

- midshaft fracture: anterior versus posterior plate fixation", BMC Musculoskeletal Disorders, 20 (1). DOI: 10.1186/s12891-019-2807-3.
6. **Rebekah Belayneh, et al (2019)**, "Final outcomes of radial nerve palsy associated with humeral shaft fracture and nonunion", J Orthop Traumatol, 20 (1), 18. DOI: 10.1186/s10195-019-0526-2.
 7. **Seyed Mahdi, et al (2019)**, "Humeral shaft fracture: a randomized controlled trial of nonoperative versus operative management (plate fixation)", Orthopedic Research and Reviews, 11, pp. 141-147. DOI: 10.2147/ORR.S212998.
 8. **Đỗ Đức Bình (2018)**, "Đánh giá kết quả phẫu thuật điều trị gãy kín đầu trên xương cánh tay bằng nẹp khóa tại Bệnh viện Quân Y 103", Kỷ yếu Hội Nghị Khoa Học Thường Niên Hội Chấn Thương Chính Hình Việt Nam lần thứ XVII, tr. 90.
 9. **Jae-Jung Jeong, et al (2019)**, "Narrow locking compression plate vs long phloos plate for minimally invasive plate osteosynthesis of spiral humerus shaft fracture", BMC Musculoskeletal Disorders, 20. DOI: 10.1186/s12891-019-2697-8.

BIẾN THỂ C.2678 G>C (GLY893ALA) TRONG GEN COL4A5 TRÊN BỆNH NHÂN NGHI NGỜ MẮC HỘI CHỨNG ALPORT

Đường Thị Hồng Diệp¹, Văn Lộc Vũ¹, Trần Nguyễn Như Uyên¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng quy trình giải trình tự gene thể hệ mới (Illumina) tầm soát đột biến gene COL4A5, COL4A3, COL4A4 trên bệnh nhi viêm cầu thận nghi ngờ Alport và xác nhận lại bằng phương pháp giải trình tự Sanger. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Mẫu máu bệnh nhi 7 tuổi được chẩn đoán viêm cầu thận và mẫu máu của cha, mẹ, anh. Tiến hành tách chiết DNA bộ gen trong mẫu máu sử dụng kit Qiagen (Hoa Kỳ), lai-bắt giữ các phân đoạn DNA của các gen mục tiêu và xây dựng thư viện trình tự bằng bộ kit New England Biolabs (Hoa Kỳ), giải trình tự bằng hệ thống giải trình tự thể hệ mới Illumina (Hoa Kỳ) và xác định lại bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger. **Kết quả:** Tìm thấy đột biến c.2678 G>C (Gly893Ala) gen COL4A5, được dự đoán là nguyên nhân gây hội chứng Alport X-linked từ các công cụ in silico dự đoán chức năng của đột biến gene, cho thấy phù hợp với lâm sàng của bệnh nhi. **Kết luận:** Quy trình giải trình tự NGS tìm đột biến gene mục tiêu từ mẫu máu bệnh nhân viêm cầu thận đã được thiết lập thành công tại labo của chúng tôi. Đột biến phát hiện được trên gene Col4a5 là đột biến mới của bệnh nhân, di truyền từ mẹ.

Từ khóa: gene Col4A5, hội chứng Alport, biến thể c.2678 G>C (Gly893Ala)

SUMMARY

C.2678 G>C (GLY893ALA) VARIANT IN COL4A5 GENE IN A PATIENT SUSPECTED TO HAVE ALPORT SYNDROME

Methods: Develop a next-generation sequencing (Illumina) workflow to screen for mutations in the COL4A5, COL4A3, and COL4A4 genes in pediatric patients with suspected Alport nephritis and confirm

the findings using Sanger sequencing. Protocol - developing study. Including: DNA extraction from blood samples using the Qiagen (USA) kit, capture hybridized DNA fragments of target genes and construct a sequencing library using the New England Biolabs (USA) kit, sequence using the Illumina (USA) next-generation sequencing system, and confirm the results by Sanger sequencing. **Result:** A c.2678 G>C (Gly893Ala) mutation in the COL4A5 gene was found, which has not been previously reported in the literature. This mutation is predicted to be the cause of X-linked Alport syndrome based on in silico tools that predict the functional impact of the gene mutation, and it is consistent with the clinical presentation of the patient. **Conclusion:** The NGS sequencing workflow for detecting mutations in target genes from blood samples of patients with glomerulonephritis has been successfully established. The mutation detected in the COL4A5 gene is a novel mutation in the patient, inherited from the mother.

