemed-univ.edu.vn

Ngày nhận bài: 27.8.2020

Ngày phản biện khoa học: 10.9.2020

Ngày duyệt bài: 18.11.2020

13 was high, as 93.8% (95%CI: 83.2 – 97.9). The PPV of NIPS was higher than the PPV of conventional FTS for total trisomy as well as stratified by maternal age, fetal sex, and type of trisomy. **Conclusions:** NIPS was a prenatal screening test with high PPV and was much better than the conventional first trimester screening in detecting trisomy 21, trisomy 18, and trisomy 13.

**Keywords:** Non-invasive prenatal screening (NIPS), trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sàng lọc trước sinh thai có nguy cơ mắc các trisomy 21, 18 và 13 là cơ sở cho việc chỉ định chẩn đoán xác định bằng xét nghiệm xâm nhập với các mẫu dịch ối hoặc gai nhau. Các phương pháp sàng lọc truyền thống được thực hiện dựa trên các chỉ số huyết thanh mẹ, chỉ số siêu âm và tuổi mẹ. Các phương pháp sàng lọc này có tỷ lệ phát hiện chỉ khoảng 82-87% (sàng lọc quý 1), 81% (nếu sàng lọc quý 2 có inhibin A) hoặc chỉ 69% (nếu sàng lọc quý 2 bằng test bộ ba không có inhibin A) với tỷ lệ dương tính giả (FPR: false positive rate) 5% [1]. Điều này dẫn đến hậu quả có một tỷ lệ khá lớn thai phụ phải tiến hành thủ thuật chọc ối không cần thiết để chẩn đoán.

Năm 2011, xét nghiệm trước sinh không xâm nhập (NIPT: non-invasive prenatal testing) bắt đầu được đưa vào ứng dụng trên lâm sàng dựa trên việc phân tích DNA ngoài tế bào (cfDNA: cell-free DNA) trong máu mẹ để phát hiện lệch bội thường gặp ở thai nhi (trisomy 21, 18 và 13) bằng phương pháp giải trình tự thế hệ kế tiếp (NGS: Next-generation sequencing) [5]. Những nghiên cứu xác nhận giá trị xét nghiệm trên lâm

sàng cũng như các phân tích tổng hợp (meta-analysis) đã cho thấy NIPT có tỷ lệ phát hiện cao, trên 99% với tỷ lệ dương tính giả thấp dưới 1% đối với trisomy 21 [2]. Tuy nhiên, NIPT không thể thay thế các kỹ thuật chẩn đoán xâm nhập như lập karyotype, lai tại chỗ huỳnh quang (FISH: Fluorescence in situ Hybridization) và QF-PCR (Quantitative Fluorescence - Polymerase Chain Reaction) trên mẫu dịch ối hoặc gai nhau trong chẩn đoán xác định các trisomy của thai nhi. Vì vậy, gần đây các nhà khoa học đề nghị sử dụng tên gọi NIPS (non-invasive prenatal screening) thay cho NIPT để nhấn mạnh đây là một phương pháp sàng lọc. Nhờ tính ưu việt vượt trội so với các phương pháp sàng lọc truyền thống, NIPS đã được sử dụng ngày càng rộng rãi trên thế giới và ở nước ta trong những năm gần đây. Vì vậy, việc khảo sát tính hiệu quả lâm sàng của NIPS trong phát hiện các trisomy 21, 18 và 13 là đặc biệt quan trọng.

Nghiên cứu được thực hiện nhằm hai mục tiêu:

1) *Khảo sát giá trị tiên đoán dương của xét nghiệm NIPS trong phát hiện trisomy 21, 18, 13 được chẩn đoán xác định bằng xét nghiệm QF-PCR trên mẫu dịch ối.*

2) *So sánh giá trị tiên đoán dương của xét nghiệm NIPS với xét nghiệm sàng lọc quý 1 truyền thống được thực hiện trong giai đoạn 2018-2020.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Tất cả thai phụ có 2 đặc điểm sau:

- Có kết quả sàng lọc trước sinh nguy cơ cao lệch bội ít nhất một trong các nhiễm sắc thể 21, 18, 13.

- Đồng ý chọc ối để chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật QF-PCR.

Thời gian nghiên cứu từ tháng 5 năm 2018 đến tháng 6 năm 2020, tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế.

**Tiêu chuẩn loại trừ:**

- Các trường hợp song thai, đa thai
- Các trường hợp kết quả QF-PCR có tín hiệu huỳnh quang không đạt tiêu chuẩn để chẩn đoán xác định.

**2.2. Phương pháp nghiên cứu**

- Chọn mẫu nghiên cứu: Chọn lần lượt các thai phụ đạt các tiêu chuẩn nêu trên, gồm có 462 thai phụ được đưa vào nghiên cứu. Mẫu nghiên cứu được chia thành hai nhóm để phân tích.

+ Nhóm NIPS: 48 thai phụ được chỉ định chẩn đoán trước sinh bằng QF-PCR mẫu dịch ối do kết quả sàng lọc bằng xét nghiệm NIPS dương tính ( $Z\text{-score} > 3$ ).

+ Nhóm FTS (First trimester screening): 414 thai phụ được chỉ định chẩn đoán trước sinh bằng QF-PCR mẫu dịch ối do sàng lọc

trước sinh quý 1 bằng test phối hợp các chỉ số hóa sinh (PPAP-A, free  $\beta$ hCG), chỉ số siêu âm thai và tuổi mẹ có kết quả nguy cơ cao (ngưỡng nguy cơ 1:250 đối với trisomy 21, 1:150 đối với trisomy 18 và 13).

- Thực hiện kỹ thuật QF-PCR chẩn đoán xác định các trisomy 21, 18, 13:

+ DNA được tách chiết từ tế bào ối bằng kit Instagene Matrix (Bio-Rad), đo nồng độ bằng máy NanoDrop 2000.

+ Khuếch đại các trình tự STR (Short Tandem Repeat) bằng bộ kit Aneufast QF-PCR,

+ Phân tích kết quả bằng phần mềm GeneMapper v3.2, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Xử lý thống kê:

Thực hiện bằng chương trình thống kê VassarStats. Test Chi bình phương được sử dụng để so sánh các tỷ lệ, khi có ít nhất một tần số trong bảng tiếp liên bé hơn 5 thì sử dụng test Fisher exact. Mức thống kê có ý nghĩa khi  $p < 0,05$ .

**III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**Bảng 1. Đặc điểm của các nhóm thai phụ tham gia chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật QF-PCR**

| Đặc điểm                                          | Nhóm NIPS (%)  | Nhóm FTS (%)   |
|---------------------------------------------------|----------------|----------------|
| <b>Tuổi mẹ (<math>X \pm SD</math>)</b>            |                |                |
| < 35 tuổi                                         | 33,8 $\pm$ 6,8 | 33,6 $\pm$ 6,1 |
| $\geq 35$ tuổi                                    | 23 (47,9)      | 214            |
|                                                   | 25 (52,1)      | 200            |
| <b>Tuổi thai sàng lọc (<math>X \pm SD</math>)</b> |                |                |
| < 14 tuần                                         | 14,3 $\pm$ 3,8 | 12,6 $\pm$ 0,6 |
| $\geq 14$ tuần                                    | 37 (77,1)      | 414 (100,0)    |
|                                                   | 11 (22,9)      | -              |
| <b>Giới tính thai</b>                             |                |                |
| Nam                                               | 28 (58,3)      | 205 (49,5)     |
| Nữ                                                | 20 (41,7)      | 209 (50,5)     |
| <b>Lịch bội nguy cơ cao</b>                       |                |                |
| Trisomy 21                                        | 36 (75,0)      | 386 (93,2)     |

|                      |           |            |
|----------------------|-----------|------------|
| Trisomy 18           | 6 (12,5)  | 18 (4,3)   |
| Trisomy 13           | 6 (12,5)  | 0          |
| Trisomy 21 và 18     | 0         | 2 (0,5)    |
| Trisomy 21 và 13     | 0         | 1 (0,2)    |
| Trisomy 18 và 13     | 0         | 2 (0,5)    |
| Trisomy 21, 18 và 13 | 0         | 5 (1,2)    |
| <b>Tổng</b>          | <b>48</b> | <b>414</b> |

**Nhận xét:** Tuổi thai phụ trong hai nhóm tương đương nhau và khá cao. Tuổi thai trung bình tại thời điểm được sàng lọc của nhóm NIPS là trên 14 tuần. Phân bố về giới của thai nhi ở cả hai nhóm đều không có sự khác biệt về giới tính.

**Bảng 2. Giá trị tiên đoán dương của NIPS trong phát hiện các trisomy 21, 18 và 13 được chẩn đoán xác định bằng QF-PCR trên mẫu dịch ối**

| Chỉ định NIPS                                            | Số ca (%) | Số ca NIPS (+) thật | PPV (%)                            |
|----------------------------------------------------------|-----------|---------------------|------------------------------------|
| NIPS là xét nghiệm đầu tay                               | 32 (66,7) | 29                  | 90,6                               |
| Thực hiện NIPS sau sàng lọc quý 1 nguy cơ cao            | 13 (27,1) | 13                  | 100                                |
| Thực hiện NIPS sau khi siêu âm thai phát hiện bất thường | 3 (6,2)   | 3                   | 100                                |
| <b>Chung</b>                                             | <b>48</b> | <b>45</b>           | <b>93,8<br/>(95%CI: 83,2–97,9)</b> |

**Nhận xét:** Hai phần ba số thai phụ trong nhóm NIPS được chỉ định NIPS như là xét nghiệm sàng lọc đầu tay (First-line). Giá trị tiên đoán dương (PPV: positive predictive value) của NIPS trong phát hiện các trisomy là 93,8% (95%CI: 83,2 – 97,9), giá trị này cũng cao khi khảo sát theo từng nhóm chỉ định NIPS.

**Bảng 3. So sánh giá trị tiên đoán dương của hai nhóm NIPS và FTS**

| Đặc điểm              | Nhóm NIPS<br>Số ca (+) thật (%) | Nhóm FTS<br>Số ca (+) thật (%) | P                  |
|-----------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| <b>Tuổi mẹ</b>        |                                 |                                |                    |
| < 35 tuổi             | 20 (87)                         | 9 (4,2)                        | < 0,0001           |
| ≥ 35 tuổi             | 25 (100)                        | 17 (8,5)                       | < 0,0001           |
| <b>Giới tính thai</b> |                                 |                                |                    |
| Nam                   | 27 (96,4)                       | 12 (5,9)                       | < 0,0001           |
| Nữ                    | 18 (90)                         | 14 (6,7)                       | < 0,0001           |
| <b>Lịch bội</b>       |                                 |                                |                    |
| Trisomy 21            | 34 (94,4)                       | 24 (6,1)                       | < 0,0001           |
| Trisomy 18            | 6 (100)                         | 1 (3,7)                        | < 0,0001           |
| Trisomy 13            | 5 (83,3)                        | 1 (12,5)                       | 0,026              |
| <b>Chung</b>          | <b>45 (93,8)</b>                | <b>26 (6,3)</b>                | <b>&lt; 0,0001</b> |

**Nhận xét:** PPV của NIPS trong phát hiện trisomy cao hơn có ý nghĩa thống kê so với xét nghiệm sàng lọc truyền thống quý 1 khi khảo sát tổng thể cũng như theo các đặc điểm tuổi mẹ, giới tính thai và loại trisomy.

#### IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm bước đầu đánh giá giá trị tiên đoán dương của xét nghiệm NIPS trong phát hiện các lệch bội thường gặp, bao gồm các trisomy 21, 18 và 13. Chúng tôi đã khảo sát các thai phụ được thực hiện xét nghiệm xâm nhập để chẩn đoán trisomy 21, 18 và 13 bằng kỹ thuật QF-PCR trên mẫu DNA được tách chiết từ tế bào ối. Kết quả chẩn đoán của các thai phụ đã được sàng lọc có nguy cơ cao trong thời gian từ tháng 5/2018 đến tháng 6/2020, được chia thành hai nhóm để phân tích: nhóm NIPS gồm 48 thai phụ được chỉ định chẩn đoán vì xét nghiệm sàng lọc NIPS dương tính, và nhóm FTS gồm 414 thai phụ được chỉ định chẩn đoán vì có nguy cơ cao khi sàng lọc truyền thống quý 1 bằng test phối hợp (PPAP-A,  $\beta$ -hCG tự do, siêu âm thai và tuổi mẹ). Các đặc điểm của hai nhóm nghiên cứu này được trình bày ở Bảng 1. Tuổi mẹ trung bình của hai nhóm tương đương nhau, lần lượt là  $33,8 \pm 6,8$  và  $33,6 \pm 6,1$ . Do các thai phụ trong nghiên cứu này đều có nguy cơ cao trisomy nên tuổi trung bình đều xấp xỉ ngưỡng tuổi nguy cơ (35 tuổi) sinh con lệch bội của các bà mẹ. Tuổi thai tại thời điểm sàng lọc của nhóm NIPS là  $14,3 \pm 3,8$  tuần. Một trong những lợi điểm đáng kể của NIPS đó là có thể thực hiện cho các thai phụ mang thai từ 9 hoặc 10 tuần trở đi, và không có giới hạn trên của tuổi thai. Nhờ vậy, trong thực tế có một số thai phụ

vẫn được sàng lọc trước sinh sau khi bị bỏ qua giai đoạn có thể tham gia sàng lọc quý 1. Điều này đã giải thích vì sao tuổi thai trung bình khi sàng lọc của nhóm NIPS cao hơn so với nhóm FTS. Sự phân bố về giới tính của thai được chẩn đoán bằng QF-PCR trong hai nhóm đều có nam và nữ tương đương nhau.

Bảng 2 cho thấy nhóm NIPS có 32 thai phụ (chiếm 66,7%) được chỉ định NIPS là xét nghiệm sàng lọc đầu tay (First-line screening), có 13 thai phụ (chiếm 27,1%) được chỉ định NIPS sau khi có kết quả sàng lọc quý 1 nguy cơ cao, còn lại có 3 thai phụ được chỉ định NIPS do có siêu âm bất thường. Nhờ ưu thế về thời điểm sàng lọc, NIPS có thể thực hiện khi tuổi thai đã qua khỏi quý 1, nên các trường hợp siêu âm thai phát hiện bất thường (thường là thai đã trên 20 tuần) có thể tham gia sàng lọc trước sinh bằng xét nghiệm NIPS để có thêm thông tin giúp chỉ định chẩn đoán xác định bằng xét nghiệm xâm nhập. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy giá trị tiên đoán dương của xét nghiệm NIPS trong phát hiện chung các trisomy 21, 18 và 13 là 93,8% (95%CI: 83,2 – 97,9). Khi khảo sát PPV của NIPS theo từng nhóm chỉ định, chúng tôi nhận thấy PPV của nhóm xét nghiệm NIPS sau khi có sàng lọc quý 1 nguy cơ cao và nhóm có siêu âm bất thường đều đạt 100%. Đặc biệt, nhóm NIPS đầu tay cũng có PPV cao, đạt 90,6%. Đây là một tín hiệu khả quan, khẳng định tính ưu việt của NIPS trong sàng lọc trước sinh các trisomy 21, 18 và 13. Từ khi được đưa vào ứng dụng trên lâm sàng, có khá nhiều ý kiến trái chiều về việc nên hay không nên chỉ định NIPS như là một xét nghiệm sàng lọc đầu tay. Thời gian đầu, NIPS được

khuyến cáo chỉ định cho nhóm phụ nữ nguy cơ cao, bao gồm các phụ nữ trên 35 tuổi, tiền sử từng mang thai trisomy, các dấu hiệu siêu âm thai gợi ý lệch bội, hoặc bố/mẹ là người chuyển đoạn Robertson cân bằng làm tăng nguy cơ sinh con trisomy 13 hoặc 21 [5]. Sau đó, có khuyến cáo nên chỉ định NIPS trong sàng lọc trước sinh theo chiến lược sàng lọc tập trung (contingent screening strategy) dựa trên kết quả nguy cơ của sàng lọc quý 1. Các kết quả nghiên cứu gần đây trên thế giới đã cho thấy thực hiện NIPS cho nhóm thai phụ có kết quả sàng lọc truyền thống quý 1 nguy cơ cao và trung gian đã làm giảm tỷ lệ dương tính giả và tăng tỷ lệ phát hiện [6], [7].

Khi khảo sát theo từng loại trisomy, kết quả Bảng 3 cho thấy PPV của xét nghiệm NIPS đối với trisomy 21, 18 và 13 đều cao, lần lượt là 94,4%; 100% và 83,3%. Một kết quả nghiên cứu vừa công bố của Zheng (2020) cho thấy trong 30 ca NIPS dương tính đối với trisomy 21, có 29 ca dương tính thật, PPV được xác định là 96,67% (95%CI: 80,95 – 99,83) [8]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với tác giả Zheng. Trong khi đó, nghiên cứu của Liu (2020) cho thấy PPV của NIPS đối với trisomy 21 là 78,46% (51/65) [4], giá trị này thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi,  $p = 0,046$ . Sự khác biệt này có thể là do đặc điểm mẫu nghiên cứu khác nhau, nghiên cứu của Liu gồm phần lớn các thai phụ được chỉ định NIPS trong quý 2. Ngưỡng 35 tuổi của thai phụ được xem là ngưỡng nguy cơ cao sinh con lệch bội, vì vậy PPV của xét nghiệm sàng lọc trong nhóm  $\geq 35$  tuổi thường cao hơn so với nhóm  $< 35$  tuổi. Kết quả của chúng tôi cho thấy PPV

của xét nghiệm NIPS trong nhóm phụ nữ  $< 35$  tuổi là 87%, trong khi ở nhóm phụ nữ  $\geq 35$  tuổi lên đến 100%, tuy nhiên sự khác biệt giữa hai nhóm này chưa có ý nghĩa thống kê.

Chúng tôi đã so sánh PPV của nhóm NIPS và nhóm FTS. Kết quả ở Bảng 3 cho thấy xét nghiệm NIPS có PPV trong phát hiện các trisomy là 93,8%, cao hơn rất nhiều so với nhóm FTS có PPV chỉ ở mức 6,3%,  $p < 0,0001$ . Ngoài ra, khi khảo sát theo các đặc điểm tuổi mẹ, giới tính của thai và từng loại trisomy đều cho thấy PPV của NIPS cao hơn rất nhiều so với sàng lọc quý 1 truyền thống, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Sau một thời gian ứng dụng trên lâm sàng, nhiều quan điểm đã cho rằng nên chỉ định NIPS như là một xét nghiệm sàng lọc đầu tay. Một trong những mối lo ngại khi chỉ định NIPS để sàng lọc đầu tay là giá thành xét nghiệm khá cao. Tuy nhiên, phân tích quy mô lớn của Kostenko (2019) đã cho thấy tính hiệu quả về giá của NIPS so với xét nghiệm sàng lọc truyền thống nhờ tăng tỷ lệ phát hiện và giảm tỷ lệ dương tính giả [3].

Như vậy có thể thấy tính ưu việt vượt trội của NIPS qua chỉ số PPV cao, từ đó làm giảm được tỷ lệ chọc ối không cần thiết và đặc biệt giảm được những lo lắng, thậm chí là sang chấn tinh thần cho các thai phụ khi nhận kết quả sàng lọc quý 1 nguy cơ cao.

## V. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu trong thời gian từ tháng 5 năm 2018 đến tháng 6 năm 2020 được thực hiện trên 462 thai phụ tham gia chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật QF-PCR trên mẫu dịch ối, bao gồm 48 thai phụ được chỉ định chẩn đoán do NIPS dương tính và 414 thai phụ được chỉ định chẩn đoán do sàng lọc

truyền thống quý 1 nguy cơ cao, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

- Giá trị tiên đoán dương của (PPV) của xét nghiệm NIPS trong phát hiện trước sinh các trisomy 21, 18 và 13 là cao, 93,8% (95%CI: 83,2 – 97,9).

- NIPS thể hiện tính ưu việt trong sàng lọc trước sinh các trisomy 21, 18 và 13 với giá trị tiên đoán dương cao hơn nhiều so với xét nghiệm sàng lọc quý 1 truyền thống.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **ACOG**, Screening for fetal aneuploidy. *Pract Bull*, 2016, 163, 1–15.
2. **Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP**, Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol*, 2012, 119(5), 890–901.
3. **Kostenko E, Chantraine F, Vandeweyer K, Schmid M, Lefevre A, Hertz D, Zelle L, Bartha J, Di Renzo G**, Clinical and Economic Impact of Adopting Noninvasive Prenatal Testing as a Primary Screening Method for Fetal Aneuploidies in the General Pregnancy Population. *Fetal Diagn Ther*, 2019, 45(6), 413–423.
4. **Liu Y, Liu H, He Y, Xu W, Ma Q, He Y, Lei W, Chen G, He Z, Huang J, Liu J, Liu Y, Huang Q, Yu F**, Clinical performance of non-invasive prenatal served as a first-tier screening test for trisomy 21, 18, 13 and sex chromosome aneuploidy in a pilot city in China. *Hum Genomics*, 2020, 14(1), 1-9.
5. **Rink BD, Norton ME**, Screening for fetal aneuploidy. *Semin Perinatol*, 2016, 40(1), 35–43.
6. **Sánchez-Durán MÁ, Bernabeu García A, Calero I, Ramis Fossas J, Illescas T, Avilés MT, Maiz N, Carreras E**, Clinical application of a contingent screening strategy for trisomies with cell-free DNA: A pilot study. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2019, 19(1), 1-7.
7. **Prefumo F, Paolini D, Speranza G, Palmisano M, Dionisi M, Camurri L**, The contingent use of cell-free fetal DNA for prenatal screening of trisomies 21, 18, 13 in pregnant women within a national health service: A budget impact analysis. *PLoS One*, 2019, 14(6), 1-12.
8. **Zheng J, Lu H, Li M, Guan Y, Yang F, Xu M, Dong J, Zhang Q, An N, Zhou Y**, The Clinical Utility of Non-invasive Prenatal Testing for Pregnant Women With Different Diagnostic Indications. *Front Genet*, 2020, 11, 1-8.

## CHẨN ĐOÁN HỘI CHỨNG WISKOTT ALDRICH BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN

Ngô Mạnh Tiến<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Mai Hương<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Phương Mai<sup>1</sup>, Ngô Diễm Ngọc<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Vân Anh<sup>2</sup>, Nguyễn Ngọc Quỳnh Lê<sup>2</sup>,  
Lê Minh Hương<sup>2</sup>, Trần Minh Điền<sup>1,2</sup>

### TÓM TẮT

Hội chứng Wiskott-Aldrich (WAS) là một bệnh suy giảm miễn dịch liên kết nhiễm sắc thể giới tính X, đặc trưng bởi giảm tiểu cầu, bệnh chàm và nhiễm trùng tái phát. **Mục tiêu:** Áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử phát hiện đột biến gen WAS trên bệnh nhân trẻ em Việt Nam nghi ngờ mắc hội chứng Wiskott Aldrich. **Phương pháp:** Nghiên cứu tiến hành trên 5 bệnh nhân nghi ngờ mắc WAS, phân tích đột biến gen WAS từ máu ngoại vi. Toàn bộ vùng mã hóa protein của gen WAS được khuếch đại và giải trình tự chuỗi DNA. **Kết quả:** Bệnh nhân có đột biến gen WAS gồm 1 bệnh nhân có đột biến c.131C>T (p.Gln33Ter), 2 bệnh nhân có đột biến c.71C>T (p.Arg13Ter), 1 bệnh nhân có đột biến c.125G>A (p.Glu31Lys) và 1 bệnh nhân có đột biến c.408G>A (p.Gly12Glu). **Kết luận:** Kỹ thuật giải trình tự gen là một phương pháp hiệu quả, chính xác trong chẩn đoán bệnh WAS.

**Từ khóa:** Hội chứng Wiskott Aldrich, WAS, giảm tiểu cầu, bệnh chàm

### SUMMARY

#### DIAGNOSTIC WISKOTT ALDRICH SYNDROME BY SANGER SEQUENCING

The Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS) is an X-linked immunodeficiency condition characterized by microthrombocytopenia, eczema and recurrent infections. **Objective:** Application biotechnology for identification of WAS mutations from blood in pediatric Vietnamese patients with WAS. **Method:** We have analyzed mutations in DNA extracted from blood of 5 patients with WAS. All the coding region of WAS were amplified and sequenced. **Results:** We found BTK mutations in 4 patients including 1 patient with c.131C>T (p.Gln33Ter) mutation, 2 patients with c.71C>T (p.Arg13Ter) mutation, 1 patient with c.125G>A (p.Glu31Lys) mutation, 1 patient with c.408G>A (p.Gly125Glu) mutation. **Conclusion:** The gene sequencing technique is an accurate and effective method to diagnose the WAS disease.

**Keywords:** Wiskott Aldrich syndrome, WAS, eczema, thrombocytopenia

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng Wiskott-Aldrich (WAS) là một bệnh suy giảm miễn dịch tiên phát (PID) được đặc trưng bởi giảm tiểu cầu, bệnh chàm và nhiễm trùng tái phát. Bệnh nhân cũng có nguy cơ mắc bệnh ác tính và bệnh tự miễn. Năm 1937, Bác sĩ Alfred Wiskott đã mô tả một bệnh nhân có lâm sàng gồm giảm tiểu cầu, bệnh chàm và nhiễm trùng tái phát

<sup>1</sup>Khoa Di truyền và Sinh học phân tử, Bệnh viện Nhi Trung Ương.

<sup>2</sup>Khoa Miễn Dịch – Dị Ứng – Khớp, Bệnh viện Nhi Trung Ương.

Chịu trách nhiệm chính: Ngô Mạnh Tiến  
Email: manhtien181@gmail.com

Ngày nhận bài: 29.8.2020

Ngày phản biện khoa học: 17.9.2020

Ngày duyệt bài: 19.11.2020

và chết do chảy máu đường ruột và nhiễm trùng huyết. Năm 1954, Aldrich và cộng sự tìm thấy sự di truyền liên kết nhiễm sắc thể giới tính X và sau đó được gọi là Hội chứng Wiskott-Aldrich [1]. Tỷ lệ mắc bệnh là 1/100.000 trẻ sinh ra [2].

Gen WAS nằm trên cánh ngăn nhiễm sắc thể giới tính X (Xp11.22-23), chiều dài khoảng 9kb, gồm 12 exon chứa 502 acid amin, mã hóa protein WAS [3]. Protein WAS có vai trò trong tế bào máu đầu dòng, liên quan đến tái tổ hợp actin cytoskeleton và sự hình thành synapse miễn dịch. Thiếu hụt protein WAS gây ra khiếm khuyết hoạt hóa tế bào T- giảm sản xuất kháng thể và đặc biệt đối với kháng nguyên polysaccharide, giảm chức năng tế bào giết tự nhiên NK, hạn chế di chuyển đại thực bào và khiếm khuyết trong trình diện kháng nguyên [4] [5] [2].

Việc phân tích đột biến gen WAS giúp chẩn đoán chính xác bệnh, từ đó có thể chỉ định điều trị kháng sinh dự phòng, truyền Gamma-globulin, giúp cải thiện tiên lượng cho bệnh nhân và giảm số đợt nhiễm trùng và số lần nhập viện, đặc biệt là các trường hợp nhẹ.

Trong nghiên cứu này, mục tiêu của chúng tôi là: *Áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen phát hiện đột biến gen WAS ở vùng exon và vùng ranh giới exon/intron trên 6 bệnh nhân nghi ngờ mắc hội chứng Wiskott Aldrich.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu trên 6 bệnh nhân nam (từ 2 tháng đến 1 tuổi) không có quan hệ huyết thống, đến khám và điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung Ương trong thời gian từ tháng 1-2019 đến tháng 9-2019. Cả 6 bệnh nhân đủ tiêu chuẩn chẩn đoán xác định bệnh WAS

theo các tiêu chuẩn của Hiệp hội suy giảm miễn dịch châu Âu [6] [7] như sau:

Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân:

- Giới tính: Nam.
- Chàm da.
- Tiêu phân có chảy máu kéo dài.
- Xuất huyết da dạng chấm, ban xuất huyết cho đến chảy máu đường tiêu hóa.
- Nhiễm trùng do vi khuẩn, virus hoặc nhiễm trùng cơ hội tái phát như: viêm tai, viêm phổi, viêm màng não, nhiễm trùng huyết...

- Xét nghiệm cận lâm sàng: Giảm số lượng tiểu cầu ( $<70.000/mm^3$ ) với kích thước tiểu cầu nhỏ ( $<5.0fl$ ), Định lượng kháng thể IgM, IgA, IgG thấp và IgE cao.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch thứ phát do HIV, thuốc hoặc hóa chất.
- Bệnh nhân hoặc người nhà không chấp thuận tham gia nghiên cứu.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Mẫu bệnh phẩm: mỗi bệnh nhân thu nhận 2ml máu ngoại vi chống đông EDTA.

- Tách chiết DNA từ máu ngoại vi: sử dụng kit tách chiết DNA QiaAmp DNA blood mini kit (Qiagen- Đức), đo nồng độ DNA tổng số bằng máy Nano Drop 1000 (Thermo Fisher).

- Phương pháp PCR nhân đoạn gene WAS: Trình tự môi được thiết kế theo Wing và cộng sự [8]. Trong mỗi tube PCR có tổng thể tích 25 $\mu$ , các thành phần gồm có DNA tổng số từ 10-100ng/ $\mu$ l, PCR buffer, dNTP Mix, MgCl<sub>2</sub>, Hotstart Tag DNA Polymerase, 2 loại môi xuôi và ngược (0,5 $\mu$ l cho mỗi loại). Chu trình nhiệt PCR được thực hiện trong điều kiện 95 $^{\circ}$ C, 5 phút; [95 $^{\circ}$ C, 45 giây; 60 $^{\circ}$ C, 45 phút; 72 $^{\circ}$ C, 1 phút 45 giây] x 35 chu kỳ; 72 $^{\circ}$ C, 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên Agarose 1% có nhuộm

ethidium bromide và quan sát bằng máy soi gel UVP. Độ lớn của sản phẩm PCR được thể hiện ở hình 1.

- Tinh sạch sản phẩm PCR: sử dụng kit tinh sạch QIAamp PCR purification kit (Qiagen- Đức).

- Thực hiện phản ứng PCR mỗi đơn: Sản phẩm PCR đã được tinh sạch sẽ được thực hiện Phản ứng PCR mỗi đơn với BigDye V3.1 (ABI, Mỹ) theo chu trình nhiệt [95°C, 30 giây; 55°C, 01 phút; 72°C, 02 phút] x 30 chu kỳ. Sản phẩm PCR mỗi đơn được tinh sạch sử dụng kit tinh sạch chuyên dụng BigDye X Terminator (ABI, Mỹ).

- Giải trình tự gene WAS: Trình tự DNA được đọc bằng máy Genetic Analyser 3500 (ABI). Trình tự gene được phân tích bằng phần mềm Chromas Pro.

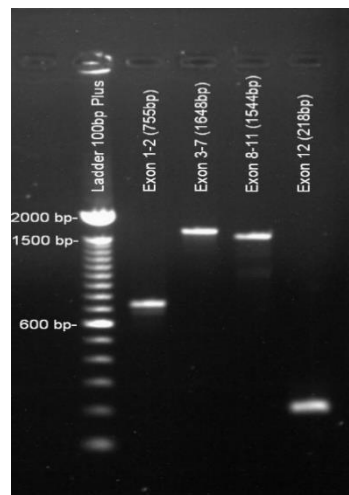
- Trình tự gen chuẩn: NG\_007877.1.

### III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

#### Giải trình tự gene WAS

Gen WAS nằm trên cánh ngắn nhiễm sắc thể giới tính X (Xp11.22-23), chiếm chiều dài khoảng 9kb, gồm 12 exon chứa 502 acid amin, mã hóa protein WAS. Kỹ thuật giải trình tự trên gen WAS tập trung vào các exon để phát hiện các đột biến thuộc vùng mã hóa protein (exon) và vùng cắt nối exon-intron (splicing) của gen WAS. Chúng tôi đã khuếch đại thành công vùng mã hóa protein (exon) và vùng cắt nối exon-intron (splicing) bằng 4 phản ứng PCR, với sản phẩm tương ứng là Exon 1 (755bp); Exon 3-7 (1648bp); Exon 8-11 (1544bp); Exon 12 (218bp), giúp đơn giản quá trình phân tích đột biến gen (hình 3.1). Các sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch đã được tiến hành giải trình tự chuỗi DNA để xác định thay đổi trên vùng mã hóa protein và vùng cắt nối exon-intron

(slicing) của gen WAS. Toàn bộ các kết quả giải trình tự chuỗi DNA đều cho kết quả đặc hiệu với các vùng gen WAS đã được khuếch đại.



**Hình 3.1 Sản phẩm khuếch đại gen WAS.**  
**Giếng 1: Ladder 100bp plus; giếng 2: Exon 1 (755bp); giếng 3: Exon 3-7 (1648bp);**  
**giếng 4: Exon 8-11 (1544bp); giếng 5:**  
**Exon 12 (218bp).**

#### Phát hiện đột biến gen WAS trên bệnh nhân WAS

Các bệnh nhân đều là nam, có đặc điểm lâm sàng phù hợp với kiểu thể cổ điển WAS. Tuổi khởi phát của bệnh nhân từ 1 đến 5 tháng tuổi, triệu chứng ban đầu là tiêu phân phân có chảy máu (100%, 5/5 bệnh nhân), ngoài ra các bệnh nhân bị nhiễm trùng tái phát như viêm tai giữa (80%, 4/5 bệnh nhân), ban xuất huyết giảm tiểu cầu (80%, 4/5 bệnh nhân), chàm khô (40%, 2/5 bệnh nhân), viêm phổi. Xét nghiệm cận lâm sàng của các bệnh nhân cho thấy, Số lượng tiểu cầu giảm thấp (từ 15000 đến 52000) và kích thước tiểu cầu nhỏ hoặc không xác định. Định lượng kháng thể trong máu ngoại vi cho thấy IgA, IgM, IgG ở mức bình thường trong khi đó IgE tăng cao (4/5 bệnh nhân) như Bảng 3.1

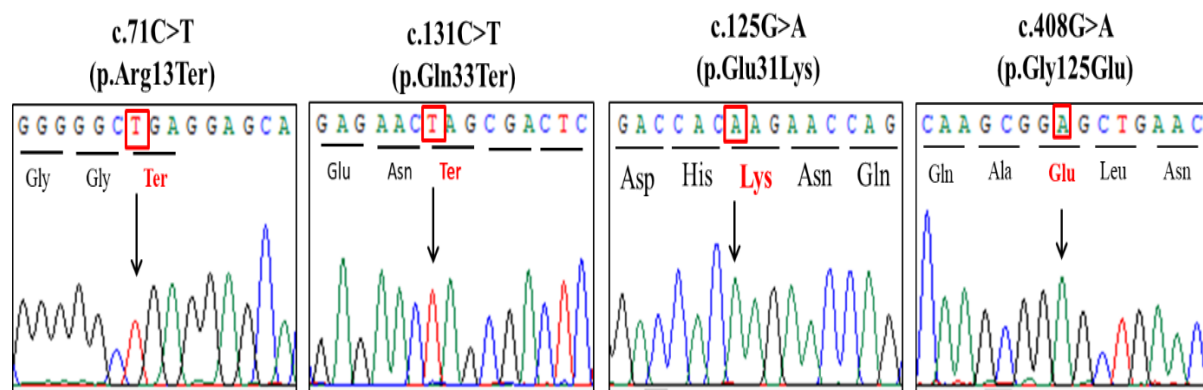
**Bảng 3.1. Xét nghiệm cận lâm sàng bệnh nhân WAS**

| Bệnh nhân | Tuổi khởi phát | Tuổi chẩn đoán | Định lượng kháng thể |      |       |       | Tiêu cầu |            |
|-----------|----------------|----------------|----------------------|------|-------|-------|----------|------------|
|           |                |                | IgA                  | IgM  | IgG   | IgE   | Số lượng | Kích thước |
| 1         | 2th            | 14 th          | 1,22                 | 1,54 | 11,11 | 677,8 | 15000    | Kxd        |
| 2         | 3th            | 13 th          | 0,48                 | 0,35 | 7,72  | 90,5  | 26000    | Kxd        |
| 3         | 1 th           | 8 th           | 0,08                 | 0,15 | 6,34  | 0,5   | 29000    | 7,8        |
| 4         | 2 th           | 9 th           | 3,21                 | 0,68 | 10,86 | 433   | 47000    | Kxd        |
| 5         | 5th            | 12 th          | 0,18                 | 0,01 | 0,94  | 91,3  | 52000    | 7,8        |

**Bảng 3.2. Kiểu gen các bệnh nhân WAS**

| Bệnh nhân | Đột biến |             | Vùng đột biến | Dạng đột biến |
|-----------|----------|-------------|---------------|---------------|
|           | c.ADN    | Protein     |               |               |
| 1         | c.71C>T  | p.Arg13Ter  | Exon 1        | Vô nghĩa      |
| 2         | c.71C>T  | p.Arg13Ter  | Exon 1        | Vô nghĩa      |
| 3         | c.125G>A | p.Glu31Lys  | Exon 1        | Sai nghĩa     |
| 4         | c.131C>T | p.Gln33Ter  | Exon 1        | Vô nghĩa      |
| 5         | c.408G>A | p.Gly125Glu | Exon 4        | Sai nghĩa     |

Kỹ thuật giải trình tự gen phát hiện các rối loạn gen WAS liên quan đến hội chứng WAS. Nghiên cứu này phát hiện 5 đột biến của gen WAS (bảng 3.2). Trong đó, 2 bệnh nhân có đột biến điểm làm thay thế axit amin là p.Glu31Lys và p.Gly125Glu, 3 bệnh nhân có đột biến điểm tạo mã kết thúc sớm trên exon 1 là p.Arg13Ter và p.Gln33Ter (hình 3.2).



**Hình 3.2. Ảnh đột biến phát hiện trên gen WAS**

Đột biến trên gen WAS có thể gây rối loạn chức năng hoặc ức chế sản xuất protein WAS. Tùy theo dạng đột biến gen WAS mà hội chứng Wiskott Aldrich chia làm 3 thể bệnh chính: 1. Thể cổ điển “classic WAS”; 2. Thể liên kết với NST X và giảm tiêu cầu

“X-linked thrombocytopenia” (XLT); 3. Thể liên kết với NST X và giảm bạch cầu hạt “X-linked neutropenia” (XLN) [9] [10] [11]. Gần 50% bệnh nhân WAS ở thể cổ điển “Classic WAS” xảy ra khi chức năng protein WAS mất đi hoàn toàn, phân nửa còn lại bệnh nhân ở thể XLT gây ra bởi một đột biến sai nghĩa dẫn đến biểu hiện protein WAS không đủ hoặc không đầy đủ. Thể XLN xảy ra khi có đột biến missense xuất hiện tại vị trí Cdc42- binding. Nhưng nghiên cứu không tiên lượng bệnh nhân được dựa trên phân tích biểu hiện protein WAS.

Cho đến nay, hơn 426 đột biến đã được tìm thấy, trải dài tất cả 12 exon, với các dạng đột biến sai nghĩa, vô nghĩa, ghép nối, chèn, xóa và thay thế axit amin (Ngân hàng dữ liệu đột biến gen người, cập nhật 8/2020). Trong các đột biến đã được công bố, đột biến điểm là dạng chiếm nhiều nhất và tập trung từ exon 1 đến 4. Trong nghiên cứu này, 2 bệnh nhân có đột biến điểm làm thay đổi axit amin là p.Glu31Lys (Exon 1) và p.Gly125Glu (Exon 4) đã được công bố bởi tác giả Kolorri (1995) và Wu (2015) [12] [13]. Thường các đột biến thay đổi axit amin xảy ra tại 4 exon đầu gen WAS thuộc thể liên kết với NST X và giảm tiểu cầu (XLT) có biểu hiện lâm sàng nhẹ hơn do chức năng protein WAS vẫn còn nhưng không đủ phù hợp với lâm sàng của bệnh nhân. Ngoài ra, 3 bệnh nhân có đột biến điểm tạo mã kết thúc sớm trên exon 1 là p.Arg13Ter và p.Gln33Ter, có lâm sàng phù hợp với thể cổ điển WAS, có biểu hiện lâm sàng nặng và dễ tử vong nếu không được phát hiện và điều trị sớm [14].

#### IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu phát hiện phát hiện được 5 bệnh nhân đều có đột biến trên gen WAS trong đó 1 bệnh nhân có đột biến p.Glu31Lys; 1 bệnh nhân có đột biến p.Gly125Glu; 1 bệnh nhân có đột biến p.Gln33Ter; 2 bệnh nhân có đột biến p.Arg13Ter.