Keywords: gene Col4A5, Alport syndrome, c.2678 G>C (Gly893Ala) mutation.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bé trai ba tuổi được đưa đến khám tại bệnh viện nhi đồng 1 vì tiểu đỏ. Bé tiểu đỏ trước đó 3 tháng, em tiểu đỏ toàn dòng, không đau, không gắt buốt, không sốt, không phù, được chẩn đoán nhiễm trùng đường tiểu, uống nhiều loại kháng sinh, nhưng tình trạng tiểu máu không cải thiện. Xét nghiệm lúc nhập viện: tổng phân tích nước tiểu (TPTNT) cho kết quả Pro 3+, Blood 3+, soi hình dạng hồng cầu niệu: HC biến dạng 80 %, 20% hồng cầu bình thường, Chức năng thận bình thường, đạm niệu 24 giờ 45 mg/kg/24 giờ, đạm máu bình thường, em được tiến hành sinh thiết thận với chẩn đoán: bệnh cầu thận theo dõi bệnh thận IgA.

Mẫu sinh thiết gồm 9 cầu thận được thực hiện với các phương pháp: HE, PAS, TRICHROME BẠC và nhuộm hóa mô miễn dịch. Mô kể và

¹Đại học Y Dược TP HCM

Chịu trách nhiệm chính: Đường Thị Hồng Diệp

Email: duongthihongdiep@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 6.01.2025

Ngày phản biện khoa học: 12.2.2025

Ngày duyệt bài: 10.3.2025

mạch máu bình thường. Nhuộm miễn dịch huỳnh quang: IgA (-), IgG (-), chỉ một ít cầu thận lắng đọng IgM ở gian mạch. Kết quả Phù hợp sang thương cầu thận tối thiểu kèm viêm mạch máu thận mức độ nhẹ. Nhuộm miễn dịch huỳnh quang âm tính. Tuy nhiên do không quan sát tổn thương màng đáy cầu thận bằng kính hiển vi điện tử nên không loại trừ khả năng tiểu máu do:

1. Bệnh màng đáy mỏng
2. Bệnh thận trong hội chứng Alport.

Sau sinh thiết thận, em được điều trị Enalapril 5 mg uống trong 3 năm. Trong quá trình bệnh, em vẫn tiểu đỏ toàn dòng từng đợt. Sau 3 năm điều trị em không phù, tiểu đạm ngưỡng thận hư >50 mg/kg/ngày, em được chẩn đoán viêm thận mạn (sang thương tối thiểu), em được chỉ định uống corticoide (prednisone) 2 mg/kg/ngày 1 tháng sau đó chuyển 1.5 mg/kg/cách ngày. Một năm sau e đến khám tại bệnh viện Nhi đồng 2.

Tại nhi đồng 2, bác sĩ lâm sàng cho làm xét nghiệm người nhà bệnh nhân và phát hiện ra bệnh cho người mẹ. Lúc đó mới biết mẹ tiểu máu, tiểu đạm, anh trai cũng tiểu máu.

Tiền căn: con 2/2, không ghi nhận tiền căn phù, tiểu máu của ba.

Em bà ngoại (cậu ruột của mẹ bé bị suy thận mạn), di của mẹ bị bệnh cầu thận đã mất khi trẻ.

Lâm sàng của bé: tinh táo, không phù, huyết áp bình thường, khám cách cơ quan bình thường. Khám mắt và soi đáy mắt: bình thường.