Hội chứng Wiskott Aldrich biểu hiện rất sớm sau sinh và có tiên lượng tử vong rất cao nên kỹ thuật giải trình tự gen phát hiện các đột biến gen WAS giúp chẩn đoán sớm và chính xác tránh bệnh nhân phải điều trị kéo dài. Đây cũng là cơ sở giúp tầm soát bệnh trong các gia đình đã có người mắc hội chứng WAS và chẩn đoán trước sinh cho những lần sinh tiếp theo.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Albert M.H., Bittner T.C., Nonoyama S. et al (2010). X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood*, **115**(16), 3231-3238.
2. Ochs H.D., Filipovich A.H., Veys P. et al (2009). Wiskott-Aldrich Syndrome: Diagnosis, Clinical and Laboratory Manifestations, and Treatment. *Biol Blood Marrow Transplant*, **15**(1), 84-90.
3. Derry J.M.J., Ochs H.D. and Francke U. (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*, **78**(4), 635-644.
4. Lutskiy M.I., Rosen F.S. and Remold-O'Donnell E. (2005). Genotype-Prototype Linkage in the Wiskott-Aldrich Syndrome. *J Immunol*, **175**(2), 1329-1336.
5. Catucci M., Castiello M.C., Pala F. et al (2012). Autoimmunity in Wiskott-Aldrich

- Syndrome: An Unsolved Enigma. *Front Immunol*, 3.
6. **Thrasher A.J. and Kinnon C. (2000).** The Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Exp Immunol*, **120**(1), 2-9.
  7. **Buchbinder D., Nugent D. and Fillipovich A. (2014).** wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, current management, and emerging treatments. *Appl Clin Genet*, 7, 55.
  8. **Chan K.-W., Lee T.-L., Chung B.H.-Y. et al (2002).** Identification of five novel WASP mutations in Chinese families with Wiskott-Aldrich syndrome. *Hum Mutat*, **20**(2), 151-152.
  9. **Zhu Q., Watanabe C., Liu T. et al (1997).** Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia: WASP gene mutations, protein expression, and phenotype. *Blood*, **90**(7), 2680-2689.
  10. **Kobayashi R., Ariga T., Nonoyama S. et al (2006).** Outcome in patients with Wiskott-Aldrich syndrome following stem cell transplantation: an analysis of 57 patients in Japan. *Br J Haematol*, **135**(3), 362-366.
  11. **Lee P.P.W., Chen T.-X., Jiang L.-P. et al (2009).** Clinical and Molecular Characteristics of 35 Chinese Children with Wiskott-Aldrich Syndrome. *J Clin Immunol*, **29**(4), 490-500.
  12. **Kolluri R., Shehabeldin A., Peacocke M. et al (1995).** Identification of WASP mutations in patients with Wiskott-Aldrich syndrome and isolated thrombocytopenia reveals allelic heterogeneity at the WAS locus. *Hum Mol Genet*, **4**(7), 1119-1126.
  13. **Wu J., Liu D., Tu W. et al (2015).** T-cell receptor diversity is selectively skewed in T-cell populations of patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, **135**(1), 209-216.
  14. **Zhu Q., Zhang M., Blaese R. et al (1995).** The Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked congenital thrombocytopenia are caused by mutations of the same gene. *Blood*, **86**(10), 3797-3804.

## CÒI XƯƠNG PHỤ THUỘC VITAMIN D TYP 1A DO ĐỘT BIẾN GEN CYP27B1

Nguyễn Thu Hà\*, Vũ Chí Dũng\*

### TÓM TẮT

Còi xương phụ thuộc vitamin D type 1A là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường do đột biến gen CYP27B1 mã hoá cho enzyme  $1\alpha$ -hydroxylase. **Mục tiêu:** mô tả kiểu hình và kiểu gen của bệnh nhân còi xương phụ thuộc vitamin D. **Đối tượng và phương pháp:** 5 bệnh nhân được chẩn đoán còi xương phụ thuộc vitamin D. Nghiên cứu một loạt ca bệnh bao gồm biểu hiện lâm sàng, hóa sinh, chẩn đoán hình ảnh và phân tích phân tử bằng hệ thống giải trình tự gen thế hệ mới cho bệnh nhân còi xương phụ thuộc vitamin D. **Kết quả:** Tất cả các trẻ có biểu hiện chậm phát triển vận động, giảm cơ lực, chậm tăng cân, biến dạng các xương dài và lồng ngực. Xét nghiệm sinh hoá có hạ calci, phospho máu, trong khi ALP, PTH tăng cao, và 25OHD bình thường hoặc cao. Xquang xương dài cho thấy hình ảnh giảm mật độ xương, đầu xương dài nhám nhở, gãy xương bệnh lý. 5 bệnh nhân đều mang đột biến gây bệnh trên gen CYP27B1. Các bệnh nhân được điều trị bằng Calcitriol, Calci và Phospho uống, đem lại hiệu quả tốt. **Kết luận:** phân tích phân tử giúp khẳng định chẩn đoán bệnh còi xương phụ thuộc Vitamin D type 1, giúp điều trị hiệu quả và tư vấn di truyền phòng bệnh.

**Từ khoá:** còi xương phụ thuộc vitamin - D, đột biến gen CYP27B1

### SUMMARY

#### MUTATIONS OF CYP27B1 IN PATIENTS WITH VITAMIN D- DEPENDENT RICKETS

Vitamin D-dependent rickets is a recessive inherited disease on chromosomes often caused by a mutation of the gene CYP27B1 coded for 25 - hydroxyvitamin D -  $1\alpha$  - hydroxylase. **Objectives:** to describe phenotype and genotype of patients with vitamin D-dependent rickets. **Methods:** This is a case series study including clinical manifestations, laboratory tests, X-ray symptoms and mutations analysis using next generation sequencing of 5 patients with vitamin D-dependent rickets. **Results:** All cases had delayed motor development, hypotonia, failure to thrive. They had also deformations of long bones and rib cage. The investigations showed hypocalcemia, hypophosphoemia, elevated ALP, PTH, normal or high 25OHD concentration. X-ray of long bones showed decreased of bone density, widening and splaying of the epiphyses and bones fracture. All patients were confirmed with vitamin D-dependent type rickets type 1A by identifying compound heterozygous or homozygous mutations in CYP27B1 gene. **Conclusion:** Molecular testing using next generation sequencing helps confirmation of the vitamin D-dependent rickets, better treatment and genetic counseling.

**Keywords:** vitamin D - dependent ricket, mutations in CYP27B1

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vitamin D giúp cơ thể hấp thu tốt calci và phospho để hình thành và duy trì hệ xương, răng vững chắc và đặc biệt trong quá trình

\*Bệnh viện Nhi Trung Ương

Chịu trách nhiệm chính: Vũ Chí Dũng

Email: dungvu@nch.org.vn

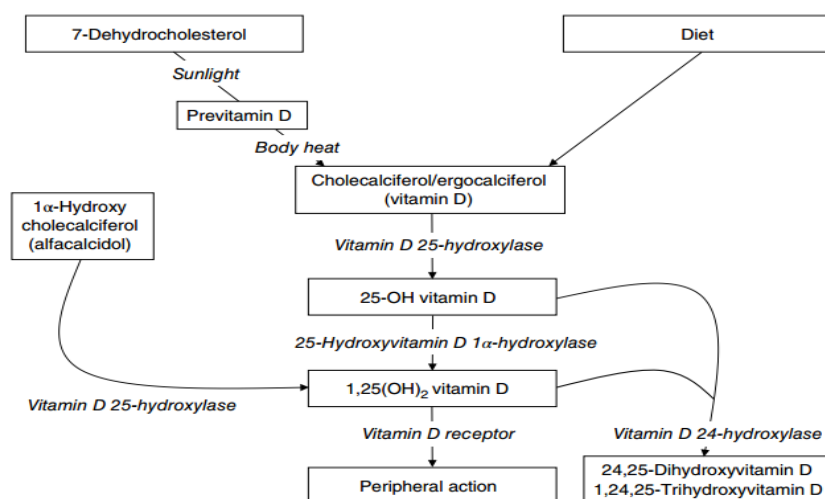
Ngày nhận bài: 2.10.2020

Ngày phản biện khoa học: 14.10.2020

Ngày duyệt bài: 19.11.2020

biệt hoá tế bào. Thiếu vitamin D ở trẻ em có thể dẫn tới bệnh còi xương. Vitamin D có hai dạng là Ergocalciferol (Vitamin D<sub>2</sub>) có nguồn gốc từ thực vật và Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>) có nguồn gốc từ động vật. Trong cơ thể người: Vitamin D<sub>3</sub> được tổng hợp dưới tác dụng của ánh sáng mặt trời từ một loại cholesterol có tên là 7-dehydro-cholesterol nằm ở lớp hạ bì của da, đây là nguồn cung cấp 80% nhu cầu Vitamin D cho cơ thể hàng ngày. Tuy nhiên lượng vitamin D được tổng hợp trong da phụ thuộc vào màu da và mức độ tiếp xúc. Sau khi tổng hợp, chất này sẽ gắn với protein mang đặc hiệu và chuyển đến mô mỡ và gan để tích trữ và tiếp tục quá trình chuyển hoá. Hai dạng vitamin D này đều là các tiền hormone và không tham gia vào hoạt động chuyển hoá, chúng cần phải trải qua quá trình hydroxyl hoá liên tiếp ở gan và thận. Tất cả các bước trong quá trình chuyển hoá vitamin D đều được xúc tác bởi các enzyme cytochrome

P450, đầu tiên là vitamin D hydroxylase. Sản phẩm thu được là 25-hydroxy vitamin D (25OHD). 25OHD được chuyển thành 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D bởi enzyme 25OHD 1 $\alpha$ -hydroxylase (Hình 1). Enzyme 25OHD 1 $\alpha$ -hydroxylase được mã hoá bởi gen CYP27B1. Enzyme này có mặt ở phần xoắn và phần thẳng của ống lượn gần của thận, tuy nhiên enzyme này cũng hoạt động ở các tế bào khác như nguyên bào xương, tế bào sừng, đại thực bào, tế bào lympho. 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D là dạng vitamin D hoạt động thông qua Vitamin D receptor. Chất này được kích thích bởi hormone tuyến cận giáp (PTH), hạ calci máu và hạ phospho máu. PTH tác động lên hoạt tính của enzyme 1 $\alpha$  - hydroxylase thông qua cAMP hoặc protein kinase của nó. Hạ calci máu có thể làm kích thích hoạt động của 1 $\alpha$  - hydroxylase nhưng tác động này thường qua trung gian PTH. Nồng độ phospho trong máu có ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt động 1 $\alpha$  - hydroxylase [1].



Hình 1. Sơ đồ chuyển hoá vitamin D [1].

“Còi xương dinh dưỡng” kinh điển thường xuất hiện ở trẻ lớn và trẻ mới biết đi nhưng cũng có thể gặp khi trẻ lớn hơn. Xét

thí nghiệm sinh hoá thường thấy là hạ calci máu nhẹ, giảm phospho máu, ALP tăng rất nhiều, và khi tình trạng còi xương nặng hơn thì có

thể có triệu chứng của hạ calci máu. Bệnh nhân gặp khó khăn khi đi lại, do yếu cơ và cong chân. Vòng kiềng chữ X hoặc chữ O hoặc cả hai. Vòng cổ tay và vòng cổ chân, chuỗi tràng hạt khá thường gặp. Trẻ thường bị chậm phát triển vận động. Hình ảnh X quang kinh điển của còi xương như điểm cốt hoá xuất hiện chậm; giảm mật độ xương, đầu xương bẻ ra, đường cốt hoá nham nhỏ và lõm (hình càng cua); đôi khi có hình ảnh gãy xương; ở phim chụp ngực có hình ảnh "nút chai" tại chỗ tiếp nối xương sườn và sụn sườn [1].

Những thay đổi về sinh hóa nhìn thấy ở bệnh còi xương liên quan đến sự bất thường của chuyển hóa vitamin D tương tự như trong tình trạng thiếu vitamin D do dinh dưỡng, ngoại trừ các chất chuyển hóa vitamin D. **Còi xương phụ thuộc Vitamin D type 1** (do thiếu hụt  $1\alpha$ -hydroxylase) do đột biến đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép trên gen CYP27B1, và thường xuất hiện khi trẻ ở tuổi biết đi với biểu hiện giảm trương lực cơ, yếu cơ, chậm tăng trưởng, có thể có co giật do hạ calci và có hình ảnh điển hình của còi xương trên hình ảnh Xquang. Nồng độ  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  thường thấp hoặc có thể trong giới hạn bình thường trong khi nồng độ 25OHD và PTH cao. Điều trị bằng bổ sung Calcitriol và Calci đem lại hiệu quả tốt. Bệnh nhân cần được theo dõi và giảm liều để ngăn ngừa tăng calci niệu hoặc tăng calci máu [2].

Gen CYP27B1 nằm trên nhiễm sắc thể số 12 ở vị trí 12q13.1 - q13.3, gen dài xấp xỉ 5Kb, và có 9 exon. Bệnh lý còi xương phụ thuộc Vitamin D type 1 được di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường. Cho đến nay có khoảng hơn 80 đột biến khác nhau đã được

xác định [3]. Một số đột biến trên gen CYP27B1 khá phổ biến ở những quần thể đặc biệt [4], [5]. Để giúp các nhà lâm sàng có chẩn đoán chính xác để lựa chọn liệu pháp thích hợp và tư vấn di truyền phòng bệnh. Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu: mô tả kiểu hình và kiểu gen của bệnh nhân còi xương phụ thuộc vitamin D.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu gồm 5 bệnh nhân có biểu hiện lâm sàng, xquang xương dài và hóa sinh của còi xương nhưng định lượng 25OHD bình thường hoặc tăng.

Nghiên cứu một loạt ca bệnh bao gồm mô tả các triệu chứng lâm sàng, chụp Xquang tuổi xương, xương dài và xương dẹp, cột sống, xét nghiệm hóa sinh bao gồm: canxi toàn phần, ion, phospho, photphatase kiềm, định lượng 25OHD, TPH, urea, creatinine, GOT, GPT, khí máu. DNA được chiết tách từ máu ngoại vi và ứng dụng giải trình tự gen thế hệ mới cho 5447 gen gây bệnh theo quy luật Mendel.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Năm bệnh nhân còi xương phụ thuộc vitamin D được chẩn đoán xác định dựa các biểu hiện lâm sàng, chẩn đoán hình ảnh và trên phân tích đột biến của gen CYP27B1. Biểu hiện lâm sàng và sinh hoá được mô tả trong bảng 1.

Bệnh nhân 1 đi khám lần đầu tiên lúc 9 tháng tuổi vì chưa biết ngồi. Tại thời điểm đó trẻ ăn kém, chậm tăng cân, hay quấy khóc, lồng ngực biến dạng. Trẻ được chẩn đoán suy dinh dưỡng nặng, chậm phát triển vận động không rõ nguyên nhân và không có điều trị đặc hiệu. Lúc 17 tháng trẻ đi khám vì

co giật. Tại thời điểm này trẻ mới biết ngồi, chưa biết đi, cơ lực yếu, có biến dạng xương lồng ngực nặng, chân vòng kiềng chữ X, bướu trán. Xét nghiệm cho thấy tình trạng hạ calci máu, phospho máu thấp, ALP và PTH đều cao (bảng 2). Xquang xương cho thấy hình ảnh điển hình của còi xương. Trẻ được điều trị bằng Calcitriol, Calci và phospho uống. Hiện tại bệnh nhân 22 tuổi, đi lại tốt, cơ lực bình thường, không biến dạng xương dài, mật độ xương tốt. Xét nghiệm sinh hoá: nồng độ Calci, phospho, ALP, PTH bình thường.

Bệnh nhân 2 đi khám lúc 17 tháng tuổi vì lí do trẻ chưa biết đi. Trẻ biết ngồi, đã biết nói từ đơn. Trương lực cơ giảm, biến dạng xương lồng ngực với chuỗi hạt sườn 2 bên. Trẻ có vòng cổ tay, cổ chân và biến dạng các xương dài (bảng 2). Xét nghiệm máu cho thấy hạ calci và phosphomáu, trong khi ALP, PTH tăng cao. Xquang xương dài có hình ảnh giảm mật độ xương, đầu xương dài bẹt ra nhăm nhở và lõm xuống, hình ảnh “nút chai” quan sát thấy trên xquang ngực (hình 2). Bệnh nhân được điều trị bằng Calcitriol, Calci và Phospho uống. Sau 6 tháng điều trị, bệnh nhân đã biết đi, nhanh nhẹn, ít quấy khóc, tăng cân.

Bệnh nhân 3 đến viện khi trẻ 15 tháng vì lí do chậm biết đi. Trẻ mới biết ngồi cách đó 1 tháng, chậm tăng cân, cơ lực yếu, hay quấy khóc. Anh trai của trẻ có biểu hiện tương tự và tử vong lúc 3 tuổi trong bệnh cảnh viêm

phổi nặng. Các xét nghiệm sinh hoá cho thấy tình trạng hạ calci, phospho; tăng ALP, PTH và 25OHD bình thường. Ngoài ra Xquang xương cho thấy hình ảnh điển hình của còi xương. Bệnh nhân đã được điều trị bằng Calcitriol, Calci, Phospho.

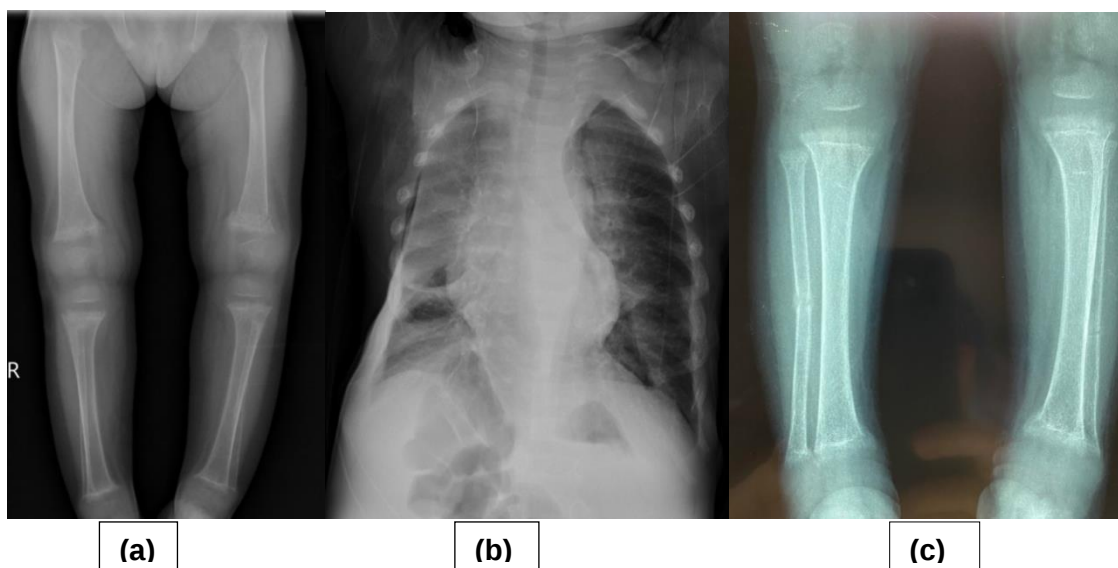
Bệnh nhân 4 đến viện lúc trẻ 19 tháng tuổi vì lí do co giật. Cách vào viện khoảng 3 tuần trẻ xuất hiện co giật toàn thân, đã được chẩn đoán hạ calci máu, tuy nhiên không có điều trị đặc hiệu. Bệnh nhân đến khám tại bệnh viện chúng tôi để tìm nguyên nhân. Ngoài ra trẻ có tình trạng chậm phát triển thể chất nặng (chiều cao và cân nặng theo tuổi < -3SD), kèm theo chậm phát triển vận động (trẻ mới biết đi men), trẻ đi lại yếu, cơ lực giảm, hay quấy khóc về đêm. Trẻ đã biết nói từ đơn. Xương lồng ngực và xương dài biến dạng nhiều. Các xét nghiệm sinh hoá và hình ảnh cho thấy tình trạng còi xương nặng. Bệnh nhân đáp ứng tốt với điều trị bằng Calcitriol, calci và phospho uống.

Bệnh nhân 5 đến viện lúc 18 tháng vì lí do chậm biết đi và yếu hai chân. Trẻ phát triển tinh thần bình thường, hay quấy khóc, chậm tăng cân. Xương lồng ngực biến dạng nặng, vòng cổ tay, cổ chân. Xét nghiệm sinh hoá có hạ calci, phospho và tăng cao ALP, PTH. Xquang xương dài cho thấy nhiều điểm gãy xương cẳng tay, cẳng chân bên cạnh hình ảnh điển hình của còi xương. Bệnh nhân đáp ứng tốt với điều trị bằng Calcitriol, calci và phosphor uống.

**Bảng 1. Triệu chứng lâm sàng và hóa sinh của các bệnh nhân**

| STT | Tuổi chẩn đoán | Lí do vào viện | Calci TP (mmol/l) | Calci ion (mmol/l) | Phospho (nmol/l) | ALP (U/L) | 25OHD (nmol) | PTH (pg/ml) |
|-----|----------------|----------------|-------------------|--------------------|------------------|-----------|--------------|-------------|
| 1   | 17 tháng       | Co giật        | 1,12              | 0,42               | 1,77             | 338       | 86,1         | 83,8        |
| 2   | 17             | Chậm           | 2,17              | 1,05               | 0,57             | 2823      | 450          | 834,6       |

|   | tháng    | biết đi      |      |      |      |       |       |       |
|---|----------|--------------|------|------|------|-------|-------|-------|
| 3 | 15 tháng | Co giật      | 1,25 | 0,53 | 0,89 | 1867  | 99,92 | 500,8 |
| 4 | 19 tháng | Chậm biết đi | 1,18 | 0,53 | 1,04 | 403,7 | 70    | 248,8 |
| 5 | 18 tháng | Chậm biết đi | 1,49 | 0,67 | 1,06 | 2952  | 120,8 | 627,7 |



**Hình 2: Hình ảnh xquang của bệnh nhân trước điều trị**

(a) xương chi dưới của bệnh nhân 2.