Khám tai: dày màng nhĩ nhĩ do viêm tai giữa cũ, nhĩ lượng đồ: màng nhĩ 2 bên đàn hồi kém. Đo ABR (điện thính giác thân não):

Xét nghiệm: TPTNT: pro 3+, Blood: large, đạm niệu 24 giờ: 0,32 g (16.8mg/kg/24 giờ)

Albumin máu: 46 g/dl, Protein toàn phần: 71 g/dl, Creatinin máu 63 mmol/l, cholesterol/triglyceride: bình thường, C3, C4: bình thường, ANA test âm tính, HBsAg âm tính, antiHCV âm tính. Mẹ bé và anh trai đều không biết mình có vấn đề vì không có triệu chứng gì. Bác sĩ điều trị nghi ngờ nguyên nhân tiểu máu của bé là do tiểu máu có tính gia đình nên yêu cầu cả nhà thử nước tiểu.

Xét nghiệm các thành viên gia đình:

1. Ba bé: tổng phân tích nước tiểu (TPTNT) bình thường hoàn toàn

2. Mẹ bé: TPTNT: Pro 3+, Blood: large, albumin /creatinine niệu 132 mg/mmol
eCreatinin máu: 1,63 mg/dL, GFR: 36 ml/ph/1,73 m² da.

Mẹ bé được phát hiện bệnh thận mạn giai đoạn 3 dù triệu chứng lâm sàng không có và trước đó không hề biết mình mắc bệnh thận.

3. Anh trai bé (khỏe mạnh, nhưng tiểu máu): TPTNT: Pro âm tính, Blood++, soi nước tiểu: hồng cầu biến dạng 80%, chứng năng thận: bình thường.

Bé, mẹ bé, ba bé và anh trai được lấy mẫu để làm xét nghiệm gene.

Trước đây những xét nghiệm tìm đột biến gene trên toàn bộ vùng exon phải gửi đi nước ngoài. Tại Việt nam với kỹ thuật giải trình tự Sanger, chỉ có thể giải được một đoạn DNA tối đa 750 nucleotide, nghĩa là để tầm soát toàn bộ vùng exon của một gene rất tốn kém và mất thời gian. Trong nghiên cứu này chúng tôi mong muốn thiết lập quy trình tầm soát đột biến gene trên toàn bộ vùng exon của một nhóm gene mục tiêu đã được nhắc đến trong y văn là có liên quan đến hội chứng Alport bằng kỹ thuật giải trình tự thể hệ mới (whole exon sequencing) với mục tiêu giảm giá thành, thời gian và áp dụng được kỹ thuật mới vào chẩn đoán tại Việt nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu: mẫu máu của một bệnh nhi nam được chẩn đoán là viêm thận và 3 mẫu máu của gia đình: bố, mẹ và anh trai được thu thập. Đồng thời thu thập mẫu máu của 7 người khỏe mạnh, bình thường chưa phát hiện có bệnh lý thận hoặc liên quan thận.

Phương pháp nghiên cứu:

Ly trích DNA từ mẫu máu: Mẫu máu thu nhận (200uL) được tách chiết DNA bộ gen bằng bộ kit QiaAmp DNA mini blood (Qiagen, Hoa Kỳ). DNA bộ gen được bảo quản ở -20°C cho đến khi tiến hành làm thư viện giải trình tự.

Xây dựng thư viện giải trình tự: DNA bộ gen được sử dụng để xây dựng thư viện giải trình tự qua các bước chính: phân cắt thành những đoạn nhỏ, lai với mỗi bắt cặp vào vùng gen mục tiêu, sửa chữa đầu mút, gắn Adenine vào mỗi đầu mút, nối kết trình tự adapter và nhân bản DNA có adapter bằng phản ứng PCR với cặp mỗi tương thích với adapter. Toàn bộ qui trình sử dụng hoá chất của hãng New England BioLabs (Hoa Kỳ). Thư viện sau khi hoàn tất được kiểm tra chất lượng bằng bộ kit BioAnalyzer High Sensitivity DNA (Agilent, Hoa Kỳ).