(b) xquang ngực thẳng của bệnh nhân 2 với hình ảnh “nút chai”.

(c) xương dài của bệnh nhân 4 với hình ảnh gãy bệnh lý.

**Bảng 3. Xét nghiệm sinh hoá sau 3 tháng điều trị**

| STT | Calci TP (mmol/l) | Calci ion (mmol/l) | Phospho (nmol/l) | ALP (U/L) | 25OHD (nmol) | PTH (ng/ml) |
|-----|-------------------|--------------------|------------------|-----------|--------------|-------------|
| 1   | 2,26              | 1,2                | 1,18             | 124       | 45           | 79          |
| 2   | 2,09              | 0,99               | 1                | 155,17    | 165          | 352,7       |
| 3   | 1,51              | 0,7                | 1,2              | 1705      | 96           | 335,2       |
| 4   | 2,0               | 0,91               | 1,19             | 721,5     | 323          | 245         |
| 5   | 1,73              | 0,75               | 0,8              | 2642      | 94           | 478,1       |



**Hình 3. Xquang bệnh nhân 1 sau nhiều năm điều trị**

Dựa trên biểu hiện lâm sàng, xét nghiệm sinh hoá và hình ảnh Xquang, các bệnh nhân trong nghiên cứu được chẩn đoán là còi xương phụ thuộc Vitamin D. Tất cả các bệnh nhân đều có đột biến đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép trên gen CYP27B1. Kiểu gen của các bệnh nhân được mô tả trong bảng 3.

**Bảng 3. Các đột biến của gen CYP27B1 và kiểu gen của các bệnh nhân**

| Bệnh nhân | cDNA                          | Protein đột biến              |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1         | c.1319_1325dup/c.96_97del     | p.F443PfsX24/<br>p.A33TfsX299 |
| 2         | c.1319_1325dup/c.1319_1325dup | p.F443PfsX24/<br>p.F443PfsX24 |
| 3         | c.1319_1325dup/c.1319_1325dup | p.F443PfsX24/<br>p.F443PfsX24 |
| 4         | c.1319_1325dup/c.96_97del     | p.F443PfsX24/<br>p.A33TfsX299 |
| 5         | c.1319_1325dup/c.96_97del     | p.F443PfsX24/<br>p.A33TfsX299 |

#### IV. BÀN LUẬN

Bệnh lý còi xương được chia thành 2 nhóm lớn: còi xương dinh dưỡng và còi xương do di truyền, trong đó còi xương dinh dưỡng phổ biến hơn nhiều. Còi xương do di truyền thường liên quan đến bất thường chuyển hoá Vitamin D. Trong các nhóm liên quan đến bất thường chuyển hoá Vitamin D, người ta chia thành 4 nhóm sau: còi xương phụ thuộc Vitamin D típ 1A do đột biến trên gen CYP27B1 (dẫn đến thiếu hụt 25OHD 1 $\alpha$ -hydroxylase); còi xương phụ thuộc Vitamin D típ 1B do đột biến trên gen

CYP2R1 (dẫn đến thiếu hụt 25-hydroxylase); còi xương phụ thuộc Vitamin D típ 2A hay còn gọi là còi xương kháng vitamin D là do bất thường của Vitamin D receptor; và cuối cùng là còi xương phụ thuộc vitamin D típ 2B, đây là nhóm hiếm gặp nhất do bất thường biểu hiện của protein liên kết với yếu tố phản ứng hormone làm mất chức năng của vitamin D receptor [5], [6].

Biểu hiện lâm sàng và các xét nghiệm sinh hoá, chẩn đoán hình ảnh của các bệnh nhân còi xương phụ thuộc vitamin D típ 1A gần tương đồng với các bệnh nhân còi xương

đinh dưỡng và còi xương do hạ phospho. Tuy nhiên nồng độ 25OHD bình thường hoặc cao giúp phân biệt còi xương phụ thuộc vitamin D típ 1A với còi xương dinh dưỡng; nồng độ PTH tăng cao và 1,25(OH)<sub>2</sub>D thấp giúp phân biệt còi xương phụ thuộc vitamin D típ 1A với còi xương hạ phospho khác. PTH làm tăng calci máu bằng cách tăng tái hấp thu calci ở ống lượn gần và tăng giải phóng từ xương, đồng thời cũng làm tăng ALP(1). Hầu hết các trường hợp còi xương phụ thuộc vitamin D típ 1A đều có nồng độ 1,25(OH)<sub>2</sub>D rất thấp, tuy nhiên cũng có ít trường hợp nồng độ này bình thường. Do vậy ở những ca bệnh còi xương có nồng độ 25OHD bình thường hoặc cao mặc dù nồng độ 1,25(OH)<sub>2</sub>D trong giới hạn bình thường thì vẫn cần phải nghĩ đến còi xương phụ thuộc vitamin D típ 1A [7].

Gen CYP27B1 là một gen nằm trên nhiễm sắc thể 12 ở vị trí 12q13.3, gen có 9 exon. Gen này mã hoá cho enzyme 1 $\alpha$ -hydroxylase nằm ở màng trong ti thể tế bào thận. Enzyme này giúp chuyển 25OHD thành 1,25 (OH)<sub>2</sub>D, đây là dạng hoạt tính của vitamin D và điều hoà chuyển hoá calci. Đột biến đồng hợp tử và dị hợp tử kép ở trên gen này di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường. Theo Dữ liệu đột biến gen người thì cho đến nay 85 đột biến đã được biết đến, trong đó phần lớn là các đột biến điểm (48/71 đột biến là đột biến vô nghĩa hay vô nghĩa hay đột biến sai nghĩa) và đột biến thêm mất đoạn nhỏ (13/71 đột biến) [3]. Một vài đột biến trên gen CYP27B1 khá thường gặp trong các quần thể đặc biệt. Ví dụ như đột biến mất nucleotid G tại vị trí 958 (958delG) ở hơn 20 gia đình người Canada nói tiếng Pháp, hay đột biến lặp đoạn 7 nucleotid trên exon 8 (Phe443Profs\*24) tìm thấy trên 14 gia đình khác nhau ở các quần thể khác nhau [5].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, mặc dù trên 5 bệnh nhân đến từ 5 gia đình, không có quan hệ cận huyết, chỉ tìm thấy 2 loại đột

biến. Đột biến c.1319\_1325dup (Phe443Profs\*24) thường gặp ở bệnh nhân Hàn Quốc, Nhật Bản... [2]. Đây là đột biến lặp đoạn 7 nucleotid có trình tự CCCACCC dẫn đến xuất hiện sớm bộ ba kết thúc. Đột biến c.96\_97del (p.Ala33Thrfs\*299) cũng là đột biến làm xuất hiện sớm bộ ba kết thúc do xoá đoạn 2 nucleotid.

## V. KẾT LUẬN

Chẩn đoán còi xương phụ thuộc vitamin D típ 1A nên được xem xét khi bệnh nhân có các biểu hiện của còi xương nhưng nồng độ 25OHD bình thường và không đáp ứng với điều trị bằng vitamin D thông thường. Xét nghiệm di truyền phân tử giúp khẳng định chẩn đoán, từ đó giúp điều trị hiệu quả và tiên lượng bệnh nhân tốt hơn và tư vấn di truyền phòng bệnh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Allgrove J.M.C. (2020).** The Parathyroid and Disorders of Calcium and Bone Metabolism. In: Mehul T. Dattani CGDB, editor. Brook's Clinical Pediatric Endocrinology seventh edition. p. 71.
2. **Kim C.J. (2011).** Vitamin D dependent rickets type I. Korean J Pediatr. 54(2):51-4.
3. **The Human Gene Mutation Database** <http://www.hgmd.cf.ac.uk/2019>
4. **Kim C.J., Kaplan L.E., Perwad F. et al. (2007).** Vitamin D 1 $\alpha$ -hydroxylase gene mutations in patients with 1 $\alpha$ -hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 92(8):3177-82.
5. **Wang J.T., Lin C.J., Burr ridge S.M. et al. (1998).** Genetics of vitamin D 1 $\alpha$ -hydroxylase deficiency in 17 families. Am J Hum Genet. 1998;63(6):1694-702.
6. **Malloy P.J., Feldman D. (2012).** Genetic disorders and defects in vitamin D action. Rheum Dis Clin North Am. 2012;38(1):93-106.
7. **Acar S., Demir K., Shi Y. (2017).** Genetic Causes of Rickets. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 9(Suppl 2):88-105.

## NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA CÁC CHỦNG *ESCHERICHIA COLI* SINH BETA-LACTAMASE PHỔ MỞ RỘNG Ở NGƯỜI KHỎE MẠNH SỐNG Ở NÔNG THÔN TỈNH THÁI BÌNH

Khổng Thị Điệp<sup>1</sup>, Nguyễn Nam Thắng<sup>1</sup>, Trần Thị Hòa<sup>1</sup>,  
Phạm Ngọc Khái<sup>1</sup>, Hoàng Thị Thu Hà<sup>2</sup>

### TÓM TẮT

Hiện nay, sự lan truyền của vi khuẩn *E. coli* sinh beta-lactamase phổ mở rộng (ESBL) đang ngày càng gia tăng và trở thành mối đe dọa lớn cho sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới. **Mục tiêu:** Nghiên cứu đặc điểm di truyền của các chủng *E. coli* sinh ESBL nhằm tìm hiểu cơ chế lan truyền gen kháng kháng sinh tại cộng đồng, góp phần giảm bớt những khó khăn trong điều trị trên lâm sàng. **Kết quả nghiên cứu** cho thấy 94,1% các chủng mang gen blaCTX-M và 45,3% số chủng mang gen blaTEM, trong đó có tới 42,3% số chủng mang đồng thời 2 gen mã hóa ESBL. Hầu hết (92,7%) các chủng *E. coli* sinh ESBL mang từ 1 đến 6 plasmid, trong đó phổ biến nhất là các plasmid nhóm IncF. Kết quả Southern blot đã chứng minh 67,7% các chủng *E. coli* sinh ESBL mang các gen mã hóa ESBL trên plasmid. Ở các chủng mang 2 gen mã hóa ESBL trở lên, các gen này có thể nằm trên cùng một plasmid hoặc nằm trên các plasmid khác nhau. **Kết luận:** vi khuẩn *E. coli* phân lập từ người khỏe mạnh mang gen mã hóa ESBL tại Thái Bình rất phổ biến và các gen này có nguy cơ lây lan trong hệ vi sinh vật đường tiêu hóa ở người thông qua hình thức tiếp hợp ở vi khuẩn.

**Từ khóa:** *E. coli*, ESBL, đặc điểm di truyền, plasmid

### SUMMARY

#### GENETIC CHARACTERISTICS OF EXTENDED - SPECTRUM BETA-LACTAMASE PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM HEALTHY INDIVIDUALS IN A RURAL COMMUNITY IN THAI BINH

Currently, the wide dissemination of Extended - Spectrum Beta-Lactamase Producing (ESBL) *Escherichia coli* (*E. coli*) is increasing and becoming a major threat to public health all over the world. **Objective:** analyzed the genetic characteristics of ESBL-producing *E. coli* strains for investigating the transmission mechanism of ESBL-producing *E. coli* in the community. **The results** showed that 94.1% of the strains carried blaCTX-M gene and 45.3% of them carried blaTEM gene; of which 42.3% of the strains carried 2 ESBL coding genes simultaneously. Most (92.7%) of ESBL-producing *E. coli* strains carried one to six plasmids, of which IncF plasmid replicons were the most frequently. The Southern blot analysis result showed that 67.7% of the ESBL-producing *E. coli* strains carried ESBL coding genes on their plasmid. Among the strains harbouring two or more ESBL coding genes, these genes can be on the same plasmid or different plasmids. **Conclusion:** The study showed that *E. coli* carrying ESBL coding genes were very common in healthy individuals in Thai

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Dược Thái Bình

<sup>2</sup>Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương

Chịu trách nhiệm chính: Khổng Thị Điệp

Email: diepkhongtbmu@gmail.com

Ngày nhận bài: 4.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 2.10.2020

Ngày duyệt bài: 19.11.2020

Bình and there was the risk of the dissemination of these genes among the bacteria in human gut microflora by bacterial conjugation.

**Key word:** E. coli, ESBL, genetic characteristic, plasmid.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, thực trạng bùng phát của vi khuẩn Gram âm kháng kháng sinh ngày càng gia tăng, đặc biệt là từ khi các Cephalosporines thế hệ thứ 3 được sử dụng rộng rãi trong điều trị nhiều bệnh nhiễm trùng, các biến đổi nhỏ trong chuỗi gen gốc đã làm thay đổi đáng kể tính ái lực của các enzyme đối với cơ chất, và đã hình thành một nhóm enzyme beta-lactamase phổ mở rộng, hay còn được gọi là ESBL (Extend Spectra Beta-Lactamases) thì vấn đề đề kháng với kháng sinh nhóm này rất đáng lo ngại [1]. Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy tình trạng nhiễm E. coli sinh  $\beta$ -lactamase phổ rộng ngày càng gia tăng không chỉ trong bệnh viện mà trong cả cộng đồng [1].

E. coli sinh ESBL có khả năng kháng kháng sinh cao. Các gen mã hóa ESBL thường nằm trên plasmid nên chúng có thể được lan truyền từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác trong cùng loài. Nguy hiểm hơn, các vi khuẩn E. coli này còn truyền các gen kháng kháng sinh sang cả các loài vi khuẩn gây bệnh khác như Salmonella, Shigella... [3] làm gia tăng tình trạng kháng kháng sinh trong cộng đồng và gây ra những khó khăn trong điều trị lâm sàng. Với thực tế trên, đề tài này nhằm mục tiêu:

*Nghiên cứu đặc điểm di truyền của các chủng E. coli sinh ESBL nhằm tìm hiểu cơ chế lan truyền gen kháng kháng sinh tại cộng đồng, góp phần giảm bớt những khó khăn trong điều trị trên lâm sàng.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: 137 chủng E. coli sinh ESBL phân lập từ người khỏe mạnh tại cộng đồng xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư tỉnh Thái Bình, năm 2016.

- Địa điểm nghiên cứu: Trường Đại học Y Dược Thái Bình.

- Thời gian nghiên cứu: Mẫu phân được thu thập vào tháng 01 năm 2016. Tiến hành phân lập vi khuẩn và thực hiện các thí nghiệm tiếp theo từ năm 2016 đến 2018

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả qua tiến hành phân tích các đặc điểm di truyền của các chủng E. coli sinh ESBL tại phòng thí nghiệm

#### 2.2.2. Kỹ thuật thực hiện trong nghiên cứu

**Xác định kiểu gen mã hóa cho các enzyme beta- lactamase phổ rộng:**

Sử dụng kỹ thuật PCR đa môi để phát hiện sự lưu hành các gen mã hóa ESBL thuộc nhóm blaCTX-M (gồm blaCTX-M-1, blaCTX-M-2, blaCTX-M-8/25, blaCTX-M-9); nhóm blaTEM và blaSHV. Trình tự môi, thành phần phản ứng và điều kiện phản ứng tương tự như nghiên cứu đã trước đây của chúng tôi [4].

**Xác định đặc điểm replicon của plasmid bằng PCR:**

Dựa vào 3 phản ứng PCR đa môi xác định sự xuất hiện của 18 loại plasmid phổ biến ở các chủng E. coli sinh ESBL. Trình tự môi được thiết kế đặc hiệu cho các replicon của plasmid dựa theo nghiên cứu của Carattoli và cộng sự (2005) [5].

**Xác định vị trí các gen mã hóa ESBL trên plasmid bằng kỹ thuật Southern blot**

Vị trí các gen mã hóa ESBL trên plasmid

của các chủng *E. coli* sinh ESBL được xác định bằng phương pháp Southern blot sử dụng các mẫu dò đặc hiệu với các gen blaTEM, blaCTX-M-1 và blaCTX-M-9 được đánh dấu trực tiếp bằng enzyme horseradish peroxidase. Các bước tiến hành được thực hiện bằng bộ kit ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection Systems (Amersham) theo hướng dẫn của nhà sản

xuất.

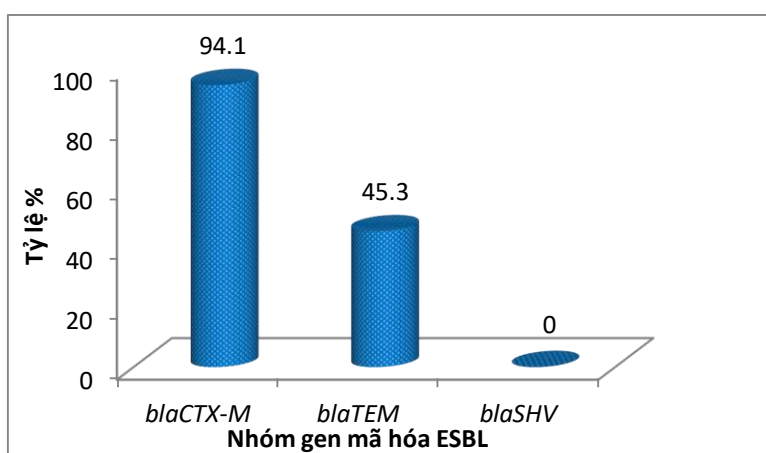
#### 2.4. Xử lý kết quả nghiên cứu

Các kết quả nghiên cứu được xử lý và phân tích bằng phần mềm SPSS 22.0

#### 2.5. Đạo đức trong nghiên cứu

Các nội dung nghiên cứu của đề tài đã phê duyệt bởi được Hội đồng Đạo đức nghiên cứu của Trường Đại học Y Dược Thái Bình.

### III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU



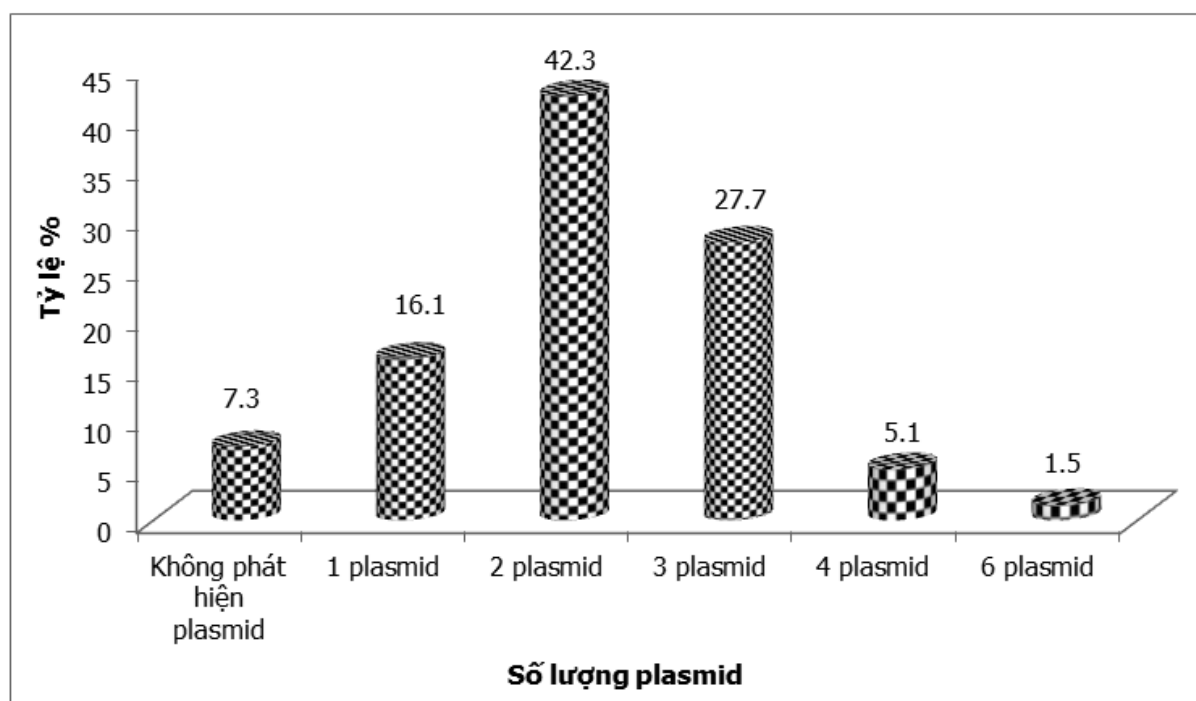
**Biểu đồ 1. Tỷ lệ các nhóm gen mã hóa ES BL ở các chủng *E. coli* sinh ESBL**

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi (biểu đồ 1) cho thấy có tới 94,1 % các chủng *E. coli* sinh ESBL mang nhóm gen blaCTX-M, 45,3% mang nhóm gen blaTEM và không phát hiện chủng nào mang nhóm gen blaSHV

**Bảng 1. Tỷ lệ xuất hiện các kiểu gen mã hóa ESBL của *E. coli* sinh ESBL**

| Kiểu gen mã hóa ESBL                | Số lượng   | Tỷ lệ (%)    |
|-------------------------------------|------------|--------------|
| blaCTX-M-1                          | 13         | 9,5          |
| blaCTX-M-1/CTX-M-9                  | 1          | 0,7          |
| blaCTX-M-1/CTX-M-9/TEM              | 1          | 0,7          |
| blaCTX-M-1/TEM                      | 23         | 16,8         |
| blaCTX-M-9                          | 58         | 42,3         |
| blaCTX-M-9/TEM                      | 33         | 24,1         |
| blaTEM                              | 5          | 3,6          |
| Không phát hiện được các gen ở trên | 3          | 2,2          |
| <b>Tổng</b>                         | <b>137</b> | <b>100,0</b> |

Kiểu gen phổ biến nhất là blaCTX-M-9 (42,3%), tiếp đến blaCTX-M-9/TEM (24,1%) và blaCTX-M-1/TEM (16,8%). Các kiểu gen khác chiếm tỷ lệ thấp.