Giải trình tự trên máy giải trình tự thế hệ mới NextSeq: Thư viện đạt chuẩn nồng độ trên 10nM được biến tính và giải trình tự trên máy giải trình tự thế hệ mới NextSeq (Illumina, Hoa Kỳ) với độ phủ trung bình khoảng 100X. Tối thiểu 95% vùng gene mục tiêu có độ phủ trên 10X. Kết quả giải trình tự sẽ so sánh với bộ gene tham chiếu để xác định biến thể di truyền.

Phân tích kết quả trên máy chủ: Dữ liệu

giải trình tự được sao lưu và gửi lên máy chủ để phân tích kết quả. Kết quả giải trình tự thể hệ mới là hàng triệu cặp trình tự ADN có kích thước 75 nucleotit. Từng trình tự ADN 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 biến đổi xảy ra. Toàn bộ phần mềm được viết dựa trên phương pháp phân tích đã được tối ưu hoá bởi Viện nghiên cứu Broad thuộc Đại học Harvard - Hoa Kỳ (Broad Institute, Harvard University, USA). Kết quả phân tích xác định thay đổi nucleotit trong vùng gen mục tiêu. Sau đó kết quả phân tích NGS vùng gene đột biến sẽ được kiểm tra lại với kết quả giải trình tự Sanger tại Trung tâm Y sinh học Phân tử, Đại học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh. Dựa trên cơ sở dữ liệu di truyền hiện có (bao gồm dữ liệu hơn 1000 bộ gene), các biến thể hiếm với tần suất dưới 1% trong quần thể sẽ tiếp tục được phân lớp. Các biến thể được phân loại dựa trên cơ sở dữ liệu Clinvar của viện sức khỏe quốc gia Hoa kỳ (US. National Institutes of Health) được cập nhật tới thời điểm nhóm nghiên cứu phân tích dữ liệu.

Trong nghiên cứu này chúng tôi có sử dụng phần mềm dự đoán Polyphen và SIFT.

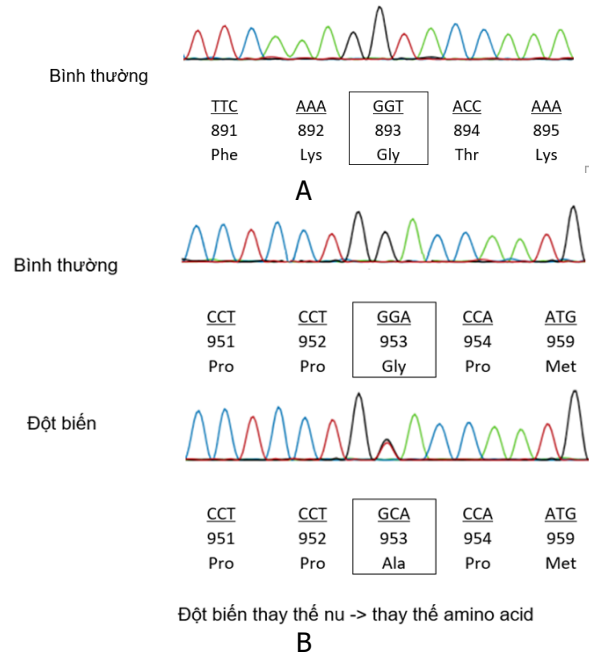
PolyPhen (Polymorphism Phenotyping) là một phần mềm dự đoán tác động chức năng của các biến thể di truyền (đột biến) trong gen đối với protein và sự phát triển của các bệnh lý.

SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) là một phần mềm được sử dụng để dự đoán tác động của các đột biến thay thế axit amin trong protein, nhằm xác định liệu một đột biến có gây ảnh hưởng đến chức năng của protein hay không.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Sau khi giải trình tự toàn bộ exon của 28 gene mục tiêu liên quan hội chứng thận thư (bao gồm cả 3 gene COL4A5, COL4A4 và COL4A3) bằng kỹ thuật Illumina, chúng tôi tìm thấy đột biến c.2678 G>C (Gly893Ala) trên gen COL4A5 của bệnh nhi và mẹ bệnh nhi. Chúng tôi không phát hiện được đột biến này trên mẫu máu của bố và anh trai bệnh nhi. Chúng tôi có chạy 7 mẫu chứng của người khỏe mạnh bình thường, chưa ghi nhận bệnh lý cầu thận và các bệnh lý liên quan thận cũng cho kết quả âm tính với đột biến này. Sau đó exon 32 của gene COL4A5, có

chứa đột biến c.2678 G>C (Gly893Ala), được xác nhận lại trên hệ thống ABI 3500 Genetic Analyzer (phương pháp Sanger) với tất cả các mẫu máu trong nghiên cứu (Hình 1.A).



Hình 1. Kết quả giải trình tự Sanger exon 32 của gene COL4A5

(A) Kết quả giải trình tự Sanger của ba, anh trai bệnh nhi và 7 mẫu chứng người khỏe mạnh bình thường, không phát hiện đột biến c.2678 G>C (Gly893Ala); (B) Hình ảnh đột biến c.2678 G>C (Gly893Ala) trên gen COL4A5 của bệnh nhi và của mẹ bệnh nhi.

IV. BÀN LUẬN

Bằng cách xây dựng quy trình giải trình tự toàn bộ exon với kỹ thuật Illumina, chúng tôi đã phát hiện ra biến thể c.2678 G>C (Gly893Ala) trên gen COL4A5 của bệnh nhi nghi ngờ mắc hội chứng Alport và của mẹ bệnh nhi. Kết quả biến thể này được kiểm tra một lần nữa bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Tiếp theo chúng tôi cố gắng tìm kiếm trên y văn và các cơ sở dữ liệu thông tin và mối liên quan nếu có giữa đột biến này và hội chứng Alport.

Đến nay, tổng cộng 1140 biến thể gen COL4A5 đã được mô tả trong Cơ sở dữ liệu Đột biến Gen Người (HGMD Professional 2023.1). Trong đó, có 539 đột biến sai nghĩa/vô nghĩa (47,3%), 202 đột biến tại vị trí cắt nối (17,7%), 174 mất đoạn nhỏ (15,3%), 64 chèn đoạn nhỏ (5,6%), 11 đột biến thêm bớt (indels) nhỏ (1%), 136 mất đoạn lớn (11,9%), 6 chèn/nhân đoạn lớn (0,5%) và 8 tái sắp xếp phức tạp (0,7%).

Người ta đã báo cáo rằng các biến thể nucleotide đơn trong exon (SNVs), thường được coi là đột biến sai nghĩa hoặc vô nghĩa, thậm chí cả các biến thể đồng nghĩa, có thể dẫn đến quá trình cắt nối RNA bất thường (Aoto et al., 2022; Horinouchi et al., 2020; Okada et al., 2023). Do đó, việc xác định chính xác liệu các đột biến này có ảnh hưởng đến quá trình cắt nối RNA hay không là rất quan trọng.