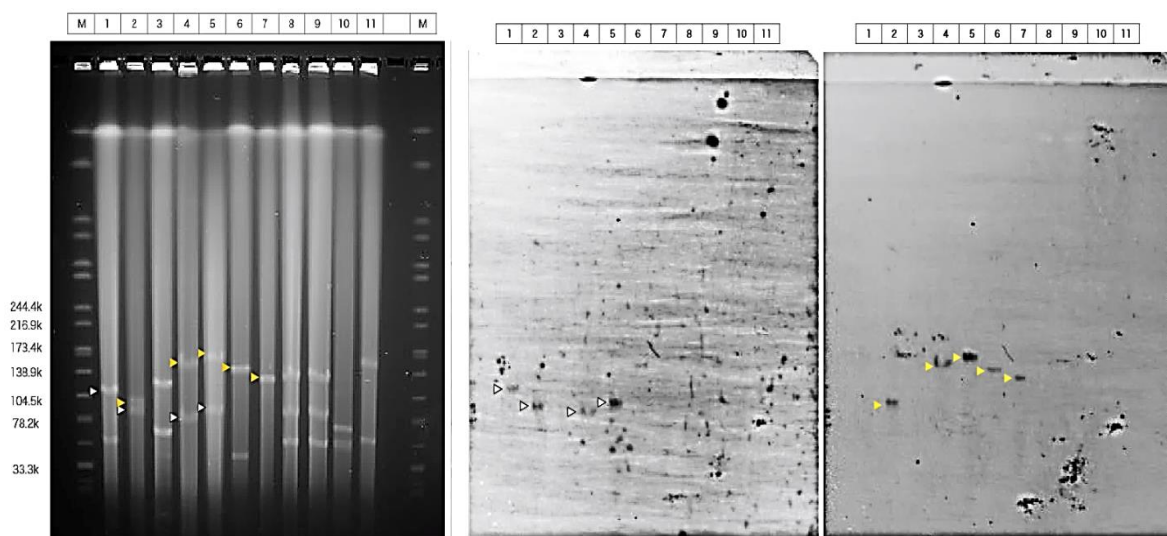
**Biểu đồ 2. Số lượng plasmid ở các chủng *E. coli* sinh ESBL**

Trong 137 chủng nghiên cứu, chúng tôi phát hiện có 127 chủng (chiếm 92,7%) mang plasmid. Trên một chủng vi khuẩn có thể mang từ 1 đến 6 plasmid, trong đó phổ biến nhất là các chủng mang 2 plasmid (42,3%). Tuy nhiên chúng tôi không phát hiện được plasmid ở 10/137 chủng (7,3%).

**Bảng 2. Tỷ lệ các loại plasmid ở vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL**

| Loại plasmid | Số lượng | Tỷ lệ (%) | Loại plasmid | Số lượng | Tỷ lệ (%) |
|--------------|----------|-----------|--------------|----------|-----------|
| B/O          | 30       | 21,90     | K/B          | 4        | 2,92      |
| FIC          | 4        | 2,92      | I1           | 13       | 9,49      |
| A/C          | 2        | 1,46      | Frep         | 71       | 51,82     |
| P            | 6        | 4,38      | X            | 6        | 4,38      |
| T            | 2        | 1,46      | HI1          | 5        | 3,65      |
| FIIA         | 2        | 1,46      | N            | 5        | 3,65      |
| FIA          | 34       | 24,82     | HI2          | 6        | 4,38      |
| FIB          | 78       | 56,93     | L/M          | 4        | 2,92      |
| Y            | 11       | 8,03      | W            | 0        | 0,00      |

Phân tích đặc điểm plasmid của các chủng *E. coli* sinh ESBL, chúng tôi phát hiện được 17/18 plasmid thường gặp ở *E. coli*. Trong đó phổ biến nhất là các plasmid thuộc nhóm IncF như FIB (56,93%), Frep (51,82%), FIA (24,82%). Tiếp đến là các plasmid thuộc nhóm IncI như B/O (21,9%), K/B (2,92%) và I1 (9,49%). Các plasmid thuộc các nhóm khác chiếm tỷ lệ thấp. Không phát hiện chủng nào mang plasmid W.



**Kết quả PFGE trước lai**

**Lai với đầu dò CTX-M-1**

**Lai với đầu dò TEM**

**Hình 1: Hình ảnh minh họa kết quả lai Southern blot với các mẫu dò đặc hiệu**

Kết quả phân tích vị trí các gen mã hóa ESBL bằng kỹ thuật Southern blot ở 37 chủng *E. coli* sinh ESBL cho thấy: 25/37 chủng (chiếm 67,6%) mang gen mã hóa ESBL trên các plasmid có kích thước từ 56,7 kb đến 157 kb. Trong số 11 chủng mang gen blaCTX-M-1 hoặc blaCTX-M-1/blaTEM có 6/11 chủng phát hiện được các plasmid có chứa blaCTX-M-1 và/hoặc blaTEM. Trong đó 3 chủng mang cả gen blaCTX-M-1 và blaTEM trên cùng 1 plasmid, 2 chủng chỉ mang gen blaTEM và 1 chủng chỉ mang blaCTX-M-1. Với 26 chủng mang blaCTX-M-9 hoặc blaCTX-M-9/blaTEM chúng tôi phát hiện 18 chủng có plasmid mang gen blaCTX-M-9 và 4 chủng có plasmid mang đồng thời gen blaCTX-M-9 và gen blaTEM. Các chủng còn lại không phát hiện gen mã hóa ESBL trên plasmid có thể là do gen nằm trên nhiễm sắc thể hoặc nằm trên một loại plasmid mà kỹ thuật này không thể phát hiện.

#### IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ các chủng mang nhóm gen blaCTX-M là 94,1%, gen blaTEM là 45,3% và không phát hiện chủng nào mang nhóm gen blaSHV (biểu đồ 1). Sự phân bố các gen mã hóa ESBL trong nghiên cứu này của chúng tôi tương tự như kết quả của một số nghiên cứu được thực hiện tại Việt Nam và trên thế giới trong thời gian gần đây [1, 6]. Điều đó cho thấy khuynh hướng phân bố các gen mã hóa ESBL ở Việt Nam cũng tương tự trên thế giới với sự phân bố phổ biến và rộng khắp của nhóm gen blaCTX-M thay cho các gen blaTEM và blaSHV như trước đây.

Các chủng *E. coli* sinh ESBL có kiểu gen khá đa dạng, mỗi chủng có thể mang từ 1 đến 3 gen mã hóa ESBL, trong đó phổ biến nhất là các chủng mang kiểu gen blaCTX-M-9 (42,3%), tiếp đến là các chủng mang kiểu gen phối hợp blaCTX-M/TEM như blaCTX-

M-9/TEM (24,1%) và blaCTX-M-1/TEM (16,8%) (bảng 1). Đáng lưu ý là có tới 42,3% (58/137) số chủng mang 2 hoặc 3 gen mã hóa ESBL. Sự xuất hiện đồng thời nhiều gen mã hóa ESBL trên cùng một chủng vi khuẩn sẽ làm thay đổi kiểu hình kháng kháng sinh theo hướng phức tạp hơn, làm cho vi khuẩn có thể kháng cùng lúc nhiều loại kháng sinh, dẫn đến nguy cơ xuất hiện các chủng kháng đa thuốc.

Plasmid là một trong những yếu tố di truyền động có vai trò quan trọng trong sự lan truyền các gen kháng kháng sinh. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy 92,7% số chủng mang plasmid. Trên 1 chủng có thể mang từ 1 đến 6 plasmid, trong đó phổ biến nhất là các chủng mang 2 plasmid (42,3%), tiếp đến là các chủng mang 3 plasmid (27,7%) và 1 plasmid (16,1%). Các chủng mang từ 4 plasmid trở lên chiếm tỷ lệ thấp (biểu đồ 2).

Kết quả nghiên cứu cho thấy các loại plasmid ở các chủng E. coli sinh ESBL khá đa dạng với tổng số 17/18 loại plasmid được phát hiện. Trong đó các plasmid thuộc nhóm IncF là phổ biến nhất (FIB: 56,93%; Frep: 51,82%; FIA: 24,82%, FIC: 2,92%); tiếp đến là các plasmid nhóm IncI (B/O: 21,9% ; K/B: 2,92%, I1: 9,49% ); các loại plasmid P, T, Y, K/B, X, HI1, N, HI2, L/M xuất hiện với tỷ lệ thấp và không phát hiện chủng nào mang plasmid W (bảng 2). Theo các nghiên cứu trước đây, IncF được chứng minh là nhóm plasmid chủ yếu chứa các gen mã hóa ESBL và có liên quan đến sự lan truyền các gen mã hóa ESBL [7, 8]. Vì vậy sự lưu hành các plasmid nhóm IncF phổ biến ở E. coli có thể là điều kiện thuận lợi để các

chủng vi khuẩn này có thể lan truyền các gen mã hóa ESBL trong cộng đồng.

Các nghiên cứu dịch tễ học phân tử cho thấy phần lớn các gen mã hóa ESBL ở các vi khuẩn Enterobacteriaceae nằm trên các plasmid có kích thước lớn (50 kb đến >500 kb), tuy nhiên gen mã hóa ESBL cũng có thể nằm trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn [8]. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng kỹ thuật Southern blot nhằm xác định vị trí của các gen mã hóa ESBL trên plasmid. Kết quả lai 37 chủng E. coli sinh ESBL cho thấy 25/37 chủng (chiếm 67,6%) mang gen mã hóa ESBL nằm trên plasmid có kích thước từ 56,7 kb đến 157 kb. Ở những chủng vi khuẩn mang 2 gen mã hóa ESBL trở lên, chúng tôi nhận thấy các gen này có thể nằm trên cùng 1 plasmid hoặc trên các plasmid khác nhau. Hiện tượng các gen kháng thuốc chủ yếu nằm trên plasmid, đặc biệt là khi các gen kháng thuốc nằm trên cùng 1 plasmid sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho sự lan truyền các gen kháng kháng sinh trong cộng đồng bởi lẽ plasmid là con đường chủ yếu lan truyền các gen kháng kháng sinh [8]. Thông qua plasmid, các gen kháng thuốc có thể truyền từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác trong cùng loài hoặc khác loài, thậm chí là từ vi khuẩn không gây bệnh sang vi khuẩn gây bệnh, làm gia tăng tình trạng kháng thuốc trong cộng đồng.

## V. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy kiểu gen mã hóa ESBL ở vi khuẩn E. coli sinh ESBL phân lập được từ người khỏe mạnh tại Thái Bình rất đa dạng với sự lưu hành phổ biến của nhóm gen blaCTX-M và gen blaTEM. Tỷ lệ số chủng E. coli sinh ESBL mang 2

hoặc 3 gen kháng thuốc lên tới 42,3% cho thấy nguy cơ xuất hiện các chủng đa kháng thuốc là rất cao. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy hầu hết (92,7%) các chủng E. coli sinh ESBL mang từ 1 đến 6 plasmid, trong đó phổ biến nhất là các plasmid nhóm IncF. Ngoài ra, phần lớn (67,7%) các chủng E. coli sinh ESBL mang các gen mã hóa ESBL trên plasmid. Sự đa dạng về kiểu loại và số lượng plasmid, đặc biệt là sự xuất hiện phổ biến của các plasmid nhóm IncF có thể là yếu tố thuận lợi cho sự lan truyền gen mã hóa ESBL ở vi khuẩn E. coli trên người khỏe mạnh.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Paterson D. L. & Bonomo R. A. (2005)**, "Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update", *Clin Microbiol Rev*, 18(4): 657 - 686.
2. **Coque T.M, Baquero F, Canton R. (2008)** "Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe", *Euro Surveillance*, 13 (47): 1 - 11.
3. **Partridge S. R., Kwong S. M., Firth N. & Jensen S. O. (2018)**, "Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance", *Clin Microbiol Rev*, 31:e00088-17.
4. **Khổng Thị Diệp, Nguyễn Nam Thắng , Phạm Ngọc Khái & Hoàng Thị Thu Hà (2017)**, "Một số đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn Escherichia coli sinh men beta-lactamase phổ rộng phân lập từ mẫu phân người khỏe mạnh tại xã Nguyên Xá, Huyện Vũ Thư, Tỉnh Thái Bình, năm 2013", *Tạp chí Y học Dự phòng*, 27 (9): 26 - 31.
5. **Carattoli Alessandra, Bertini Alessia, Villa Laura et al (2005)**, "Identification of plasmids by PCR-based replicon typing", *Journal of Microbiological Methods*, 63 (3): 219 - 228.
6. **Nakayama Tatsuya, Ueda Shuhei, Huang Bui Thi Mai et al (2015)**, "Wide dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli in community residents in the Indochinese peninsula", *Infection and drug resistance*, 8: 1-5.
7. **Couturier M., Bex F., Bergquist P. L. & Maas W. K. (1988)**, "Identification and classification of bacterial plasmids", *Microbiological reviews*, 52 (3): 375 - 395.
8. **Rozwandowicz M., Hordijk J., Mevius D. J. et al (2018)**, "Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5): 1121 - 1137.

## ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ SÀNG LỌC HUYẾT THANH MẸ TRONG PHÁT HIỆN THAI BẤT THƯỜNG NHIỄM SẮC THỂ

Nguyễn Thị Hảo<sup>1,2</sup>, Trần Anh Tú<sup>2</sup>, Tăng Xuân Hải<sup>2</sup>,  
Lương Thị Kim Oanh<sup>2</sup>, Lê Thế Thắng<sup>2</sup>, Hoàng Thị Ngọc Lan<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Để hạn chế ảnh hưởng của dị tật bẩm sinh (DTBS) nhằm nâng cao chất lượng dân số cần phát hiện sớm và can thiệp sớm. Các biện pháp phát hiện sớm hiện nay đang sử dụng chủ yếu là sàng lọc, chẩn đoán trước sinh tải lh. Các phương pháp chẩn đoán trước sinh để phát hiện các bất thường di truyền cho thai đều cần phải có tế bào có nguồn gốc từ thai như tế bào ối, tế bào tua rau, tế bào máu cuống rốn,... Hầu hết các kỹ thuật này đều xâm phạm đến buồng ối, có thể gây các tai biến cho thai, cho mẹ. Vì vậy, nhằm giảm bớt những can thiệp không cần thiết, chúng ta nên tiến hành sàng lọc trước sinh để loại bớt những trường hợp thai có nguy cơ thấp mắc DTBS. **Mục tiêu:** Đánh giá kết quả sàng lọc huyết thanh (SLHT) mẹ trong phát hiện thai bất thường nhiễm sắc thể (NST). **Phương pháp nghiên cứu:** 234 thai phụ có kết quả SLHT mẹ được siêu âm, chọc hút dịch ối tại Bệnh viện Sản nhi Nghệ An và phân tích NST tế bào ối tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương từ tháng 2/2018 đến tháng 7/2020. Các số liệu được nhập và xử lý theo chương trình SPSS 20.0 của WHO và phần mềm Microsoft Excel 2010. **Kết quả:** Tỷ lệ bất thường NST của nghiên cứu này là 8,55% với bất thường số lượng NST (80%) chiếm tỉ lệ cao hơn bất thường cấu trúc NST (20%). Tỷ lệ thai bất thường NST có SLHT mẹ nguy cơ cao là 80,0% trong đó

thai hội chứng (HC) Down chiếm tỉ lệ cao nhất (65,0%) với giá trị tiên đoán dương tính nói chung là 8,04%. **Kết luận:** Tỷ lệ bất thường NST chung là 8,55%. Tỷ lệ thai HC Down 5,56%. Dựa vào sàng lọc huyết thanh mẹ dự báo nguy cơ dương tính cho bất thường NST chung là 8,04%.

**Từ khóa:** Sàng lọc, chẩn đoán trước sinh, nhiễm sắc thể, hội chứng Down.

### SUMMARY

#### ASSESSMENT OF MATERNAL SERUM SCREENING TO DETECT FETAL CHROMOSOMAL ABNORMALITIES

**Objective:** Evaluate the value of maternal serum screening for detecting fetal chromosomal abnormalities. **Methods of Research:** 234 pregnant women with serum screening and fetal ultrasound results underwent amniocentesis at Nghe An Obstetrics Hospital and analyzed chromosomal aberrations in amniotic fluid cells cultures at the Central Obstetrics Hospital from February 2018 to July 2020. The data were analysed using SPSS 20.0 software and Microsoft Excel 2010. **Results:** The prevalence of abnormal chromosomes is 8,55% with numerical chromosomal abnormalities (80%) accounts for a higher proportion, compared to structural chromosomal abnormalities (20%); Down syndrome accounts for the highest proportion (5,56%). About maternal serum screening: Positive Predictive Value for chromosomal abnormalities of fetus are 8,04%. **Conclusion:** The prevalence of abnormal chromosomes is 8,55% ; Down syndrome accounts for the highest proportion (5,56%). About maternal serum screening: Positive Predictive Value for

<sup>1</sup>Đại học Y Hà Nội,

<sup>2</sup>Bệnh viện Sản nhi Nghệ An

Chịu trách nhiệm chính: Hoàng Thị Ngọc Lan  
Email: hoangthingoclan@hmu.edu

Ngày nhận bài: 26.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 6.10.2020

Ngày duyệt bài: 20.11.2020

chromosomal abnormalities of fetus are 8,04%.

**Key words:** Prenatal screening, prenatal diagnosis, chromosome, Down syndrome.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

DTBS là một trong những nguyên nhân chính gây tử vong và bệnh tật của trẻ trong những năm đầu cuộc sống. Vì vậy, sàng lọc và chẩn đoán trước sinh luôn là những ưu tiên hàng đầu của ngành y tế nhằm nâng cao chất lượng dân số. Để chẩn đoán trước sinh cần phải có tế bào có nguồn gốc từ thai như tế bào ối, tế bào tua rau, tế bào máu cuống rốn. Trong đó, phương pháp chọc hút dịch ối được sử dụng rộng rãi vì kết quả cao, dễ thực hiện và ít gây tai biến cho thai cũng như cho mẹ. Tại Bệnh viện Sản Nhi Nghệ An chọc ối được triển khai tại Trung tâm sàng lọc chẩn đoán trước sinh và sơ sinh từ tháng 02/2018.

Xuất phát từ những lí do trên, chúng tôi tiến hành đề tài này với mục tiêu: Đánh giá kết quả của sàng lọc huyết thanh mẹ để phát hiện thai bất thường NST.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Đối tượng:** 234 thai phụ có kết quả SLHT mẹ được siêu âm, chọc hút dịch ối tại Bệnh viện Sản nhi Nghệ An và được phân tích NST tế bào ối tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương theo tiêu chuẩn của hội nghị quốc tế về Di truyền người 2013 (ISCN) từ tháng 2/2018 đến tháng 7/2020. Các số liệu được nhập và xử lí theo chương trình SPSS 20.0 của WHO và phần mềm Microsof Excel 2010.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu:

Nghiên cứu hồi cứu, tiền cứu - mô tả cắt ngang.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Đánh giá kết quả sàng lọc huyết thanh mẹ để phát hiện bất thường NST

**Bảng 1: Kết quả phân tích NST tế bào ối trong nghiên cứu**

| Kết quả                |                 | Số lượng   | Tỉ lệ (%) |             |               |
|------------------------|-----------------|------------|-----------|-------------|---------------|
| Bất thường về số lượng | HC Down         | 12         | 60,0      | 16/20(80,0) | 20/234 (8,55) |
|                        | HC Edwards      | 1          | 5,0       |             |               |
|                        | HC Patau        | 0          | 0         |             |               |
|                        | HC Klinefelter  | 2          | 10,0      |             |               |
|                        | Bất thường khác | 1          | 5,0       |             |               |
| Bất thường về cấu trúc | HC Down         | 1          | 5,0       | 4/20 (20,0) |               |
|                        | Bất thường khác | 3          | 15,0      |             |               |
| Bình thường            |                 | 214        |           |             | 91,45         |
| <b>Tổng</b>            |                 | <b>234</b> |           |             | <b>100</b>    |

**Bảng 2. Giá trị của sàng lọc huyết thanh mẹ để phát hiện thai bất thường NST**

| Kết quả SLHT mẹ | Kết quả NST tế bào ối |             | Tổng số    |
|-----------------|-----------------------|-------------|------------|
|                 | Bất thường            | Bình thường |            |
| Nguy cơ cao     | 16                    | 183         | 199        |
| Nguy cơ thấp    | 4                     | 31          | 35         |
| <b>Tổng số</b>  | <b>20</b>             | <b>214</b>  | <b>234</b> |

SLHT mẹ nguy cơ cao với một trong các bất thường (HC Down, HC Edwards, HC Patau).

**Nhận xét:**

- Tỷ lệ thai bất thường NST:  $20/234 = 8,55\%$

- Giá trị tiên đoán dương tính:  $16/199 = 8,04\%$

35 thai phụ có SLHT mẹ nguy cơ thấp là các thai có dấu hiệu siêu âm bất thường và/hoặc tiền sử thai sản bất thường.

### 3.2. Đánh giá kết quả SLHT mẹ trong phát hiện thai mắc HC Down

**Bảng 3. Giá trị SLHT mẹ để phát hiện thai mắc HC Down**

| Kết quả sàng lọc HTM | Kết quả NST tế bào ối |                     | Tổng số    |
|----------------------|-----------------------|---------------------|------------|
|                      | HC Down               | Không phải HC Down  |            |
| Nguy cơ cao*         | 12 (6,12%)            | 184 (93,88%)        | 196        |
| Nguy cơ thấp         | 1 (2,63%)             | 37 (97,37%)         | 38         |
| <b>Tổng số</b>       | <b>13 (5,56%)</b>     | <b>221 (94,44%)</b> | <b>234</b> |

**Ghi chú:**

\* Ngưỡng nguy cơ cao HC Down theo sinh hóa  $> 1/320$ .

Thai có nguy cơ thấp mắc HC Down theo sinh hóa  $< 1/320$ .

**Nhận xét:**

- 196/234 thai có nguy cơ cao mắc HC Down. Trong đó có 12 thai HC Down (có 1 thai HC Down chuyển đoạn

46,XX,+21,rob(14,21)(q10q10) và 11 thai Down 47,+21) và 1 thai HC Down có kết quả SLHT mẹ nguy cơ thấp nhưng có bất thường siêu âm thai.

- Tỷ lệ thai HC Down:  $13/234 = 5,56\%$ .

- Tỷ lệ thai HC Down trong số bất thường:  $13/20 = 65,0\%$ .

- Giá trị tiên đoán dương tính:  $12/196 = 6,12\%$

### 3.3. Đánh giá kết quả SLHT mẹ để phát hiện thai mắc HC Edwards

**Bảng 4. Giá trị của SLHT mẹ để phát hiện thai mắc HC Edwards**

| Kết quả sàng lọc HTM | Kết quả NST tế bào ối |                       | Tổng số    |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------|
|                      | HC Edwards            | Không phải HC Edwards |            |
| Nguy cơ cao*         | 1 (14,29%)            | 6 (85,71%)            | 7          |
| Nguy cơ thấp         | 0 (0%)                | 227 (100%)            | 227        |
| <b>Tổng số</b>       | <b>1 (0,43%)</b>      | <b>233 (99,57%)</b>   | <b>234</b> |

\*Nguy cơ cao cho HC Edwards  $> 1/100$ : Nguy cơ thấp cho HC Edwards

**Nhận xét:**

Có 7/234 thai có nguy cơ cao cho HC Edwards (6 trường hợp có cả nguy cơ cao cho HC Down và 1 trường hợp nguy cơ cao chỉ cho HC Edward). Trong đó có 1 trường

hợp thai mắc HC Edwards.

- Tỷ lệ thai HC Edwards trong nghiên cứu:  $1/234 = 0,4\%$ .

- Tỷ lệ thai HC Edward trong số bất thường NST:  $1/20 = 5,0\%$ .

- Giá trị tiên đoán dương tính:  $1/7 = 14,29\%$ .

**3.4. Đánh giá kết quả SLHT mẹ trong phát hiện thai mắc bất thường NST khác****Bảng 5. Giá trị của SLHT mẹ để phát hiện thai mắc bất thường NST khác**

| Bất thường khác | Kết quả SLHT mẹ |              | Tổng số |
|-----------------|-----------------|--------------|---------|
|                 | Nguy cơ cao     | Nguy cơ thấp |         |
| 47,XXY          | 2               | 0            | 2       |
| 47,XYY          | 1               | 0            | 1       |
| inv(9)(p13q13)  | 0               | 1            | 1       |
| 47,+Mar         | 0               | 2            | 2       |
| Tổng số         | 3               | 3            | 6       |

**Nhận xét:** Có 3 bất thường số lượng NST giới tính đều có SLHT mẹ nguy cơ cao cho HC Down và 3 bất thường cấu trúc NST đều SLHT mẹ nguy cơ thấp nhưng có siêu âm thai bất thường (đa ối, dây rốn 1 động mạch, dị tật tim, dị tật thần kinh, dị tật tiết niệu).

**IV. BÀN LUẬN****Tỉ lệ thai bất thường NST**

Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), mỗi năm ước tính có khoảng 7,9 triệu trẻ em được sinh ra với một DTBS nghiêm trọng có nguồn gốc hoặc một phần từ di truyền và có khoảng 7% tổng số trẻ được sinh ra trên toàn thế giới bị mắc một DTBS sinh nghiêm trọng có thể gây tử vong hoặc dẫn đến tàn tật suốt đời [1]. Trên thực tế, tỉ lệ thai bất thường NST chắc chắn còn cao hơn vì nhiều thai bất thường NST với các dị tật nặng đã bị sảy trước khi được sinh ra.

Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện trên 234 thai phụ có chỉ định chọc ối, phát hiện 20 trường hợp có bất thường NST chiếm 8,55%. Kết quả của chúng tôi cao hơn của Zhang Y.P. (2011) (2,81%) [2] và Park S.Y. (2001) (3,1%) [3], Zhang L. (2010) (3,99%) [4], Hoàng Thị Ngọc Lan (2016) (4,28%) [5], sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi khác với 2 nghiên cứu của Zhang Y.P và Park S.Y có thể do họ tiến hành sàng lọc và chỉ định

chọc ối rộng rãi hơn với ngưỡng sàng lọc tuổi là 35 tuổi. Chỉ định này chiếm gần 30-50% số trường hợp.

Trong số 20 thai bất thường NST, bất thường số lượng NST chiếm 80,0%, bất thường cấu trúc chiếm 20,0%. Kết quả của chúng tôi khác với Hoàng Thị Ngọc Lan (2016) [5]: tỉ lệ bất thường về số lượng 71,23%, tỉ lệ bất thường về cấu trúc 28,77%. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

Trong các bất thường NST, HC Down là bất thường hay gặp nhất với tỉ lệ  $13/20 = 65,0\%$  thai bất thường NST, chiếm 5,56% tổng số thai nghiên cứu. Kết quả của chúng tôi cũng tương tự với nghiên cứu của Zhang Y.P (2011), Hoàng Thị Ngọc Lan (2016), Daniela N(2010) [3], [5],[6] thai hội chứng Down gặp phổ biến hơn nhiều so các bất thường NST khác.

Như vậy, tỉ lệ thai bất thường NST trong khoảng 4 - 8%, trong đó thai mắc bất thường số lượng NST chiếm đa số, thai bất thường về cấu trúc NST chiếm tỉ lệ thấp hơn và thai mắc HC Down là hay gặp nhất.

### **Giá trị của SLHT mẹ trong phát hiện thai HC Down, HC Edwards**

Với 234 thai phụ làm SLHT mẹ đã phát hiện 20 thai bất thường NST có  $199/234=85,04\%$  trường hợp có SLHT mẹ nguy cơ cao, trong đó có 16 trường hợp có bất thường NST chiếm 80,0% tổng số bất thường NST với giá trị tiên đoán dương tính chung cho các bất thường NST là  $16/199=8,04\%$ .

Trong 234 trường hợp làm SLHT mẹ có 196 trường hợp có nguy cơ cao mắc HC Down. Số thai HC Down trong tổng số thai phụ được làm SLHT là 13 thai, trong đó 12 thai có nguy cơ cao với HC Down chiếm tỉ lệ  $12/13=92,31\%$  với giá trị tiên đoán dương tính là 6,12%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn trong nghiên cứu của Hoàng Thị Ngọc Lan (2016) [5] (94,29%).

Trong 234 thai phụ làm SLHT có 7 trường hợp nguy cơ cao với HC Edwards, trong đó có 1 thai mắc HC Edwards. Tỉ lệ thai HC Edwards trong nghiên cứu là  $1/234=0,4\%$  và trong số bất thường NST là  $1/20=5,0\%$  xếp thứ 3 sau HC Down và HC Klinefelter.

### **Đánh giá kết quả SLHT mẹ trong phát hiện bất thường NST khác**

Có 6 trường hợp bất thường NST khác với HC Down, HC Edwards. Trong đó có 3 bất thường số lượng NST giới tính đều có kết quả SLHT mẹ nguy cơ cao cho HC Down và 3 bất thường cấu trúc NST có SLHT mẹ nguy cơ thấp nhưng đều có siêu âm thai bất thường.

Như vậy khi kết quả sàng lọc thai nguy cơ cao cho HC Down thì không chỉ phát hiện thai HC Down mà còn phát hiện các thai có

bất thường NST khác mà cụ thể trong nghiên cứu này chúng tôi đã phát hiện 2 thai mắc HC Klinefelter và 1 thai HC 47,XYX.

Với 3 thai bất thường cấu trúc NST có 2 thai thêm vật liệu di truyền (47,+Mar) đều có siêu âm thai bất thường, nhưng kết quả SLHT mẹ thuộc nhóm nguy cơ thấp. Với tổng số 4 trường hợp bất thường cấu trúc (1 thai HC Down chuyển đoạn, 2 thai 47,+Mar, 1 đảo đoạn NST) thì khi sử dụng siêu âm, chúng ta phát hiện được 3/4 trường hợp thai bất thường cấu trúc NST và sử dụng SLHT mẹ phát hiện được 1/4 trường hợp thai bất thường cấu trúc NST. Như vậy nên phối hợp các phương pháp sàng lọc (siêu âm thai, SLHT mẹ) để hạn chế các trường hợp bất thường di truyền của thai mà không được phát hiện. Đặc biệt với các bất thường cấu trúc NST của thai chúng ta cần xác định NST của bố mẹ để tư vấn di truyền có hiệu quả cho những lần mang thai tiếp theo của họ hoặc cho những đứa con đã sinh ra đời của họ.

Nhưng cũng có một số trường hợp thai đột biến cấu trúc NST (các đột biến nhỏ hoặc đột biến ở dạng cân bằng) không biểu hiện bất thường trên siêu âm thai nhưng lại cho kết quả SLHT mẹ nguy cơ cao cho bất thường NST.

Vì vậy, cần tiến hành làm SLHT mẹ song song với siêu âm thai cho tất cả các thai phụ để tránh bỏ sót các bất thường NST (nhất là các bất thường cấu trúc NST).

### **V. KẾT LUẬN**

- Tỉ lệ bất thường NST của nghiên cứu này là 8,55%. Bất thường số lượng NST chiếm 80%, bất thường cấu trúc chiếm 20%

- Tỷ lệ thai bất thường NST có SLHT mẹ nguy cơ cao là 80,0% trong đó thai HC Down chiếm tỷ lệ cao nhất (65,0%) với giá trị tiên đoán dương tính của sàng lọc huyết thanh mẹ nói chung cho bất thường NST là 8,04%.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Howson C. P et al** (2008). “Controlling Birth Defects: Reducing the Hidden Toll of Dying and Disabled Children in Low-Income Countries”. Disease Control Priorities, 1-16.
2. **Zhang Y.P., Wu J.P. et al** (2011). “Karyotype analysis of amniotic fluid cells and comparison of chromosomal abnormality rate during second trimester”. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, **46(9)**, 644-8.
3. **Park S.Y., Kim J.W. et al** (2001). “Frequencies of fetal chromosomal abnormalities at prenatal diagnosis: 10 years experiences in a single institution”. J Korean Med Sci, **16(3)**, 290-3.
4. **Zhang L., Zhang X.H. et al** (2010). “Prenatal cytogenetic diagnosis study of 2782 cases of high-risk pregnant women”. Chin Med J (Engl), **123(4)**, 423-30.
5. **Hoàng Thị Ngọc Lan**, Phạm Tuấn Dũng, Đoàn Thị Kim Phụng, Nguyễn Thị Duyên, Hoàng Thu Lan (2016), “Giá trị của sàng lọc huyết thanh mẹ để phát hiện thai bất thường nhiễm sắc thể”. Tạp chí Y học Việt Nam tập 446 tr 174-180.
6. **Daniela N., Ruxandra C. et al** (2011). “The Importance of Screening and Prenatal Diagnosis in the Identification of the Numerical Chromosomal Abnormalities. Maedica (Buchar), **6(3)**, 179-184.

## GIÁ TRỊ CỦA CÁC PHƯƠNG PHÁP SÀNG LỌC TRƯỚC SINH TRONG PHÁT HIỆN CÁC BẤT THƯỜNG NHIỄM SẮC THỂ

Nguyễn Bá Mạnh\*, Hoàng Thị Ngọc Lan\*,  
Đoàn Thị Kim Phụng\*, Lương Thị Lan Anh\*, Vũ Thị Hà\*

### TÓM TẮT

Ngày nay, những tiến bộ vượt bậc trong y học, đặc biệt trong lĩnh vực siêu âm và sự phát hiện các marker trong huyết thanh mẹ, sàng lọc và chẩn đoán trước sinh đã đạt được những thành tựu đáng kể. **Mục tiêu:** Đánh giá giá trị phát hiện các bất thường nhiễm sắc thể của các phương pháp sàng lọc trước sinh. **Đối tượng và phương pháp:** 2233 thai phụ có các yếu tố nguy cơ cao bất thường NST được chọn lọc và phân tích nhiễm sắc thể đồ tại Trung tâm Tư vấn Di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, trong thời gian từ 01/2015 đến 12/2019. **Kết quả:** Đã phát hiện 201 trường hợp có bất thường NST chiếm 9,0% bao gồm cả dạng đột biến và biến thể. Giá trị phát hiện của test sàng lọc huyết thanh mẹ dương tính là 8,21%, siêu âm bất thường và nguy cơ theo tuổi mẹ lần lượt là 16,44% và 15,16%. **Kết luận:** sàng lọc để phát hiện các thai phụ có nguy cơ cao mang bất thường NST bằng nhiều phương pháp khác nhau và chọn lọc hút dịch ối làm NST đồ có thể phát hiện những rối loạn NST, làm cơ sở cho tư vấn di truyền, làm giảm tỷ lệ các trẻ mang dị tật bẩm sinh và tử vong chu sinh.

**Từ khóa:** sàng lọc trước sinh, chẩn đoán trước sinh, bất thường nhiễm sắc thể.

### SUMMARY

#### THE VALUE OF PRENATAL SCREENING METHODS IN THE DETECTION OF CHROMOSOMAL ABNORMALITY

Recently, remarkable advances in medicine, particularly in the field of ultrasound and detection of markers in maternal serum, screening and pre-treatment have achieved significant achievements. **The aim** of our study was to evaluate the correlations between the screening test results and results of abnormal chromosomal analysis on fetal cells. **Methods:** Amniotic fluid samples from 2233 pregnant women were studied with cytogenetic analysis (karyotype) at Genetic consulting Center, Hanoi Medical Hospital University from 01/2015 to 12/2019. **Results:** The prenatal cytogenetic diagnosis showed 201 case with abnormal chromosome (9%) including mutation and heteromorphism. Fetal chromosomal abnormality were detected through maternal serum screening 8,21%, ultrasound examination 16,44%, advanced maternal age 15,16 %. **Conclusions:** This report confirms the importance of screening and the cytogenetic diagnosis in the identification of the chromosomal abnormalities.

**Key word:** prenatal screening, prenatal diagnosis, chromosomal abnormalities

\*Trường Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Vũ Thị Hà

Email: vuthiha@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài:

Ngày phản biện khoa học:

Ngày duyệt bài:

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dị tật bẩm sinh (DTBS) đã và đang là một vấn đề quan trọng nhận được sự quan tâm của xã hội và ngành y tế. Theo thống kê của

tổ chức Y tế thế giới (WHO), DTBS chiếm khoảng 3 - 4% tổng số trẻ được sinh ra bao gồm cả trẻ sống và trẻ chết lúc sinh [1]. Theo nghiên cứu của Phan Thị Hoan (2001) ở nhóm dân cư thuộc 4 tỉnh đồng bằng sông Hồng thấy tỷ lệ DTBS là 1,96% [2]. DTBS không chỉ để lại những hậu quả nặng nề về thể chất cho trẻ nhỏ mà còn là gánh nặng về kinh tế và tâm lý cho gia đình và người mẹ trong những lần mang thai tiếp theo.

Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra nhiều nguyên nhân gây DTBS trong đó bất thường nhiễm sắc thể là một nguyên nhân quan trọng. Các bất thường nhiễm sắc thể có thể được phát hiện thông qua sàng lọc và chẩn đoán trước sinh. Trên thế giới, sàng lọc và chẩn đoán trước sinh bắt đầu được thực hiện từ những năm 1960 chủ yếu dựa trên tuổi mẹ. Những năm gần đây bằng những tiến bộ trong lĩnh vực siêu âm và sự phát hiện các marker trong huyết thanh mẹ (HTM), sàng lọc và chẩn đoán trước sinh đã đạt được những thành tựu đáng kể [3], [4]. Ở một số nước, sàng lọc trước sinh là yêu cầu bắt buộc trong chăm sóc tiền sản. Ở Việt Nam, việc sàng lọc và chẩn đoán trước sinh chủ yếu dựa vào việc sàng lọc huyết thanh mẹ và nuôi cấy nhiễm sắc thể từ tế bào ối. Đã có một số nghiên cứu về tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể được thực hiện trước đây ở Việt Nam. Tuy nhiên các nghiên cứu do chưa đánh giá đầy đủ được giá trị phát hiện của các phương pháp sàng lọc trong việc phát hiện những bất thường nhiễm sắc thể cho thai nhi [5], [6]. Việc phát hiện bất thường nhiễm sắc thể có ý nghĩa quan trọng trong tư vấn thai sản.

Vì vậy chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu:

*Đánh giá giá trị phát hiện các bất thường nhiễm sắc thể của các phương pháp sàng lọc trước sinh.*

*Hy vọng, kết quả nghiên cứu của chúng tôi sẽ làm cơ sở cho tư vấn di truyền, làm giảm tỷ lệ các trẻ mang dị tật bẩm sinh và tử vong chu sinh.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Đối tượng:** Đối tượng nghiên cứu của chúng tôi là 2233 thai phụ đến chọc ối tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội từ tháng 01/2015 đến tháng 12/2019 có kết quả phân tích nhiễm sắc thể đồ từ tế bào ối.

### **Tiêu chuẩn lựa chọn:**

Đối tượng nghiên cứu lựa chọn là các thai phụ có chỉ định chọc ối do nguy cơ cao sinh con bất thường nhiễm sắc thể, tuổi thai từ 16 tuần trở lên; một thai, thai sống.

### **Tiêu chuẩn loại trừ:**

Là các thai phụ không đáp ứng tiêu chuẩn trên hoặc chọc ối theo yêu cầu.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

Phương pháp nghiên cứu là mô tả hồi cứu.

Chúng tôi thu thập kết quả phân tích nhiễm sắc thể đồ của các thai phụ thực hiện chọc ối. Phân tích các dạng bất thường nhiễm sắc thể theo tiêu chuẩn ISCN 2016.

*Số liệu được thống kê* và xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### **3.1. Tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể tế bào ối của các thai phụ thực hiện chọc ối**

Phân tích bất thường nhiễm sắc thể ở 2233 thai phụ được thực hiện chọc ối chúng tôi thu được kết quả sau:

**Bảng 3.1. Tỷ lệ các dạng bất thường nhiễm sắc thể phôi thai ở 2233 thai phụ được thực hiện chọc ối**

| TT | Đặc điểm nhiễm sắc thể của thai | n    | %    |
|----|---------------------------------|------|------|
| 1  | Bình thường                     | 2032 | 91,0 |
| 2  | Có đa hình                      | 74   | 3,31 |
| 3  | Có đột biến                     | 127  | 5,69 |

Kết quả ở bảng 3.1 cho thấy: Trong tổng số 2233 thai phụ thực hiện chọc ối có:

- 2032 thai phụ có thai mang bộ nhiễm sắc thể bình thường chiếm tỷ lệ 91,00%.
- 74 thai phụ có thai mang dạng đa hình (biến thể) nhiễm sắc thể chiếm tỷ lệ 3,31%.
- 127 thai phụ có thai mang đột biến nhiễm sắc thể chiếm tỷ lệ 5,69%.