Nhiều nghiên cứu đã báo cáo về ảnh hưởng của sự biến thể intron và các biến thể đồng nghĩa trong gen COL4A5 đối với quá trình cắt nối RNA (Boisson et al., 2023; Horinouchi et al., 2018, 2019, 2020). Vai trò tiềm tàng của các SNVs exon nằm gần ranh giới exon-intron trong việc gây ra cắt nối bất thường ngày càng được chú ý. Các báo cáo liên quan trước đây đã nghiên cứu ảnh hưởng của cắt nối RNA đối với các SNVs nằm ở nucleotide cuối cùng và nucleotide thứ 2 hoặc thứ 3 từ cuối của các exon trong COL4A5, và đã phát hiện nhiều biến thể gây ra cắt nối bất thường (Aoto et al., 2022; Okada et al., 2023). Chúng tôi đã tìm thấy một nghiên cứu của Zhang và cộng sự, công bố vào tháng 1 năm 2024. Các tác giả đã sử dụng các chương trình tin sinh học để phân tích 401 biến thể nucleotide đơn (SNVs) và xác định các biến thể có thể ảnh hưởng đến quá trình ghép nối RNA tiền mRNA thông qua các thí nghiệm minigene và đột biến định hướng vị trí (Site-directed mutagenesis). Các tác giả sử dụng một hệ thống minigene assay, nơi một đoạn ngắn của gen COL4A5 (bao gồm cả ba biến thể exon được nghiên cứu) được chuyển vào trong tế bào để kiểm tra xem quá trình cắt nối RNA có bị thay đổi không. Ba trong số tám biến thể ứng viên gây ra hiện tượng bỏ qua exon hoàn toàn hoặc một phần. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy các biến thể c.2678G>C và c.2918G>A có thể làm rối loạn các vị trí ghép nối cổ điển, dẫn đến bỏ qua exon tương ứng. Các biến thể này có thể làm thay đổi quá trình cắt nối RNA, dẫn đến việc tạo ra các isoform RNA khác nhau so với dạng chuẩn của gen COL4A5. Những thay đổi này có thể ảnh hưởng đến chức năng của protein COL4A5, có thể góp phần vào sự phát triển của các bệnh lý như hội chứng Alport.

V. KẾT LUẬN

Nhân một bệnh nhi được phát hiện mắc bệnh viêm cầu thận với biểu hiện protein niệu và tiểu máu vi thể được gửi đến cho chúng tôi để làm xét nghiệm gene, chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình giải trình tự toàn bộ exon

dựa trên kỹ thuật Illumina trong đó có gene COL4A5. Biến thể c.2678 G>C (Gly893Ala) trên gen COL4A5 đã được tìm thấy trong mẫu máu của bệnh nhi và mẹ bệnh nhi. Mẹ bệnh nhi đã tình cờ được phát hiện suy thận gia đoạn 3. Biến thể vô nghĩa c.2678G>C (p.Gly893Ala) đã được chứng minh làm xóa bỏ toàn bộ exon 32, ảnh hưởng tới cấu trúc collagen của màng đáy cầu thận, phù hợp với biểu hiện lâm sàng của bệnh nhi. Chúng tôi khuyến nghị đưa xét nghiệm tìm biến thể gene COL4A5 vào hướng dẫn chẩn đoán phân biệt bệnh màng đáy mỏng và hội chứng Alport. Chúng tôi cũng nhấn mạnh sự cần thiết phải đánh giá tác động của các biến thể nucleotide đơn (SNVs) trong việc dự đoán chính xác hiệu quả của đột biến và giúp đánh giá tiên lượng của XLAS ở mức độ mRNA.

VI. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ một phần kinh phí bởi Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh theo hợp đồng số 110/2019/HĐ-ĐHYD, ngày 16/01/2020. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Đại học Y dược thành phố Hồ Chí Minh và Trung tâm Y sinh học phân tử Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aoto, Y., et al. (2022). "Last nucleotide substitutions of COL4A5 exons cause aberrant splicing." *Kidney International Reports* 7(1): 108-116.
2. Boisson, M., et al. (2023). "A wave of deep intronic mutations in X-linked Alport syndrome." *Kidney International* 104(2): 367-377.
3. Horinouchi, T., et al. (2019). "Determination of the pathogenicity of known COL4A5 intronic variants by in vitro splicing assay." *Scientific reports* 9(1): 12696.
4. Horinouchi, T., et al. (2018). "Detection of splicing abnormalities and genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome." *Journal of the American Society of Nephrology* 29(8): 2244-2254.
5. Horinouchi, T., et al. (2020). "Pathogenic evaluation of synonymous COL4A5 variants in X-linked Alport syndrome using a minigene assay." *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 8(8): e1342.
6. Okada, E., et al. (2023). "Aberrant splicing caused by exonic single nucleotide variants positioned 2nd or 3rd to the last nucleotide in the COL4A5 gene." *Clinical and Experimental Nephrology* 27(3): 218-226.
7. Zhang, R., et al. (2024). "Three exonic variants in the COL4A5 gene alter RNA splicing in a minigene assay." *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 12(2): e2395.