### 3.2. Giá trị phát hiện các bất thường nhiễm sắc thể tế bào ối của các phương pháp sàng lọc

**Bảng 3.2. Tỷ lệ số ca bất thường, biến thể của nhiễm sắc thể tế bào ối theo phương pháp sàng lọc.**

| Phương pháp sàng lọc                                                | Số lượng bất thường, biến thể NST từ tế bào ối | Tỷ lệ (%)   |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------|
| Sàng lọc huyết thanh nguy cơ cao                                    | 106                                            | 52,74       |
| Khoảng sáng sau gáy (KSSG) cao ( $\geq 2,5\text{mm}$ )              | 9                                              | 4,48        |
| Siêu âm bất thường hình thái                                        | 9                                              | 4,48        |
| Tiền sử bệnh, tật di truyền                                         | 16                                             | 7,96        |
| Nguy cơ theo tuổi mẹ cao                                            | 7                                              | 3,48        |
| Tiền sử sinh con Down                                               | 1                                              | 0,5         |
| Sàng lọc huyết thanh nguy cơ cao kết hợp nguy cơ theo tuổi mẹ cao   | 44                                             | 21,89       |
| Tiền sử bệnh, tật di truyền và sinh con Down                        | 1                                              | 0,5         |
| Sàng lọc nguy cơ cao, KSSG cao kết hợp siêu âm bất thường hình thái | 1                                              | 0,5         |
| Sàng lọc nguy cơ cao kết hợp KSSG cao                               | 4                                              | 1,99        |
| KSSG cao kết hợp siêu âm bất thường hình thái                       | 1                                              | 0,5         |
| Sàng lọc nguy cơ cao kết hợp siêu âm bất thường                     | 1                                              | 0,5         |
| Sàng lọc nguy cơ cao, KSSG cao kết hợp nguy cơ tuổi mẹ cao.         | 1                                              | 0,5         |
| <b>Tổng số</b>                                                      | <b>201</b>                                     | <b>100%</b> |

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy: Trong tổng số 201 thai phụ có kết quả chọc ối là biến thể hoặc bất thường nhiễm sắc thể, phương pháp sàng lọc huyết thanh mẹ phát hiện 106 thai phụ có bất thường hoặc biến thể NST tế bào ối chỉ bằng phương pháp này, chiếm tỷ lệ cao nhất 52,74%. Sàng lọc huyết thanh kết hợp với tuổi mẹ cao cũng phát hiện 44 ca có bất thường, chiếm tỷ lệ 21,89%. Tiếp theo là

phát hiện nguy cơ cao bất thường nhiễm sắc thể của thai qua siêu âm gồm có không sáng sau gáy cao ( $>2,5\text{mm}$ ), bất thường hình thái của thai hoặc kết hợp cả khoảng sáng sau gáy cao và bất thường hình thái. Nguy cơ cao do tiền sử trong gia đình đã có người bị bệnh tật di truyền là 7,96%. Nguy cơ cao đơn thuần do tuổi mẹ không nhiều chỉ chiếm 3,48%.

**Bảng 3.3. Tỷ lệ bất thường và đa hình NST qua nuôi cấy tế bào ối**

| Kết quả chọc ối              | n          | %            |
|------------------------------|------------|--------------|
| <b>Bất thường NST</b>        | <b>127</b> | <b>63,18</b> |
| Bất thường cấu trúc NST      | 24         | 11,94        |
| Bất thường số lượng NST      | 71         | 35,32        |
| Dạng khảm NST                | 30         | 14,93        |
| BTSL kết hợp BTCT            | 2          | 1,00         |
| <b>Có đa hình NST</b>        | <b>74</b>  | <b>36,82</b> |
| <b>Tổng số ca bất thường</b> | <b>201</b> | <b>100</b>   |

Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy: với các thai phụ có nguy cơ cao sinh con bất thường, khi xét nghiệm chẩn đoán (xét nghiệm nhiễm sắc thể thai từ tế bào ối) thì kết quả phát hiện bất thường nhiễm sắc thể nhiều hơn là đa hình. Trong các bất thường về nhiễm sắc thể thì bất thường số lượng là nhiều nhất chiếm 35,32% các bất thường và đa hình, bất thường dạng khảm cũng khá cao chiếm 14,93% các bất thường và đa hình, có 1 trường hợp chúng tôi phát hiện có các bất thường số lượng và bất thường cấu trúc NST.

**Bảng 3.4. Giá trị phát hiện của các phương pháp sàng lọc**

| Phương pháp sàng lọc              | Số trường hợp bất thường, biến thể NST (a) | Tổng số (b) | Tỷ lệ (a/b) (%) |
|-----------------------------------|--------------------------------------------|-------------|-----------------|
| Sàng lọc huyết thanh nguy cơ cao  | 157                                        | 1913        | 8,21            |
| KSSG cao ( $\geq 2,5\text{ mm}$ ) | 16                                         | 87          | 18,39           |
| Siêu âm bất thường hình thái      | 12                                         | 73          | 16,44           |
| Tiền sử bệnh, tật di truyền       | 17                                         | 98          | 17,35           |
| Nguy cơ theo tuổi mẹ cao          | 52                                         | 343         | 15,16           |
| Tiền sử sinh con Down             | 2                                          | 7           | 28,57           |

Kết quả ở bảng 3.4 cho thấy:

Trong số 2233 trường hợp thai phụ được làm xét nghiệm chọc ối phân tích NST đồ, có 7 trường hợp chọc ối vì tiền sử sinh con Down, phát hiện 2 trường hợp bất thường NST chiếm tỷ lệ 28,57%.

Trong 87 trường hợp chọc ối vì siêu âm có tăng KSSG, phát hiện 16 trường hợp có bất thường nhiễm sắc thể (18,39%). Giá trị phát hiện bất thường NST của các phương pháp sàng lọc theo siêu âm, tiền sử bệnh tật di truyền, theo tuổi mẹ theo huyết thanh mẹ lần lượt là 16,44%; 17,35%; 15,16%, 8,21%.

#### IV. BÀN LUẬN

Trong tổng số 2233 thai phụ tham gia chọc ối trong nghiên cứu của chúng tôi đều có nguy cơ cao mang thai bất thường nhiễm sắc thể, bao gồm kết quả sàng lọc qua huyết thanh mẹ có nguy cơ cao, sàng lọc theo tuổi mẹ, siêu âm thai bất thường hình thái và có tiền sử mang thai bất thường nhiễm sắc thể. Kết quả karyotype của các thai phụ chỉ ra 5,69% thai có bất thường nhiễm sắc thể và 3,31% thai mang biến thể nhiễm sắc thể (hay còn gọi là các dạng đa hình nhiễm sắc thể). Tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác [5], [6].

Đánh giá tỷ lệ các phương pháp sàng lọc trong nhóm bất thường nhiễm sắc thể chúng tôi thấy: Tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể trong nhóm kết quả sàng lọc huyết thanh nguy cơ cao chiếm tỷ lệ cao nhất 52,74 %. Nếu sàng lọc theo tuổi mẹ kết hợp với sàng lọc huyết thanh thì tỷ lệ này là 21,89%. Đồng thời, theo bảng 3.4, có 157 trường hợp bất thường NST trên tổng số 1913 thai phụ có

chỉ định chọc ối do kết quả sàng lọc huyết thanh mẹ cho nguy cơ cao, chiếm tỷ lệ 8,21%. Như vậy sàng lọc theo huyết thanh mẹ và sàng lọc theo tuổi mẹ vẫn là phương pháp rẻ tiền, dễ làm và đem lại hiệu quả cao trong việc phát hiện các bất thường di truyền trước sinh.

Đánh giá giá trị phát hiện bất thường nhiễm sắc thể thông qua các phương pháp sàng lọc theo bảng 2 chúng tôi thấy: Trong số 2233 trường hợp thai phụ được làm xét nghiệm chọc ối phân tích NST đồ, có 7 trường hợp chọc ối vì tiền sử sinh con Down, phát hiện 2 trường hợp bất thường NST, như vậy tỷ lệ phát hiện của phương pháp này khá cao (28,57%). Cả hai trường hợp bất thường này đều liên quan tới sự bất thường về cấu trúc nhiễm sắc thể số 21. Điều này cho thấy, nếu như thai phụ đã có tiền sử sinh con bất thường nhiễm sắc thể thì nên được chỉ định chọc ối cho những lần mang thai tiếp theo. Giá trị phát hiện bất thường NST thông qua khoảng sáng sau gáy trên siêu âm cũng chiếm tỷ lệ khá cao 18,39%). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với các nghiên cứu khác [5], [7].

Trong nhóm 157 thai phụ có bất thường NST tế bào ối và có kết quả sàng lọc huyết thanh dương tính, có tới 44 thai phụ có nguy cơ cao bất thường NST theo tuổi, chiếm tỷ lệ 28,03%. Hơn nữa, tỷ lệ bất thường NST ở nhóm thai phụ có yếu tố nguy cơ cao theo tuổi là  $52/343 = 15,16\%$ . Vì vậy yếu tố nguy cơ về tuổi mẹ có vai trò quan trọng và chỉ định xét nghiệm chọc ối cho các thai phụ lớn tuổi là bắt buộc. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng như các nghiên cứu khác đã

chỉ ra rằng bất thường nhiễm sắc thể thai tăng theo tuổi mẹ [8].

Trong 2233 thai phụ làm xét nghiệm chọc ối, có 73 thai phụ cho kết quả siêu âm thai bất thường, trong đó đã phát hiện được 12 thai phụ có bất thường NST tế bào ối, chiếm tỷ lệ 16,44%. Tỷ lệ này là 12,5% trong nghiên cứu của Hà Thị Tiểu Di và cs [8]. Như vậy, siêu âm là một biện pháp quan trọng để phát hiện dị tật bẩm sinh nói chung cũng như các bất thường NST ở thai nhi nói riêng.

Ngày nay, chúng ta có thêm nhiều phương pháp để sàng lọc bệnh tật di truyền, trong đó để sàng lọc trước sinh. Chúng ta có thêm phương pháp sàng lọc không xâm lấn (NIPT). Đây là phương pháp sàng lọc có độ chính xác cao, khả năng phát hiện lên đến 99%. Tuy nhiên, tỷ lệ các thai phụ làm NIPT ngay từ đầu, chưa qua các biện pháp sàng lọc truyền thống chưa nhiều. Phần lớn thai phụ làm xét nghiệm NIPT khi xét nghiệm sàng lọc bằng huyết thanh mẹ có nguy cơ cao hoặc nguy cơ sát với ngưỡng, hoặc làm NIPT khi có tuổi mẹ cao, khi có các dấu hiệu qua siêu âm thấy thai có nguy cơ cao bất thường, có tiền sử gia đình có người bất thường [9]. Với thực tế trên, NIPT có giá trị giảm tỷ lệ phải dùng các biện pháp xâm lấn để chẩn đoán trước sinh nhiều hơn là giá trị phát hiện người có nguy cơ cao để làm xét nghiệm chẩn đoán trước sinh.

Như vậy dù đã có thêm các biện pháp sàng lọc có hiệu quả cao, cho đến hiện nay việc phát hiện thai phụ có nguy cơ cao sinh con bất thường bằng xét nghiệm huyết thanh mẹ, sàng lọc bằng siêu âm vẫn có giá trị cao,

sàng lọc huyết thanh mẹ kết hợp với sàng lọc bằng tuổi mẹ và siêu âm vẫn có hiệu quả tốt.

## V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ ra được giá trị tiên đoán của các phương pháp sàng lọc trước sinh phục vụ cho chẩn đoán trước sinh.

Như vậy, sàng lọc trước sinh là bước đầu tiên hướng tới chẩn đoán trước sinh các bất thường bẩm sinh. Mục tiêu của sàng lọc là phát hiện các thai phụ có nguy cơ cao mang thai bất thường bẩm sinh, đặc biệt là những bất thường nhiễm sắc thể. Nếu như kết quả sàng lọc chỉ ra nguy cơ cao, các thai phụ nên được làm chẩn đoán trước sinh bằng các phương pháp xâm lấn như chọc hút dịch ối hoặc sinh thiết tua rau. Sử dụng hiệu quả các phương pháp sàng lọc sẽ giúp chúng ta giảm được các thủ thuật xâm lấn ảnh hưởng tới các bào thai bình thường.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **WHO (2003).** The development of registries to support birth defect research. Report of a WHO registry meeting on Craniofacial Anomalies.
2. **Phan Thị Hoan (2001).** Nghiên cứu tần suất và tính chất di truyền của một số dị tật bẩm sinh ở một số nhóm dân cư miền Bắc Việt Nam, Luận án tiến sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
3. **Neagos D., Cretu R., Sfetea R.C., Bohiltea L.C. (2011).** The importance of screening and prenatal diagnosis in the identification of the numerical chromosomal abnormalities. *Maedica (Buchar)*. 6(3):179-184.
4. **Rejane G. Kessler et al (2008),** Prenatal diagnosis of fetal chromosomal abnormalities:

- report of an 18-year experience in a Brazilian public hospital Giugliani Genet. Mol. Biol. vol.31 no.4 São Paulo Sept./Dec.
5. **Hoàng Thị Ngọc Lan, Đoàn Kim Phượng, Trần Thị Thanh Hương và cs. (2007).** Chẩn đoán trước sinh bằng phân tích nhiễm sắc thể từ tế bào ối. Hội nghị quốc tế tư vấn di truyền - sàng lọc và chẩn đoán trước sinh, tr. 135 - 147.
  6. **Hoàng Thị Ngọc Lan, Phạm Tuấn Dũng, Đoàn Thị Kim Phượng và cs. (2016).** Giá trị của sàng lọc huyết thanh mẹ để phát hiện thai bất thường nhiễm sắc thể. Tạp chí Y học Việt Nam, 446, tr. 180 - 190.
  7. **T. Kishida, N. Hoshi, R. Hattori et al. (2000).** Efficacy of maternal serum screening in the prenatal detection of fetal chromosome abnormalities in Japanese women. Fetal Diagn Ther, 15(2), tr. 112-7.
  8. **Hà Thị Tiểu Di, Lê Đình Duy (2017).** Bước đầu đánh giá kết quả chọc ối xét nghiệm nhiễm sắc thể thai nhi tại Bệnh viện Phụ sản- Nhi Đà Nẵng. Tạp chí Phụ sản, 15(3), tr. 23 - 30.
  9. **Health Quality Ontario, Toronto (2019).** Noninvasive Prenatal Testing for Trisomies 21, 18, and 13, Sex Chromosome Aneuploidies, and Microdeletions: A Health Technology Assessment. Ont Health Technol Assess Ser. 19(4): 1-166.

## SÀNG LỌC NIPT CHO THAI PHỤ ĐỂ PHÁT HIỆN THAI TRISOMY 13, TRISOMY 18 VÀ TRISOMY 21 TẠI BỆNH VIỆN PHỤ SẢN HÀ NỘI NĂM 2019

Trương Quang Vinh<sup>1</sup>, Nguyễn Duy Ánh<sup>2</sup>,  
Trần Đức Phấn<sup>3</sup>, Lưu Thị Hồng<sup>3</sup>, Nguyễn Thị Mai Anh<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

NIPT là xét nghiệm sàng lọc trước sinh có độ chính xác cao, có thể làm rất sớm. Người xét nghiệm có thể là các thai phụ đã qua các test sàng lọc trước sinh khác mà thai có nguy cơ cao mắc bất thường nhiễm sắc thể, cũng có thể họ không qua các test sàng lọc thông thường mà xét nghiệm trực tiếp NIPT ngay. Để tìm hiểu thực trạng đối tượng làm xét nghiệm NIPT hiện nay, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm **mục tiêu:** Phân tích đặc điểm của thai phụ sàng lọc trước sinh bằng kỹ thuật NIPT tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội năm 2019. **Phương pháp nghiên cứu:** nghiên cứu mô tả cắt ngang, tiến hành trên 437 thai phụ có nguy cơ cao mắc trisomy 13, trisomy 18 và trisomy 21 đến làm sàng lọc bằng NIPT. **Kết quả:** Các thai phụ có độ tuổi trung bình  $33,01 \pm 5,63$  (tuổi); Tỷ lệ các yếu tố nguy cơ: thai phụ đã đình chỉ thai, thai lưu, sảy thai chiếm 35,2%; 9,2% các thai phụ thường xuyên hút thuốc lá trực tiếp hoặc thụ động, 7,1% đã sinh con dị tật. Thời điểm thai nhi sàng lọc trung bình  $13,85 \pm 2,58$  tuần tuổi. Kết quả NIPT nguy cơ cao là 19,4%, trong đó trisomy 21 là 98,8% và trisomy 18 0,2%. **Kết luận:** Tuổi thai sàng lọc

trung bình là  $13,85 \pm 2,58$  tuần tuổi, lý do làm sàng lọc NIPT chủ yếu là trước đó thai phụ đã có tiền sử bị đình chỉ thai, thai lưu, sảy thai.

**Từ khóa:** trisomy 13, trisomy 18, trisomy 21, NIPT.

### SUMMARY

#### SCREENING NIPT FOR SUBSTITUTION TO DISCOVER TRISOMY 13, TRISOMY 18 AND TRISOMY 21 IN HANOI OBSTETRICS AND GYNECOLOGY HOSPITAL IN 2019

The NIPT is a highly accurate prenatal screening test that can be done very early. Testers may be pregnant women who have undergone other prenatal screening tests whose pregnancies are at high risk for chromosomal abnormalities, and they may not pass conventional screening tests but test NIPT directly. To find out the current situation of NIPT test subjects, we conducted this study with the **aim of:** Characterization of pregnant women who are pre-natal screening using NIPT technique at Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital in 2019. **Methods of study:** A cross-sectional descriptive study, conducted on 437 pregnant women at high risk of trisomy 13, trisomy 18 and trisomy 21 to undergo screening with NIPT. **Results:** The pregnant women had a mean age of  $33.01 \pm 5.63$  (age); The proportion of risk factors: pregnant women with suspension of pregnancy, stillbirth, and miscarriage accounts

<sup>1</sup>Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>2</sup>Bệnh viện Phụ sản Hà Nội

<sup>3</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Trương Quang Vinh  
Email: dr.vinh1277@gmail.com

Ngày nhận bài: 1.9.2020

Ngày phản biện khoa học: 17.9.2020

Ngày duyệt bài: 19.11.2020

for 35.2%; 9.2% of pregnant women regularly smoke directly or passively, 7.1% have given birth defects. The average time of fetal screening is  $13.85 \pm 2.58$  weeks of age. The result of high-risk NIPT was 19.4%, of which trisomy 21 was 98.8% and trisomy 18 0.2%. **Conclusion:** The average screening gestational age was  $13.85 \pm 2.58$  weeks of age, the main reason for NIPT screening was that women had a history of pregnancy suspension, stillbirth, and miscarriage

**Keywords:** trisomy 13, trisomy 18, trisomy 21, NIPT

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Tổ chức Y tế thế giới, tần suất dị tật bẩm sinh chiếm 3 - 4,0% tổng số trẻ được sinh ra bao gồm cả trẻ sống và chết lúc sinh. Một nghiên cứu ở Bệnh viện Từ Dũ năm 2002 cho thấy có 3,0% thai nhi bị dị tật bẩm sinh. Năm 2010 tại Bệnh viện Từ Dũ, trong 5.652 trường hợp sàng lọc trước sinh phát hiện 728 trường hợp thai nhi có bất thường, chiếm 13,0%. Năm 2000 - 2001, số trẻ bị các dị tật bẩm sinh vào Viện Nhi quốc gia chiếm 12,4% số trẻ nhập viện và chiếm 10,5% số trẻ bị chết [1], [2]. Những sơ sinh mang nhiễm sắc thể (NST) rối loạn có những biểu hiện bệnh lý, tùy mức độ bệnh nặng hay nhẹ mà có thể tiếp tục bị chết sau khi sinh, sống được một thời gian hay có thể sống đến giai đoạn trưởng thành. Các bất thường NST hay gặp là bất thường của NST số 21, 18 và 13.

Hiện nay có nhiều phương pháp sàng lọc trước sinh (SLTS) được sử dụng để phát hiện những bất thường thai nhi, trong đó phổ biến nhất là các test sàng lọc trước sinh, siêu âm thai và sàng lọc bằng tuổi mẹ. Cả 3 phương pháp này đều có những ưu điểm như dễ thực hiện, an toàn cho cả thai phụ và thai nhi, giá rẻ có thể áp dụng rộng rãi. Các xét nghiệm SLTS từ máu mẹ như triple test (AFP, hCG,

uE3) và double test (PAPP-A, fb-hCG) là 2 test được sử dụng rộng rãi nhất, có vai trò xác định nguy cơ thai mắc dị tật bẩm sinh. Tuy nhiên, phương pháp này có độ chính xác không cao do gián tiếp thông qua định lượng một số chất trong máu mẹ; dẫn đến các chỉ định chọc dò dịch ối còn nhiều và mang lại những lo lắng cho thai phụ trong suốt quá trình mang thai [3].

Cùng với sự phát triển của công nghệ phân tích gen, các nhà khoa học trên thế giới đã phát triển phương pháp sàng lọc trước sinh không xâm lấn (NIPT). Đây là phương pháp có độ chính xác cao, và rất an toàn cho thai phụ, giúp khắc phục tối đa các hạn chế của các phương pháp sàng lọc trước sinh phổ biến hiện nay. Để đánh giá hiệu quả sàng lọc của NIPT, chúng tôi tiến hành đề tài này với mục tiêu: *Phân tích đặc điểm của thai phụ sàng lọc trước sinh bằng kỹ thuật NIPT tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội năm 2019.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm Chẩn đoán trước sinh và Sàng lọc sơ sinh- bệnh viện Phụ sản Hà Nội.

- Thời gian nghiên cứu: từ tháng 01/2019-12/2019.

### 2.2. Đối tượng nghiên cứu

- Các thai phụ mang thai đơn  $\geq 10$  tuần được chẩn đoán có nguy cơ bị dị tật bẩm sinh trisomy 13, trisomy 18, trisomy 21 qua sàng lọc bằng NIPT được ghi chép đầy đủ về các nội dung cần thiết cho nghiên cứu.

**2.3. Thiết kế nghiên cứu:** nghiên cứu cắt ngang.

**2.4. Cơ mẫu:** 437 thai phụ đủ tiêu chuẩn lựa chọn tham gia nghiên cứu.

**2.5. Kỹ thuật thu thập thông tin:** theo bộ câu hỏi thiết kế có sẵn.

**2.6. Phân tích số liệu:** Số liệu được thu thập và làm sạch, nhập liệu và phân tích trên phần mềm STATA 10 với các thuật toán thống kê trong y học.

**2.7. Đạo đức nghiên cứu:** Nghiên cứu được phê duyệt bởi hội đồng khoa học của Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội. Kết quả nghiên cứu đảm bảo tính khoa học, tin cậy và chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu khoa học.

### III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Thông tin chung của thai phụ làm sàng lọc

**Bảng 3.1. Đặc điểm phân bố tuổi của các thai phụ (n=437)**

| Tuổi mẹ                       | Số lượng (n)               | Tỷ lệ (%)    |
|-------------------------------|----------------------------|--------------|
| <20 tuổi                      | 2                          | 0,5          |
| 21-25 tuổi                    | 36                         | 8,2          |
| 26-30 tuổi                    | 126                        | 28,8         |
| 31-35 tuổi                    | 111                        | 25,4         |
| >35 tuổi                      | 162                        | 37,1         |
| <b>Tổng</b>                   | <b>437</b>                 | <b>100,0</b> |
| $\bar{X} \pm SD$ (GTNN- GTLN) | 33,01 $\pm$ 5,63 (19 - 47) |              |

**Nhận xét:** Độ tuổi trung bình của thai phụ là 33,01 $\pm$ 5,63 tuổi, thai phụ cao tuổi nhất là 47 tuổi, thai phụ nhỏ tuổi nhất là 19 tuổi. Nhóm thai phụ >35 tuổi chiếm 37,1%.

**Bảng 3.2. Một số đặc điểm về tiền sử của các thai phụ**

| Tiền sử                                                 | Số lượng (n) | Tỷ lệ (%) |
|---------------------------------------------------------|--------------|-----------|
| Không có tiền sử bất thường                             | 226          | 51,7      |
| Gia đình có người mắc HC Down/Dị tật bẩm sinh           | 2            | 0,5       |
| Sảy thai/Thai lưu/ Đình chỉ thai...                     | 154          | 35,2      |
| Sinh con mắc dị tật bẩm sinh                            | 31           | 7,1       |
| Mẹ bị bệnh mạn tính (tăng huyết áp, bệnh chuyển hóa...) | 5            | 1,1       |
| Mẹ mắc bệnh truyền nhiễm trong thời gian mang thai      | 4            | 1,0       |
| Mẹ sử dụng các thuốc, hóa chất bất thường khi mang thai | 11           | 2,5       |
| Hút thuốc, tiếp xúc nhiều với khói thuốc.               | 40           | 9,2       |

**Nhận xét:** Tiền sử hay gặp nhất ở các thai phụ nghiên cứu là tiền sử đình chỉ thai bất thường/ sảy thai/thai lưu chiếm tỷ lệ 35,2%, tiền sử sinh con mắc dị tật bẩm sinh chiếm 7,1%.

**Bảng 3.3. Phân bố tuần tuổi thai nhi**

| Tuổi thai  | Số lượng (n) | Tỷ lệ (%) |
|------------|--------------|-----------|
| <11 tuần   | 31           | 7,1       |
| 11-14 tuần | 248          | 56,7      |
| 14-20 tuần | 145          | 33,2      |

|                               |                            |              |
|-------------------------------|----------------------------|--------------|
| >20 tuần                      | 13                         | 3,0          |
| <b>Tổng</b>                   | <b>437</b>                 | <b>100,0</b> |
| $\bar{X} \pm SD$ (GTNN- GTLN) | 13,85 $\pm$ 2,58 (10 - 26) |              |

**Nhận xét:** Tuổi của thai nhi trung bình tại thời điểm sàng lọc bằng NIPT là 13,85  $\pm$  2,58 tuần, tuổi thai lớn nhất là 26 tuần, nhỏ nhất là 10 tuần.

### 3.2. Tỷ lệ sàng lọc trước sinh

**Bảng 3.2. Tỷ lệ các xét nghiệm sàng lọc trước sinh thường quy**

| Xét nghiệm sàng lọc trước sinh | Số lượng (n) | Tỷ lệ (%) |
|--------------------------------|--------------|-----------|
| Siêu âm                        | 303          | 69,3      |
| Double test                    | 123          | 28,1      |
| Triple test                    | 38           | 8,7       |

**Nhận xét:** Siêu âm là test sàng lọc trước sinh được thực hiện nhiều nhất với tỷ lệ 69,3%; kế tiếp là double test với 28,1% và triple test chiếm 8,7%.

**Bảng 3.3. Kết quả xét nghiệm phát hiện dị tật bằng phương pháp NIPT**

| Dị tật bẩm sinh \ NIPT |            | Số lượng   | Tỷ lệ %    |
|------------------------|------------|------------|------------|
| Có                     | Trisomy 21 | 84         | 19,2       |
|                        | Trisomy 18 | 1          | 0,2        |
|                        | Trisomy 13 | 0          | 0          |
| Không                  |            | 352        | 80,6       |
| <b>Tổng</b>            |            | <b>437</b> | <b>100</b> |

**Nhận xét:** Nhóm đối tượng có nguy cơ cao thai bị dị tật bẩm sinh chiếm tỷ lệ 19,4%; trong đó trisomy 21 là 19,2% và trisomy 18 là 0,2%.

## IV. BÀN LUẬN

### 4.1. Thông tin chung của thai phụ làm sàng lọc

Độ tuổi trung bình của thai phụ là 33,01 $\pm$ 5,63 tuổi, thai phụ cao tuổi nhất là 47 tuổi, thai phụ nhỏ tuổi nhất là 19 tuổi. Nhóm thai phụ >35 tuổi chiếm 37,1%. Kết quả này tương tự kết luận của Nguyễn Việt Nhân trong tài liệu “Hướng dẫn Sàng lọc trước sinh năm 2010” có đề cập tuy nhóm tuổi >35 là nhóm có nguy cơ cao nhất về sinh con dị tật bẩm sinh [1]; tuy nhiên lại có sự khác biệt với một số nghiên cứu trong nước và thế

giới, như nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Thủy tại bệnh viện Từ Dũ thì số lượng thai phụ mang nguy cơ cao bị dị tật bẩm sinh nhất là hội chứng trisomy 21 lại nằm chủ yếu trong nhóm thai phụ 25-35 tuổi, hay nghiên cứu của Gupta và cộng sự tại phòng khám tiền sản Rasht - Ấn Độ, độ tuổi lớn nhất là 21 - 30 tuổi chiếm 67,3%; lý do là số thai phụ trên 35 tuổi ít, các thai phụ chủ yếu có tuổi dưới 35 [5]. Các đối tượng làm xét nghiệm NIPT có thể đã làm các sàng lọc khác có nguy cơ cao, cũng có thể làm NIPT ngay mà không qua các xét nghiệm sàng lọc thông

thường. Nhóm tuổi >35 tuổi của chúng tôi cao có thể có lý do là những thai phụ có tuổi >35 quyết định làm xét nghiệm NIPT ngay mà không làm các sàng lọc khác.

Về nguyên nhân, tỷ lệ thai phụ có tiền sử đình chỉ thai, sảy thai, thai lưu chiếm cao nhất (35,2%). Con số được đưa ra cao hơn so với các nghiên cứu thống kê trước đó của tác giả Trần Danh Cường năm 2016 là 20,6% [6] và tác giả Hà Thị Mỹ Dung năm 2015 là 12,8% [7]. Hội chứng trisomy 21 là một ví dụ phổ biến gây biến chứng thai chết lưu. Người mẹ có tiền sử sảy thai, sinh non, thai dị dạng... thì khả năng cao có những bất thường về di truyền.

Đúng thứ 2 là nhóm các bà mẹ thường xuyên tiếp xúc với khói thuốc một cách gián tiếp nhưng ảnh hưởng nặng nề không kém những người hút thuốc trực tiếp, nguồn khói đến từ những người trong gia đình của họ mà thường thấy nhất là từ người chồng, là người trực tiếp chăm sóc cho sản phụ, ngoài ra nguồn khói thuốc còn từ những đồng nghiệp hoặc kể cả chính những người xa lạ trong môi trường sống của thai phụ. Nicotin và khí CO có trong khói thuốc là chất gây ảnh hưởng chính đến phôi thai. Nicotin làm tăng nồng độ của epinephrine và các hóa chất khác làm giảm dòng máu đến nuôi phôi thai. Nicotin trong thuốc lá có thể qua rau thai làm tăng huyết áp và ảnh hưởng đến khả năng thực hiện các cử động thở của thai nhi. Phụ nữ hút thuốc thường bị bong rau thai và rau tiền đạo, gây chảy máu ở mẹ và chết thai nhi [8].

Đúng thứ 3 là nhóm thai phụ có tiền sử sinh con mắc dị tật bẩm sinh trước đó, chiếm 7,1% đối tượng nghiên cứu (31/437 đối

tượng), các dị tật bẩm sinh bao gồm: Down, thiếu năng trí tuệ, khiếm thính, dị dạng về tim... là những nhóm dị tật liên quan mật thiết với các bệnh mà nghiên cứu hướng đến, chính vì vậy tuy chỉ xếp thứ 2 trong nhóm đặc điểm liên quan thai phụ nghiên cứu nhưng các bà mẹ đã từng sinh con dị tật là những người mang khả năng cao về sinh con tiếp theo cũng bị dị tật bẩm sinh và là nguyên nhân trực tiếp khiến các bà mẹ tìm đến NIPT vì họ có một mối lo ngại và áp lực lớn sau khi đã từng sinh ra những đứa con bị dị tật bẩm sinh hoặc gia đình có người bị Down hoặc có dị tật bẩm sinh, tuy nhiên nhóm này chiếm tỷ lệ không cao trong nhóm đối tượng, chỉ có 2 thai phụ có người thân bị Down, chiếm 0,5% tương tự nghiên cứu của Hà Thị Mỹ Dung trước đó với kết quả là 0,4% [7].

Độ tuổi của thai nhi trung bình tại thời điểm sàng lọc bằng NIPT là  $13,85 \pm 2,58$  tuần, trong đó: tuổi thai lớn nhất là 26 tuần, nhỏ nhất là 10 tuần. Nghiên cứu của Hà Thị Mỹ Dung năm 2015 [7] với tỷ lệ thai từ 11-14 tuần tuổi chiếm tới 97%. Mỗi tuổi thai lại có phương pháp sàng lọc trước sinh phù hợp. Với các kỹ thuật siêu âm, double test hoặc triple test với giá thành thấp hơn là sự lựa chọn của nhiều bà mẹ trước khi quyết định thực hiện NIPT nhưng để phát hiện sớm nhất các dị tật khi tuổi thai vẫn còn nhỏ thì NIPT là phương pháp sàng lọc trước sinh hàng đầu cho độ chính xác cao ở nhiều tuổi thai khác nhau.

#### 4.2. Tỷ lệ sàng lọc trước sinh

Việc sàng lọc đúng thời điểm và tuân thủ quy trình sàng lọc rất có ích trong việc phát hiện các dị tật bẩm sinh, đưa ra các khuyến

cáo phù hợp góp phần nâng cao chất lượng dân số, giảm tỷ lệ tai biến sản khoa, giảm tỷ lệ tử vong trước sinh [1]. Các xét nghiệm phổ biến hiện nay bao gồm: Siêu âm, double test và triple test. Nếu Siêu âm là kỹ thuật đơn giản, chi phí thấp, dễ tiếp cận cho tất cả các đối tượng sản phụ, không chỉ hỗ trợ phát hiện những dị tật bẩm sinh mà còn dùng để theo dõi sự phát triển của thai nhi trong suốt quá trình mang thai thì 2 kỹ thuật còn lại là double test và triple test cũng là 2 kỹ thuật dễ thực hiện để đánh giá một số nguy cơ mắc các hội chứng Down, Edward hoặc Patau... với độ nhạy lên đến 90,0% [1].

Việc thực hiện siêu âm đầy đủ và thường xuyên còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: công việc, điều kiện kinh tế hay nơi sống của các thai phụ nhưng có 3 mốc siêu âm quan trọng mà hầu hết các bác sĩ thai sản khuyến cáo thai phụ nên thực hiện vào các thời điểm [1], [7]. Siêu âm hình thái thai nhi giai đoạn 11-14 tuần: Thời điểm này thai nhi đã có đủ hình hài và các bộ phận, những bất thường lớn có thể nhìn thấy. Ở thời điểm này, mục đích của việc siêu âm là: chẩn đoán tuổi thai và dự kiến sinh cho sản phụ, đo độ mờ da gáy để sàng lọc nguy cơ mắc các bất thường nhiễm sắc thể như hội chứng Down, hội chứng Patau, hội chứng Edward... Siêu âm hình thái thai nhi giai đoạn 18-22 tuần: Đây là lúc lượng nước ối có nhiều, thai đã khá lớn và di động rất tốt trong buồng tử cung, giúp cho việc quan sát thai khá tốt ở nhiều góc độ khác nhau, nên dễ dàng phát hiện các bất thường như sứt môi, hở hàm ếch, dị tật cột sống và não bộ... Siêu âm thai nhi giai đoạn 30-32 tuần nhằm: đánh giá sự phát triển thai,

và phát hiện các dị tật xuất hiện muộn như: tắc ruột, não nhũn...

Theo kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ thai phụ đã làm sàng lọc bằng siêu âm trước khi thực hiện kỹ thuật NIPT là 69,3% nếu tính riêng trong giai đoạn tuổi thai từ 11 tuần trở lên thì tỷ lệ này cao hơn là 73,2%. Tuy vậy, siêu âm chỉ là phương pháp hỗ trợ cho các phương pháp khác trong việc sàng lọc dị tật bẩm sinh. Bằng chứng là có 2/437 thai phụ có kết quả siêu âm bất thường (1 trường hợp có độ mờ da gáy > 5mm và trường hợp còn lại siêu âm thai dị dạng xương mũi) nhưng đều nằm trong nhóm nguy cơ thấp. Hai phương pháp còn lại với độ nhạy cao hơn nhưng chiếm tỷ lệ phần trăm khá thấp: double test 28,1% và triple test là 8,7%. Sàng lọc bằng double test nên được thực hiện tốt nhất ở giai đoạn tuổi thai từ 11-13 tuần 6 ngày và triple test là từ 15-20 tuần.

Nhóm đối tượng có nguy cơ cao thai bị dị tật bẩm sinh chiếm tỷ lệ 19,4%; trong đó trisomy 21 là 19,2% và trisomy 18 là 0,2%. Có sự chênh lệch khá nhiều so với nghiên cứu trước đó của tác giả Hoàng Hải Yến [9] với tỷ lệ thai nguy cơ cao mắc hội chứng Down, Edwards, Patau lần lượt là: 53,0%, 15,0%, 5,0%. Tình hình mắc các dị tật bẩm sinh thay đổi rất nhiều qua các năm và ngày càng khó kiểm soát, tỷ lệ thai nhi mang nguy cơ mắc hội chứng Down và các dị tật khác ngày càng cao, tuy chúng ta khó hạn chế được tỷ lệ mắc nhưng thông qua kỹ thuật sàng lọc trước sinh NIPT ta có thể phát hiện được sớm các dị tật bẩm sinh để hạn chế được việc sinh ra những đứa trẻ mang dị tật, giảm bớt gánh nặng cho gia đình và toàn xã hội.

## V. KẾT LUẬN

**Thông tin chung của thai phụ làm sàng lọc.** Độ tuổi trung bình của thai phụ là  $33,01 \pm 5,63$  tuổi, thai phụ cao tuổi nhất là 47 tuổi, thai phụ nhỏ tuổi nhất là 19 tuổi. Nhóm thai phụ >35 tuổi chiếm 37,1%.

Tiền sử hay gặp nhất ở các thai phụ nghiên cứu là tiền sử đình chỉ thai bất thường/ sảy thai/thai lưu chiếm tỷ lệ 35,2%, tiền sử sinh con mắc dị tật bẩm sinh chiếm 7,1%.

Tuổi của thai nhi trung bình tại thời điểm sàng lọc bằng NIPT là  $13,85 \pm 2,58$  tuần, tuổi thai lớn nhất là 26 tuần, nhỏ nhất là 10 tuần.

### Tỷ lệ sàng lọc trước sinh

Siêu âm là test sàng lọc trước sinh được thực hiện nhiều nhất với tỷ lệ 69,3%; kế tiếp là double test với 28,1% và triple test chiếm 8,7%.

Nhóm đối tượng có nguy cơ cao thai bị dị tật bẩm sinh chiếm tỷ lệ 19,4%; trong đó trisomy 21 là 19,2% và trisomy 18 là 0,2%.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nguyễn Viết Nhân (2010)**, “Tài liệu hướng dẫn sàng lọc trước sinh”, Đại học Y Dược Huế.
2. **Vũ Công Thành và cộng sự (2014)**, “Nghiên cứu đánh giá giá trị của xét nghiệm sàng lọc trước sinh (triple test) tại Bệnh viện đa khoa Medlatec”, Hà Nội, 13-15.
3. **Vũ Thị Nhung, Đào Mai Anh**, “Ứng dụng của cfDNA trong sàng lọc trước sinh không xâm lấn”, Tạp chí Thời sự Y học, Chuyên đề Sức khỏe sinh sản, 17, 1, Tháng 1-2017
4. **Nguyễn Thị Thanh Thủy và cộng sự (2009)**, “So sánh các thông số tầm soát trước sinh ở nhóm thai phụ mang thai bình thường và nhóm thai phụ mang thai hội chứng Down”, bệnh viện Từ Dũ, 4-32.
5. **Gupta, Neerja Agarwal and Madhulika Kabra (2014)**, “Diagnosis and management of Down syndrome”, The Indian Journal of Pediatrics 81(6), 560-567.
6. **Nguyễn Danh Cường và cộng sự (2016)** “Nghiên cứu kết quả lấy bệnh phẩm thai nhi bằng chọc hút dịch ối tại trung tâm chẩn đoán trước sinh bệnh viện phụ sản Trung Ương”, trung tâm chẩn đoán trước sinh BVPSTW.
7. **Hà Thị Mỹ Dung (2015)**, Nghiên cứu tình hình sàng lọc dị tật trước sinh ở các bà mẹ mang thai đến khám và chăm sóc thai tại Trung tâm Chăm sóc sức khỏe sinh sản tỉnh Thừa Thiên Huế năm 2014-2015, Sở Y Tế Tỉnh Thừa Thiên Huế, 2-4, 8-12.
8. **Trần Thị Ngọc Bích và cộng sự (2012)**, “Nghiên cứu tình hình dị tật bẩm sinh tại khoa sơ sinh bệnh viện Phụ sản Trung Ương”, Y học thực hành, 3 (814), 130-133.
9. **Hoàng Hải Yến (2018)**, Đánh giá kết quả sàng lọc trước sinh phát hiện Hội chứng Down từ DNA thai tự do trong huyết tương mẹ, Báo cáo tại Hội nghị Sản Phụ Khoa Việt Pháp 2018, 14-18.